

247



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA  
DE Bacillus thurigiensis, A PARTIR DE INSECTOS  
MUERTOS COLECTADOS EN SILOS.

## T E S I S

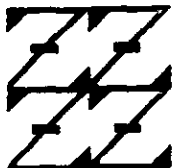
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

**VERONICA BARCENAS CRUZ**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HOMBRO E.N.  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

277967



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

## CARRERA DE Q.F.B.

### SOLICITUD DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS

1. Nombre del solicitante: BARCENAS CRUZ VERONICA
2. No. de cuenta 8920002-1    3. Año en que termina la carrera: 1998
4. Título del tema: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE Bacillus thurigiensis, A PARTIR DE INSECTOS MUERTOS COLECTADOS EN SILOS.
5. Director de tesis: Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO
6. Lugar en el que se desarrollará el trabajo experimental: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, CAMPO II-PLANTA PILOTO
7. Domicilio del solicitante: PRIMERA CERRADA DE CANAL DE SN JUAN #3 COL. AGRICOLA ORIENTAL DEL. IZTACALCO Teléfono: 756 75 54
8. Observaciones: SERVICIO SOCIAL - TESIS
9. Orientación de la carrera: BIOQUIMICA CLINICA
10. Tiempo aproximado del proyecto: 7 MESES
11. Fecha de inicio: 16 DE JUNIO DE 1998
12. Opción de titulación: TESIS EXPERIMENTAL

México, D.F. a, 16 de JUNIO de 1998

Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. CECILE ESCAMILLA FLORES ASESOR DE TESIS

Q.F.B. VERONICA BARCENAS CRUZ SUSTENTANTE

Q.F.B. JOSE LUIS ALFREDO MORA GUEVARA JEFE DE LA CARRERA

*“ Paso a paso conocí, que sólo el Amor y Trabajo rinden frutos como este ... ”*

*Gracias Ernesto.*

*“Del buen ejemplo siempre crecí y ahora mi semilla con buen ejemplo debe germinar”*

*Para mis niños Ernesto Enrique y Xavier Iñaky  
Mis padres Enrique y Rosalinda  
Y a ustedes hermanos que siempre querré.*



# CONTENIDO

Introducción.....	3
Objetivos .....	5
Diagrama de flujo .....	6
Capítulo 1. ¿Qué es un Bioinsecticida?	
1.1. Planteamiento del problema .....	8
1.2. Introducción al control de plagas.....	9
1.3. Control biológico de insectos.....	12
Capítulo 2. <u>Bacillus thuringiensis</u>	
2.1. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
2.2. Características fisiológicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
2.3. Toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	25
2.4. ¿Cómo actúa <i>Bacillus thuringiensis</i> para eliminar al insecto?.....	30
Capítulo 3. Primera parte experimental	
3.1. Hipótesis .....	34
3.2. Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	35
♦ Técnica	
♦ Resultados	
3.3. Identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	44
♦ Pruebas	
♦ Resultados	

Capítulo 4. Segunda parte experimental	
4.1. ¿ Qué es una caracterización bioquímica?.....	48
4.2. Caracterización bioquímica, parte experimental.....	52
♦ Pruebas	
♦ Resultado	
4.3. Matriz en tablero de ajedrez.....	56
4.4. Coeficientes de similitud.....	60
Capítulo 5. Esporulación de <i>Bacillus thurigiensis</i>	
(Tercera parte experimental)	
5.1. Proceso de esporulación de <i>Bacillus thurigiensis</i> .....	65
5.2. Esporulación:.....	68
♦ Técnica	
♦ Resultados	
5.3. Identificación del cuerpo paraesporal.....	70
Análisis de resultados de la parte experimental .....	71
Capítulo 6. Biotecnología como parte del Manejo Integral de Plagas	
6.1. Definición de Biotecnología.....	75
6.2. Biotecnología en la elaboración de Bioinsecticidas.....	76
6.3. Productos comerciales de <i>Bacillus thurigiensis</i> .....	77
Anexos.	
Pruebas bioquímicas, composición y fundamento.....	82
Técnicas de tinción.....	86
Control de calidad.....	88
Fotografías de <i>Bacillus thurigiensis</i> .....	89
Bibliografía .....	96

## INTRODUCCION

A lo largo de la presente tesis se exponen los elementos necesarios para el conocimiento de manera general del control biológico de insectos, a través de una de sus posibles opciones a utilizar como son las bacterias, el caso específico de *Bacillus thuringiensis*, que desde su descubrimiento ha sido objeto de exhaustivos estudios en muy diversos campos de investigación, especialmente en el biotecnológico debido a sus propiedades como insecticida.

El tema central y objeto de la tesis experimental realizada, es la posibilidad de la obtención (aislamiento) y caracterización bioquímica de *Bacillus thuringiensis*, a niveles económicos y fácilmente asequibles (en este caso con los recursos proporcionados por la F.E.S. "Zaragoza"), además de recordar y redefinir conceptos que constantemente son utilizados pero no bien puntualizados como es el caso de la caracterización bioquímica.

Además a lo largo de seis capítulos se pretende ir acercando a cualquier tipo de lector al porque surge la necesidad de evitar usar tantos insecticidas químicos y recurrir al control biológico de los mismos, dar a entender este concepto y como una bacteria, *Bacillus thuringiensis*, contribuye de forma valiosa con la agricultura y la conservación del medio ambiente.

*Bacillus thuringiensis*, forma parte de la familia *Bacillaceae*, fue descubierta por Ishiwata en 1901, quien reporta una bacteria aislada de un gusano de seda (*Bombix mori*) denominándola *Bacillus sotto*, sin embargo fue Berlinier en 1915, quien hace la primera descripción válida, identifico su aislamiento como una nueva especie y propuso su nombre de *Bacillus thuringiensis*, ya que fue aislada en Turingia, Alemania a partir de *Anagasta (Ephesthia) kuniella* o polilla de harina. Berlinier destacó la presencia de un cuerpo paraesporal en las células esporuladas, pero la observación atrajo poca atención.

A partir de la descripción realizada por Berlinier, se empezó a ensayar con *Bacillus thuringiensis*, como un medio de control biológico para insectos plaga.

Durante 1920 y principios de 1930 se publicaron artículos sobre la efectividad de *Bacillus thuringiensis* como agente para el control biológico de *Pyrausta nubilais* (Barrenador del maíz) y otros insectos plaga, de esta manera comienzan estudios más enfocados a *Bacillus thuringiensis* resultando muy satisfactorios como control biológico para insectos plaga, por lo que en 1950 se elaboró en Francia un producto comercial llamado "Sporine", antes de la segunda Guerra Mundial, sin embargo durante la guerra la planta productora fue destruida, con lo que terminó su producción.

En 1953 Hannay redescubrió el cuerpo paraesporal de *Bacillus thuringiensis* dándole atención y naturaleza a su significación. Fitz y Jammes en 1955 confirmaron la observación de Hannay y demostraron que el cuerpo paraesporal estaba compuesto de proteína, asociando este con la patogenicidad de la bacteria.



## OBJETIVOS

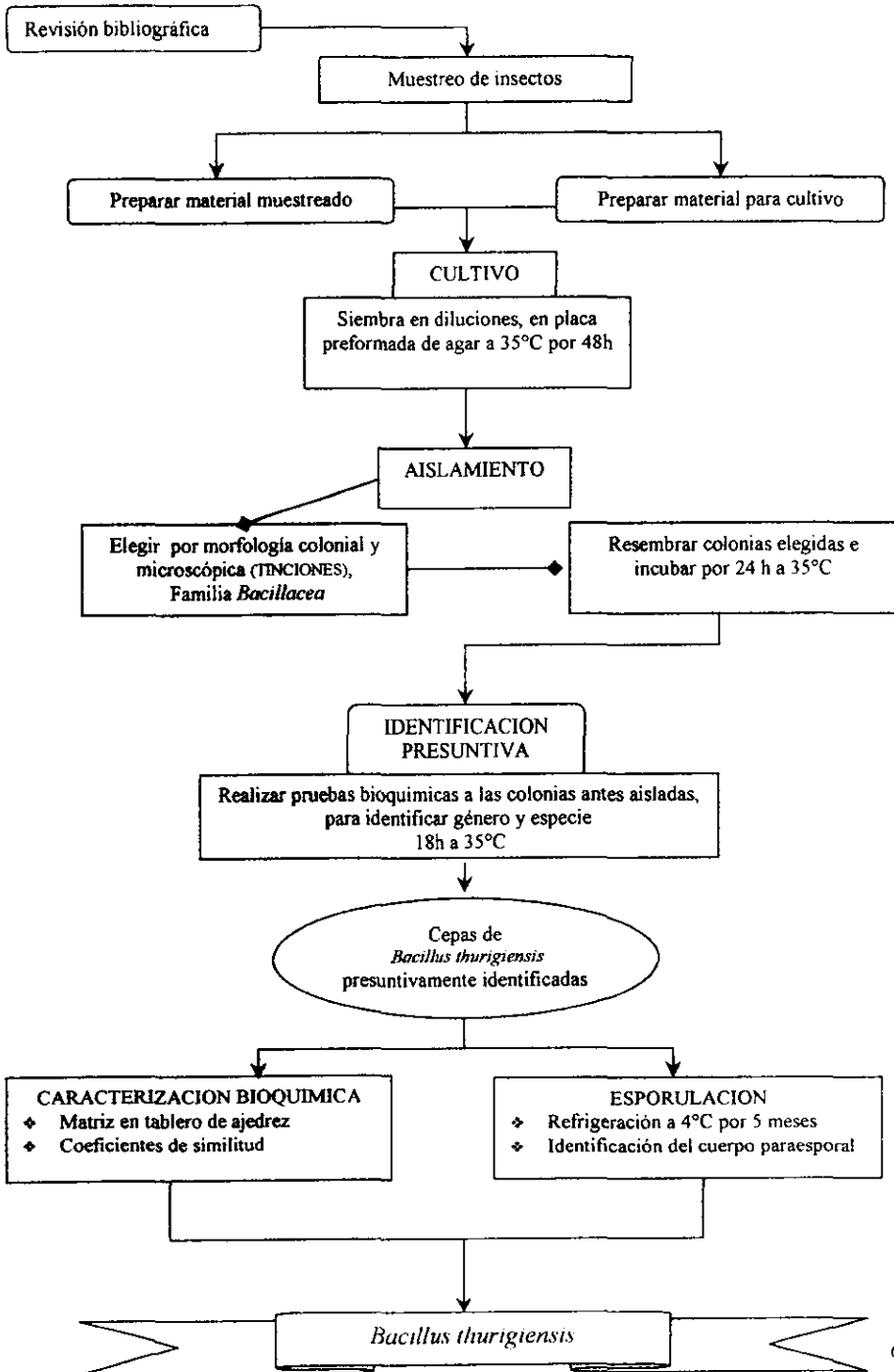
### Objetivo general:

Aislamiento y caracterización bioquímica de *Bacillus thurigiensis*, a partir de insectos muertos colectados en silos.

### Objetivos específicos:

- Adecuar una metodología que permita el aislamiento de *Bacillus thurigiensis*, de acuerdo con los recursos con que cuenta la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”.
- Purificar una cepa de *Bacillus thurigiensis*, a partir de su aislamiento de insectos muertos colectados en silos.
- Identificar y diferenciar a *Bacillus thurigiensis* de otras bacterias con base a sus características morfológicas coloniales macroscópicas, morfología microscópica y características fisiológicas (pruebas bioquímicas).
- Caracterizar bioquímicamente a las cepas de *Bacillus thurigiensis* aisladas.
- Plantear una metodología sencilla para estimular la esporulación de *Bacillus thurigiensis* a nivel de laboratorio.

## Diagrama de flujo del trabajo de tesis



## **Capítulo 1. ¿Qué es un Bioinsecticida?**

- ❖ Planteamiento del problema**
- ❖ Introducción al control de plagas**
- ❖ Control biológico de insectos**

## 1.1. Planteamiento del problema

La agricultura es y será siempre la base de nuestra alimentación, y por ello debemos tener presentes los problemas que en ella suceden. Es el caso de los insectos que como parte de nuestro ecosistema algunas especies son consideradas como nocivas para el hombre por causar grandes pérdidas económicas y a la salud, dañan o destruyen cultivos agrícolas, destruyen o reducen la cantidad de alimentos almacenados y contribuyen con la propagación de otros microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

Para estos problemas se han usado diversas medidas de control, principalmente el uso de insecticidas químicos, pero debido a la falta de información acerca de su uso y consecuencias se han generado diversos problemas como son:

- Daños a la salud humana, principalmente en los campesinos que no utilizan ningún equipo de seguridad al aplicarlos y desconocen la mayoría de sus propiedades tóxicas,
- Generan resistencia por parte de los insectos a tales productos químicos, lo que hace necesario el uso de dosis mayores y con esto el incremento en los costos de producción,
- Incremento de la contaminación ambiental.

Por todo lo anterior se propone el uso de un control biológico, que es muy parecido al que ejerce la naturaleza y evita los problemas generados por el uso de insecticidas químicos.

Una forma de control biológico es el aislamiento, identificación y caracterización de *Bacillus thuringiensis*, que es una bacteria entomopatógena capaz de utilizarse como bioinsecticida. Las fuentes de obtención de esta bacteria son los propios insectos muertos que se encuentran en las tierras agrícolas o en las bodegas de almacenamiento de granos (conocidas como silos).

Con este aislamiento, identificación y caracterización no sólo se contribuye a evitar los problemas generados por los insecticidas químicos, sino se propone continuar con una línea de investigación para en lo posible llegar a la formulación de un bioinsecticida, integrando así asignaturas clave de la carrera de Químico Biólogo Farmacéutico como son: microbiología y tecnología farmacéutica.

## 1.2. Introducción al control de plagas

Existen miles de organismos que compiten con el hombre por comida y hábitat; llámense estos *microbios, insectos, malezas o malas hierbas e inclusive animales de la rama superior* como las ratas y algunas aves, su principal forma de competición es el crecimiento de su población, de ahí que se denominen plagas (calamidad grande y pública –de interés general-).

Al ser este problema tan grande como vigente en todas las épocas, el ser humano ha buscado diversos medios para lograr un equilibrio en esta competencia, en la actualidad al contar con una experiencia y conocimientos más reforzados del problema surge un concepto para manejar este problema, el Manejo Integrado de plagas o **MIP**.

La definición más aceptada según el panel de expertos de la FAO (Food and Agricultural Organization):

“Un sistema de manejo de plagas que, en el contexto del ambiente asociado y la dinámica poblacional de las especies bajo estudio, utiliza todos los métodos y la tecnología adecuada de manera compatible para mantener la densidad poblacional de plaga a niveles subeconómicos, conservando a la vez la calidad ambiental”.

De esta manera el MIP maneja los siguientes puntos para lograrlo: (12)

- I. Conocimiento del ecosistema: considerar la biología, la fenología, el comportamiento y la ecología de la planta, la(s) plaga(s) y los enemigos naturales (depredadores, parasitoides, patógenos) para evaluar la mortalidad en el espacio y el tiempo.
- II. Prevenir acciones que ocasionen el desequilibrio ecológico:
  - 1) Usar métodos ecológicos.
  - 2) Buscar el rendimiento óptimo (a largo plazo) y no rendimiento máximo (a corto plazo).
  - 3) Desarrollar esquemas sólidos de muestreo para la detección y el monitoreo, y la estimación de la población de los organismos.
  - 4) Desarrollar umbrales y niveles de daños económicos.

5) Usar productos químicos solamente cuando sean necesarios y en el lugar requerido.

III. Usar métodos múltiples de supresión:

- 1) Control biológico.
- 2) Control cultural.
- 3) Control microbiano.
- 4) Control químico.
- 5) Control mecánico y físico.
- 6) Uso de plantas resistentes a las plagas.
- 7) Control regulatorio (reglamentos oficiales fito- zoosanitarios).
- 8) Control genético.
- 9) Control vía el uso de las feromonas (infoquímicos que funcionan entre diferentes sexos de la misma especie).
- 10) Uso de los reguladores del crecimiento.
- 11) Esterilización.
- 12) Atrayentes (destruir las plagas atrayéndolas a lugares donde alimentan u ovopositan).
- 13) Uso de kairomonas (sustancias químicas de los hospederos que atraen a los enemigos naturales), allomonas (sustancias químicas de los enemigos naturales que atraen a sus presas) y sinomonas (sustancias químicas de las plantas que atraen a los enemigos naturales para darles protección contra las plagas).
- 14) Uso de repelentes.
- 15) Promover la diversidad ecológica del ecosistema.

IV. Educación e información al público e incluso a los profesionistas de la entomología económica, de la industria, de los plaguicidas y de las dependencias de gobierno. El MIP requiere de la cooperación de todos los especialistas de los campos relacionados con la utilización y el aprovechamiento de los recursos naturales.

El MIP presenta los siguientes beneficios al ambiente, del cual el hombre es componente integral:

- Estabilidad espacio-temporal del método.
- Durabilidad (permanencia) del método.
- Mínimo rompimiento del balance natural del medio ambiente.
- Más económico comparado con los métodos convencionales de control.

A pesar que esta propuesta parece nueva se viene llevando a cabo desde años atrás por algunos campesinos que conocen el momento adecuado para sembrar, como dejar descansar la tierra, conocen a los animales benéficos para los cultivos y existen algunas maneras naturales que usan para controlar algunas plagas. Los problemas surgen sin embargo por la misma evolución del hombre y de su entorno. Al abrirse las vías de comunicación y expandirnos por todos los continentes muchas de las plagas fueron exportadas e importadas cabe señalar el caso de la llegada en barcos españoles de las ratas al Nuevo Mundo y con ellas la viruela durante la conquista. Además aunado a este punto la evolución de las ciencias como la Química, que si bien hasta la fecha nos genera muchos beneficios, contribuyo con la explotación exagerada de sus productos en el ámbito del campo (plaguicidas químicos) generando problemas de contaminación ambiental y haciendo resistentes a las plagas contra ellos.

Al parecer la propuesta del MIP se presenta como una espléndida solución para el control de plagas tratando de recobrar y mantener el equilibrio, no sólo ecológico, sino un equilibrio entre el progreso del ser humano y su entorno. Sin embargo este plan cuenta con algunas limitaciones como son:

- Falta de fundamentos de los conocimientos ecológicos y la carencia de los niveles económicos (umbral y nivel de daño) para las plagas.
- La dificultad de hacer entender al campesino las ventajas del sistema.
- Combatir el deseo económico de algunas compañías que siguen comercializando productos químicos que están en desuso debido a su toxicidad y daños ecológicos que provocan.

### 1.3. Control biológico de insectos

En el presente trabajo tratamos de dar un panorama general acerca de una de las formas de control propuestas por el MIP, como es el Control biológico con el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, y de esta manera contribuir con la generación de información de estos métodos alternativos para hacer ver al público en general que estas propuestas son económicas y fácilmente recuperables.

Los insectos como parte de nuestro ecosistema pueden ser útiles o perjudiciales para el hombre, los efectos perjudiciales causan grandes pérdidas económicas, como son:

- Daño o destrucción de cultivos agrícolas y otras plantas valiosas.
- Contribuir a la propagación y desarrollo de bacterias, hongos, protozoarios, helmintos, riketsias y virus que producen enfermedades, y a veces, la muerte del ser humano y animales domésticos.
- Contribuir a la propagación y desarrollo de bacterias, hongos, micoplasmas y virus que producen enfermedades en las plantas.
- Destrucción o reducción del valor de los alimentos almacenados o de otros productos y bienes.
- En general molestia de diversas formas a personas y animales.

Los grupos de insectos útiles e inoocuos son los más numerosos, ya que menos del 1% de todas las especies de insectos se consideran dañinas para el hombre, sin embargo, el grupo nocivo, causa pérdidas millonarias cada año en los ámbitos agrícolas de todo el mundo.

Por lo anterior es necesario tomar las medidas adecuadas para evitar estos problemas, en la descripción del MIP se manejan diversos métodos de formas de control de las plagas, todos ellos también tienen ventajas y desventajas, sin embargo el uso del control químico en forma de plaguicida es el que se ha explotado más de manera desconsiderada. A la fecha existen más de 1500 ingredientes activos de plaguicidas registrados por la Environmental Protection Agency (EPA); las mezclas y combinaciones de estos ingredientes activos han



generado cerca de 50 mil productos comerciales con estas propiedades plaguicidas. Los plaguicidas tienen usos en distintos campos, pero la actividad agrícola es su principal aplicación, con alrededor del 85% de los productos que se consumen en el mundo.

Un ejemplo del consumo de plaguicidas químicos en México se ve reflejado en el estado de Yucatán, que es uno de los principales estados horticultores, y en él se emplean diversos plaguicidas, debido al ataque en las cosechas por un gran número de plagas y enfermedades propias de los climas tropicales. De acuerdo con datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Sagar), en Yucatán en 1990 se consumieron alrededor de 606.8 toneladas de diversos plaguicidas; en 1991 se registro un incremento del 18%, alcanzando la cantidad de 741.1 toneladas; en 1992 el consumo alcanzó las 1010.3 toneladas y en 1995 fue cercano a las 2mil toneladas.

Entre los plaguicidas utilizados se encuentran 13 de los registrados en la Lista consolidada de productos químicos prohibidos, suspendidos y restringidos por los gobiernos y publicada por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), ver tabla 1. Al utilizar estos plaguicidas los horticultores han resentido problemas de: intoxicaciones, daños a la piel, daños a mucosas respiratorias y gastrointestinales, trastornos renales, hepáticos, etc., e incluso la muerte, por desconocer las propiedades de los plaguicidas, así como la manera de usarse. (6)

Tabla 1. Plaguicidas en regiones hortocitricolas de Yucatán* (6)				
Nombre químico	Grupo químico	Uso	DL mg/Kg	Peligrosidad
Metiparación	Organofosforado	Insecticida	14	Extrema IA
Metamidofósforo	Organofosforado	Insecticida	30	Alta IB
Metomilo	Carbamato	Insecticida	16	Alta IB
Diazinón	Organofosforado	Insecticida	300	Moderada II
2,4-D	Clorofenoxia	Herbicida	375	Moderada II
Endosulfán	Clorado	Insecticida	80	Moderada II
Paraquat	Bipiridilo	Herbicida	150	Moderada II
Malatión	Organofosforado	Insecticida	2000	Ligera III

\* Según la clasificación de plaguicidas conforme a su peligrosidad, recomendada por la OMS, 1992-1993

Este claro ejemplo nos ilustra como el mal uso y abuso del control químico, genera problemas a la salud humana, además propicia una resistencia por parte de los insectos a una gran mayoría de estos plaguicidas, específicamente insecticidas, propiciando el uso de dosis más altas de agentes químicos para lograr el efecto deseado, y con esto incide en el incremento de los costos de producción y aumento en los problemas de <contaminación ambiental>. Por estos hechos se ha partido a la búsqueda y uso de un control más parecido al que ejerce la naturaleza, y este es: el control biológico.

El control biológico, se puede definir como:

“El manejo de los enemigos naturales (depredadores, parásitos y patógenos de plagas) y enemigos benéficos selectos (Ciertos antagonistas y alelopatas) y sus productos, para reducir poblaciones de plagas y sus efectos” (Kinget et al., 1988).

Para la clasificación del control biológico se han recurrido a diversas formas:

1. De acuerdo al tipo de plaga que controlan:

- Herbicidas
- Insecticidas
- Fungicidas
- Bactericidas
- Viricidas
- Moluscicidas
- Rodenticidas

2. Por su forma biológica:

- Esporas
- Proteínas cristalinas
- Baculovirus
- Protozoarios
- Nematodos
- Insectos
- Plantas
- Peces
- Organismos superiores

3. Por su mecanismo de acción:

- Predadores directos
- Herbívoros
- Parásitos
- Patógenos
- Competidores directos o indirectos

De esta forma podemos observar que el control biológico de plagas es claramente aplicable a los insectos y en cualquiera de las formas en que se use (como entomopatógenos, entomofagos, que son parásitos propios de los insectos capaces de propiciarles enfermedad y destruirlos, con esporas o proteínas, etc.) se conocen como insecticidas biológicos microbianos o “Bioinsecticidas”.

Las principales ventajas de los bioinsecticidas frente a los insecticidas químicos son:

- a) La naturaleza inocua y no tóxica de los patógenos de insectos para otras formas de vida, con la consecuente ausencia de residuos tóxicos,
- b) El relativamente alto grado de especificidad de la mayoría de los patógenos, que tienden a proteger a insectos benéficos,
- c) La compatibilidad con productos químicos, hace que puedan ser usados de forma sinérgica, en casos de insectos plaga difíciles,
- d) La facilidad y bajo costo con que algunos patógenos pueden ser producidos, así como las formas de su aplicación,
- e) Las bajas dosis que se requieren para el control, provocan con gran lentitud la resistencia en los organismos receptores.

De esta manera se cumplen las expectativas del MPI planteadas anteriormente.

Para que un microorganismo o sus productos puedan usarse como bioinsecticidas contra un insecto plaga de importancia agrícola, médica, forestal, doméstica y ornamental, debe cumplir con las siguientes características:

- a) Facilidad de tecnología masiva de producción
- b) Especificidad
- c) Seguridad, es decir que no sea tóxico para el hombre, plantas y otros animales
- d) Eficiencia y efectividad
- e) Sea susceptible de almacenaje por largos periodos de tiempo, ser transportable a cualquier parte del mundo y persistir después de aplicarse en el hábitat natural.

Actualmente se conocen más de 100 mil especies de microorganismos, de los cuales más de 1500 son entomopatógenos (parásitos internos de los insectos capaces de causarles enfermedad y muerte). De estos se encuentran 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y más de 100 especies bacterianas aisladas de insectos muertos y muestras de suelos.

De los microorganismos antes señalados, existe una bacteria que reúne todos los requisitos para ser un bioinsecticida, y para nuestros fines de estudio: *Bacillus thuringiensis*.

A continuación en el siguiente capítulo daremos todos los pormenores de esta bacteria, su descubrimiento, características morfológicas y fisiológicas y sus efectos sobre los insectos plaga.

## Capítulo 2. *Bacillus thuringiensis*

- ❖ Historia de *Bacillus thuringiensis*
- ❖ Características fisiológicas de *Bacillus thuringiensis*
- ❖ Toxicidad de *Bacillus thuringiensis*
- ❖ ¿Cómo actúa *Bacillus thuringiensis* para eliminar al insecto?

## 2.1. Historia de *Bacillus thuringiensis*

### Descubrimiento de los entomopatógenos como ayuda para el hombre.

La descripción de Aristóteles acerca de la muerte de las abejas en “Historia animal”, fue probablemente el primer documento de la muerte de un insecto. Observaciones de insectos, particularmente de abejas y gusanos de seda fueron reportadas en la temprana “Literatura de Grecia y Roma” también en trabajos de poetas y naturalistas de los siglos XVI y XIX.

La patología de insectos en sí tiene sus inicios en el siglo XIX, bajo los estudios de Bassi (1835) y Pasteur (1870). Bassi fue el primero en demostrar que un microorganismo, el hongo *Beauveria bassiana*, podría ser la causa de la muerte infecciosa de los gusanos de seda, Bassi no sólo contribuyó al entendimiento de las muertes infecciosas de insectos benéficos, sino tan bien señaló que este tipo de muerte infecciosa podría ser utilizada para el control de insectos no benéficos. Las investigaciones de Pasteur no fueron referentes al control de insectos, pero si en el control de muerte de poblaciones de gusanos de seda y abejas productoras de miel, sus estudios sobre: el impacto de muerte de grandes poblaciones de insecto, facilitó la idea de aplicación de microorganismos como insecticidas.

### Descubrimiento de *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus thuringiensis* fue descubierto por Ishiwata en 1901, quien reporta una bacteria aislada de un gusano de seda (*Bombix mori*) denominándola *Bacillus sotto*, sin embargo fue Berlinier en 1915, quien hace la primera descripción válida, identifico su aislamiento como una nueva especie y propuso su nombre de *Bacillus thuringiensis*, ya que fue aislada en Turingia, Alemania a partir de *Anagasta (Ephesthia) kuniella* ó polilla de harina. Berlinier destacó la presencia de un cuerpo paraesporal en las células esporuladas, pero la observación atrajo poca atención.

Durante 1920 y principios de 1930 se publicaron artículos sobre la efectividad de *Bacillus thuringiensis* como agente para el control biológico de *Pyrausta nubilais* (Barrenador del maíz) y otros insectos plaga, de esta manera comienzan estudios más enfocados a *Bacillus thuringiensis* resultando muy satisfactorios como control biológico para insectos plaga, por lo que en 1950 se elaboró en Francia un producto comercial llamado “Sporine”, antes de la segunda Guerra Mundial, sin embargo durante la guerra la planta productora fue destruida, con lo que terminó su producción.

En 1953 Hannay redescubrió el cuerpo paraesporal de *Bacillus thuringiensis* dándole atención y naturaleza a su significación. Fitz y Jammes en 1955 confirmaron la observación de Hannay y demostraron que el cuerpo paraesporal estaba compuesto de proteína, asociando este con la patogenicidad de la bacteria.

A continuación citamos en la tabla 2, un resumen de los antecedentes históricos de *Bacillus thuringiensis* por año y descripción del evento sobresaliente adaptada por Galán –Wong, L. J.(1993). (15)

Tabla 2. Antecedentes históricos del descubrimiento de *Bacillus thuringiensis*.

Año	Descripción
1901	El científico japonés Ishiwata descubrió una bacteria aislada de un gusano de seda enfermo a la que denominó <i>Bacillus sotto</i> .
1911	Primera descripción válida de <i>Bacillus thuringiensis</i> realizada por Berlinier al aislar una bacteria aeróbica formadora de esporas de una larva enferma de la palomilla harinosa del Mediterráneo ( <i>Ephestia khumiella</i> Zell).
1915	Berlinier identificó a esta bacteria como una especie nueva y propuso el nombre de " <i>Bacillus thuringiensis</i> " ya que la aisló de Thurigen, Alemania.
1915	Aoki y Chigasaki demostraron que los cultivos viejos de <i>B.sotto</i> eran más tóxicos a insectos que cultivos jóvenes, debido a una toxina presente en los cultivos viejos.
1927	Mattes confirma las investigaciones de Berlinier agregando que el "cuerpo de desecho" cambia la posición de la espora.
30's	Se realizaron extensivas pruebas de campo con esporas aisladas contra <i>Ostrinia nubilalis</i> (barrenador del maíz), estas resultaron satisfactorias. Con esto se elaboró un producto comercial en Francia "Sporine". Su producción finalizó al ser destruida la fabrica que lo producía durante la segunda Guerra Mundial.
1946	Smith, Gordon y Clarke describieron a <i>Bacillus thuringiensis</i> como una variedad de <i>Bacillus cereus</i> , por ser casi indistinguibles.
1951/52	Toumanoff y Vago aislaron una cepa que causa toxemia y septicemia en larvas de gusano de seda y observaron que estos síntomas varían con la cantidad de cultivo ingerido por la larva, la denominaron <i>Bacillus cereus</i> variedad <i>alesti</i> .
1953	Hannay estudió la esporulación de <i>Bacillus cereus</i> variedad <i>alesti</i> y redescubrió el "cuerpo de desecho" confirmando las observaciones de Berlinier.
1953/54	Angus demostró que la toxicidad en el insecto esta asociada principalmente con la inclusión cristalina del bacilo y que ésta requiere ser solubilizada en álcali diluido o en jugo intestinal del insecto para ser activa.
1955	Hannay y Fitz-James informaron que la inclusión cristalina es de naturaleza proteica y que su ingestión es suficiente para causar la muerte a larvas de lepidópteros susceptibles.
1960	Se comercializó "Thuricide".
1962	De Barjac y Bonnetoi propusieron una clasificación serológica en base al antígeno flagelar H para esta bacteria.



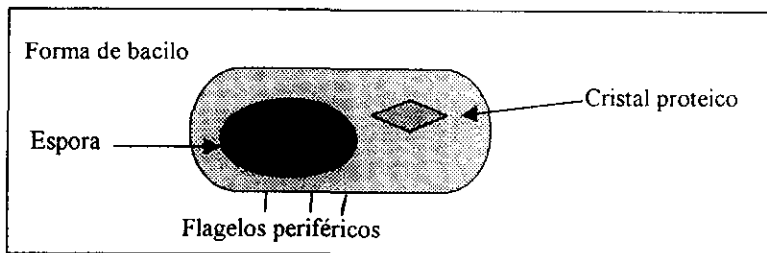
Continuación tabla 2, Antecedentes históricos del descubrimiento de *Bacillus thuringiensis*.

1968	Dulmage aisló una cepa que resultó 20-200 veces más potente que las cepas conocidas, la denominó HD-1. Esta cepa es la base de la mayor parte de los productos comerciales.
1968/69	Se desarrolló "Dipel" el producto comercial más exitoso el cual contiene la cepa HD-1 aislada por Dulmage.
1977	Goldberg y Margalit descubrieron en Israel una nueva cepa con actividad sobre larvas de mosquitos y moscas negras, <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i> .
1983	Krieg y colaboradores aislaron en Alemania una nueva cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> de una larva de <i>Tenobrio molitor</i> con actividad tóxica para coleópteros, <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>tenebrionis</i> .
90's	El auge en el descubrimiento de toxinas Cry con nuevas actividades (toxinas contra nemátodos, platelmintos, ácaros, protozoarios, himenópteros y áfidos).

## 2.2. Características Fisiológicas de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis*, forma parte de la familia *Bacillaceae*, son bacterias de forma bacilar, formadoras de endoesporas muy resistentes a diversas condiciones extremas de cambio en el medio ambiente en el que se encuentren, generalmente bacterias Gram positivas, contienen flagelos periféricos que les confieren movilidad y pueden ser bacterias aerobias o anaerobias facultativas.

Figura 1. Esquema de *Bacillus thuringiensis*, principales características morfológicas microscópicas.



En cultivos bacteriológicos se puede encontrar que el género *Bacillus*, forma colonias grandes y extendidas mayores a 0.5 cm, con márgenes irregulares, colonias de color blanquecino, de consistencia cremosa, elevación plana, luz transmitida y reflejadas opacas, y en cultivos viejos la característica de la formación de la cabeza de medusa.

Las especies de *Bacillus* son de naturaleza ubicua y habitan en el suelo, agua y polvo del aire, algunas pueden ser parte de la flora intestinal normal del hombre y los animales. En el caso específico de *Bacillus thuringiensis*, se puede encontrar en el suelo y en insectos muertos o enfermos que lo contengan.

Figura 2. Anatomía de una bacteria sencilla

Anatomía de una bacteria sencilla

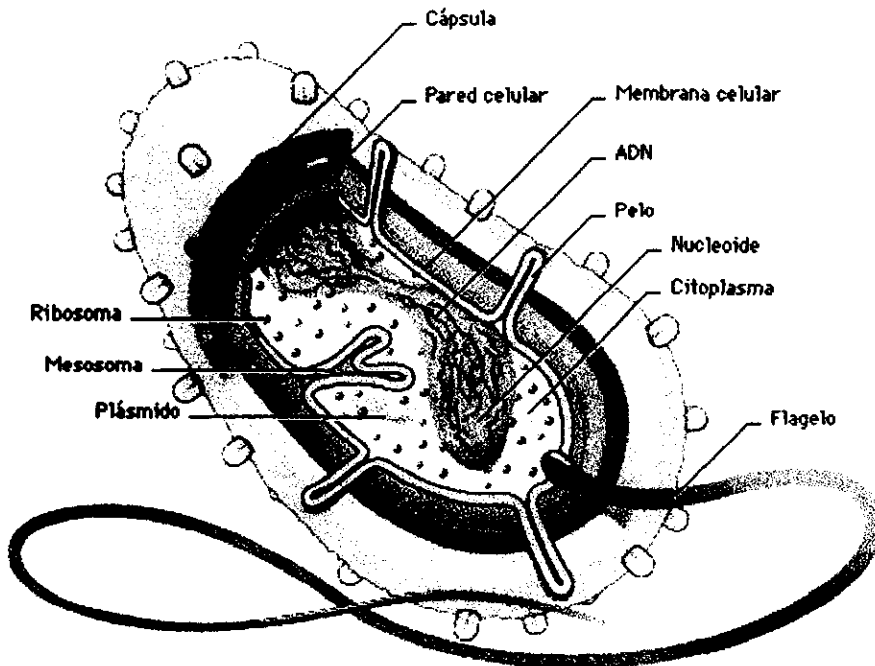


Ilustración de Microsoft

Figura 3. Fotografía microscópica de un cultivo bacteriano

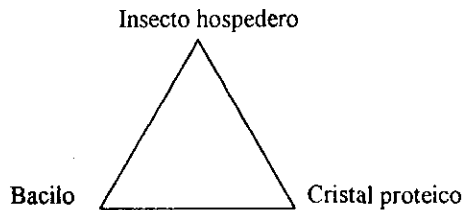
División de una bacteria



### 2.3 Toxicidad de *Bacillus thuringiensis*

Las bacterias patogénicas pueden causar enfermedad en su hospedero, derivando a su muerte por: invasión de tejidos, debido a la producción de toxinas que pueden causar efectos citotóxicos en el sitio propio de la lesión o en sitios remotos del mismo hospedero; o el efecto patogénico deberse exclusivamente a un proceso invasivo.

Para el efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* Hannay (1956) sugirió que existía un triángulo de variables:



Donde describía que el efecto patógeno que causaba *Bacillus thuringiensis*, era debido principalmente a la producción de un cristal de naturaleza proteica, que al ser ingerido por el insecto hospedero, bajo ciertas condiciones provocaba la parálisis intestinal del insecto, este dejaba de alimentarse para luego morir por la toxemia, por septicemia o por inanición debida a la parálisis total del cuerpo. Este proceso estaba influenciado por el tipo de insecto atacado, pues la muerte podía durar de minutos a días de acuerdo al insecto infectado.

En la actualidad se conocen más características patógenas de *Bacillus thuringiensis*, este microorganismo se caracteriza por producir 7 diferentes toxinas:

1. La fosfolipasa C, también conocida como  $\alpha$ -exotoxina
2. Una toxina termoestable,  $\beta$ -exotoxina
3. Una enzima no identificada que puede ser no tóxica,  $\tau$ -exotoxina
4. El cristal proteínico paraesporal,  $\delta$ -endotoxina

5. Una toxina lábil
6. Una toxina soluble
7. Una exotoxina conocida como facto-ratón

A continuación describiremos a tres de las toxinas que han sido más estudiadas, pues son las que se ha comprobado causan los efectos patogénicos más evidentes sobre algunas especies de insectos.

#### $\alpha$ -exotoxina

Esta toxina (fosfolipasa C o lecitinasa), ha sido estudiada en relación a la patogenicidad no sólo de *Bacillus thuringiensis*, también de *Bacillus cereus*. Esta es una enzima capaz de lisar diversos tipos de células, principalmente al afectar los fosfolípidos de la membrana causando la acción lítica o necrosante. La fosfolipasa C ha recibido el nombre sistemático de fosfatidilcolina fosfohidrolasa, actúa sobre la molécula de lecitina con la formación de un diglicerido y fosforilcolina.

En estudios sobre la biosíntesis de la lecitinasa producida por *Bacillus thuringiensis*, se demostró que esta, aparece en la fase logarítmica de crecimiento y, que su mayor actividad en el sobrenadante se observa después de 10 horas de inoculación. Su biosíntesis y acumulación ocurre en un rango de pH de 6.0-9.0. Es una proteína termolábil, estable en un rango amplio de pH (3.0-9.0) y estable en presencia de tripsina y de urea 8M.

Se ha encontrado susceptibilidad por parte de algunos insectos como *Galleria mellonella*, *Plutella maculipennis*, hacia esta toxina, sin embargo, el papel de esta toxina aun requiere de más estudios (Faust et al., 1982).

## β-exotoxina

La estructura de la beta exotoxina es una molécula compleja de un ácido fosfoalárico y un derivado nucleotídico de adenina, unidos entre sí por una molécula de glucosa. Su presencia fue descubierta en un sobrenadante inyectado por McConell y Richards en 1959, aislada y caracterizada por De Barjac y Dedonder (1965-1968) y posteriormente Farkas en 1969 propone la estructura química de esta toxina como un análogo nucleotídico.

En 1973, Faust, reporta a esta toxina como un producto extracelular, dializable, soluble en agua y termoestable a 120°C por 15 min, el cual es producido durante la fase de crecimiento exponencial por algunas variedades de *Bacillus thuringiensis*.

Esta toxina tiene un amplio espectro de toxicidad, que abarca diversos ordenes de insectos como: Orthoptera, Coleóptera, Lepidóptera y Díptera principalmente. El efecto que causa esta toxina, algunas veces es causar la muerte de las larvas, pero en la mayoría de las veces causa daños mutagenicos en el desarrollo de los insectos maduros, siguiendo usualmente esta secuencia de afectación: partes bucales (no desarrollo o mutación), antenas, torax y alas, además de afectar la reproducción entre los insectos adultos.

Se ha propuesto el uso de esta toxina como un bioinsecticida, pero no se ha aceptado por la EPA (Environmental Protection Agency) para su uso en Estados Unidos, sin embargo en países como Rusia se ha utilizado una preparación comercial a base de beta toxina llamada Bytoksibacillin para controlar al escarabajo colorado de la papa. *Leptinotarsa decemlineata*, por cerca de 10 años (Cantwell et al., 1983).

## δ-endotoxina

Esta es la toxina más ampliamente estudiada de *Bacillus thuringiensis*, esta contenida en un cristal paraesporal proteinico, el cual es termolábil y soluble en soluciones alcalinas (Faust et al., 1982). En 1967, Heimpel propone que esta toxina sea llamada delta endotoxina, sin embargo. también se ha sugerido que sólo la porción activa del cristal se debe considerar como delta endotoxina.

El cristal se produce después de que la bacteria comienza la esporulación y la síntesis es detectada primero en el estado II del ciclo de esporulación, pero el mayor crecimiento ocurre durante las fases III y IV (Faust et al., 1982).

Generalmente la forma del cristal es bipiramidal, pero se han encontrado cristales de diversas formas y tamaños, así los cristales de diferentes serotipos difieren en composición y cantidad de cadenas polipeptídicas. La estructura molecular del cristal y su origen exacto en la célula se desconoce, sin embargo se sabe que la toxina está presente como una protoxina, la cual es hidrolizada a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales en el hospedero. Al ingerir los insectos el cristal, éste es solubilizado y la protoxina es activada por las proteasas. Se ha observado que los cristales de serotipos diferentes también varían en solubilidad y susceptibilidad hacia las enzimas intestinales (Faust et al., 1982).

En 1981, Yamamoto realizó estudios bioquímicos del cristal y obtuvo péptidos de diferentes pesos moleculares, un péptido de 135000 Da denominado P-1, el cual es tóxico contra Lepidópteros y un segundo péptido de 6500 Da denominado P-2, el cual resultó ser tóxico contra Dípteros además de serlo contra Lepidópteros como P-1.

En cuanto al efecto fisiológico que dicha toxina presenta en los insectos hospederos, se ha observado que actúa sobre la superficie de las células epiteliales del intestino, interactuando con lípidos específicos, provocando un efecto similar a los detergentes, rompiendo la membrana celular y causando citólisis (Faust et al., 1982).



Trabajos más recientes sugieren que la toxina de *Bacillus thuringiensis*, induce la formación de poros en la membrana tanto en la células epiteliales en el intestino de los insectos como en las células cultivadas intestinales. Hofte, menciona que las investigaciones se enfocan ahora en discernir si la formación de dichos poros es indirectamente por la interacción con proteínas presentes en la membrana o directamente por la inserción de la toxina dentro de la membrana. Sin embargo cabe mencionar, que todos estos cambios fisiológicos en el insecto provocados de una u otra manera, ocasionan que el insecto deje de alimentarse y muera por falta de alimentación y/o infección bacteriana.

La delta-endotoxina sintetizada en gran cantidad llega a constituir el 30 % del peso seco de las células (Agaisse y Lereclus, 1996). **Por cristalizar intracelularmente, se les ha denominado proteínas Cry y los genes que las codifican se designan como genes Cry.** Además existe otro tipo de delta-endotoxinas denominadas proteínas Cyt que son mosquitocidas y tienen actividad hemolítica; cuando se presentan (usualmente asociadas a cepas con actividad contra dípteros), son depositadas conjuntamente con las proteínas Cry en la inclusión paraesporal (Höfte y Whiteley, 1989).

Algunas delta-endotoxinas son 300 veces más potentes que insecticidas químicos como los piretroides y hasta 80000 veces más tóxicas que insecticidas organofosforados (Feitelson et al., 1992). Las inclusiones paraesporales se forman con la asociación de las delta-endotoxinas que forman un complejo cristalino, a través de interacciones débiles como fuerzas de van der Waals y puentes de hidrogeno, atracciones electrostáticas fuertes, y uniones covalentes como puentes de disulfuro intra e intermoleculares propios de las proteínas (Burgues y Hurst, 1977).

Estas son las características básicas de la delta-toxina, esta toxina es la que se formula comercialmente como bioinsecticida, por ello en otro capítulo citaremos de que manera la biotecnología se asocia con la producción de bioinsecticidas a partir de esta toxina, cuales son las compañías que los producen etc.

## 2.4. ¿Cómo actúa *Bacillus thuringiensis* para eliminar al insecto?

En este punto nos centraremos específicamente al mecanismo de acción de la  $\delta$ -endotoxina, por ser la toxina más letal y más estudiada de *Bacillus thuringiensis*

### Mecanismo de acción de la $\delta$ -endotoxina (figura 3)

#### 1. Solubilización del cristal y procesamiento de la protoxina.

Se sabe que las proteínas Cry se acumulan en la célula formando cristales durante el proceso de esporulación del bacilo. En los cristales se encuentran como productos inmaduros o protoxinas, que para ser activados requieren estar solubles en las condiciones extremas de pH alcalino del intestino de los insectos y además en ese mismo sitio deben ser activadas por proteólisis.

#### 2. Unión al receptor e inserción en la membrana.

Los productos maduros se unen a receptores localizados en la microvellosidad apical de las células epiteliales del intestino medio, donde después de un cambio conformacional ocasionado como consecuencia de la interacción con el receptor, se insertan en la membrana.

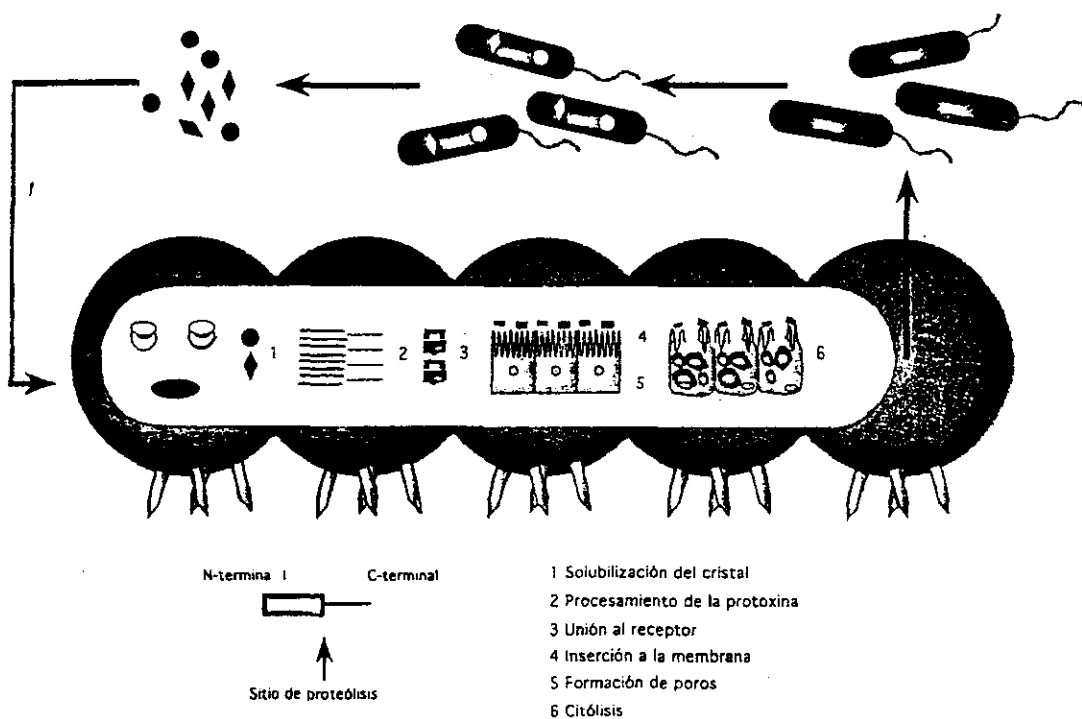
#### 3. Formación de poros y citólisis.

La inserción conduce a la formación o apertura de canales iónicos que alteran las propiedades endógenas de permeabilidad de la membrana afectada.

Dicha alteración causa después la entrada masiva de agua a las células, la destrucción del tejido epitelial y finalmente la muerte de la larva.

En la pagina 32 se señalan los lepidopteros que son mejor combatidos con *Bacillus thuringiensis*.

Figura 3. Mecanismo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. (12)



Principales Lepidópteros bien combatidos con *Bacillus thuringiensis*: (8)

Principales Lepidopteros bien combatidos:

<i>Thaumatopea pytiocampa</i>	Procesionaria del pino
<i>Lymantria dispar</i>	Lagarta de la encina
<i>Tortrix viridana</i>	Lagarta pequeña
<i>Anagasta (Ephesia kühniella)</i>	Palomilla de la harina
<i>Plutella maculipennis</i>	Polilla de la col
<i>Pieris sp.</i>	Mariposas de la crucíferas
<i>Aglaope infausta</i>	Orugueta del almendro
<i>Prays citrii</i>	Polilla de limonero
<i>Lobesia botrana</i>	Gusano de la uva
<i>Clysta ambiguella</i>	id.id.
<i>Pyrausta nubilalis</i>	Barrenador del maíz
<i>Sesamia venteria</i>	id.id.
<i>Cacosciomorpha pronubana</i>	Cuca del clavel
<i>Collias eurhytheme</i>	
<i>Adoxophyes reticulana (Capua)</i>	
<i>Pandemis heparyana</i>	
<i>Alabama argillacea</i>	Curuqueré. Gusano Alabama
<i>Bucculatrix turbeniella</i>	
<i>Heliothis spp.</i>	Gusano cogollero. Gusano del jojoto
<i>Spodoptera spp.</i>	Gusano barredor
<i>Trichoplusia ni</i>	Gusano medidor
<i>Operopthera brumata</i>	Oruga verde de los frutales
( <i>Cheimatobia</i> )	
<i>Manduca sexta (protoparce)</i>	Cachudo

## Capítulo 3. Primera parte experimental

### ❖ Hipótesis

### ❖ Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

Técnica

Resultados

### ❖ Identificación de *Bacillus thuringiensis*

Pruebas

Resultados

### 3.1. Hipótesis

Dado que *Bacillus thuringiensis*, es una bacteria entomopatógena para insectos plaga que se encuentran libres en la naturaleza, es factible su aislamiento a partir de insectos muertos que se encuentran en tierras agrícolas o silos (bodegas de almacenamientos de granos).

### 3.2. Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

#### I. Muestreo de insectos

##### **Material y equipo:**

- Frascos de vidrio grandes
- Mortero con pistilo
- Pipeta graduada de 1.0mL
- Sobres de papel encerado pequeños
- Tubos de plástico 2.5mL
- Horno de calentamiento (marca Termolyne Oven, serie 9000)
- Balanza semianalítica (marca Mettler PC 2000)

##### **Método y resultados.**

- a) Obtener muestras de insectos para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*, reportando el lugar de recolección, fecha y tipo de insecto.

De este primer paso se obtuvieron las siguientes muestras:

1. Insecto: Parásitos dípteros de mazorca de maíz
Lugar: Silos de la Universidad de Chapingo
Fecha: 28 de Junio de 1997
2. Insecto: Parásitos dípteros de frijol
Lugar: Almacén de una casa habitación
Fecha: 30 de Junio de 1997
3. Insecto: Gusanos parásitos de elote
Lugar: Tlaltizapan Morelos, tierras agrícolas
Fecha: 02 de Agosto de 1997

b) Preparar las muestras de la siguiente manera:

- Se secan en un horno, cada una de las muestras obtenidas a una temperatura de 120°C por 30 minutos.
- Se maceran cada una de las muestras por separado, se pesa o mide una porción definida de las muestras para su estudio y se les asigna una clave.

Asignación de claves y pesado del macerado de cada una de las muestras:

Clave	Cantidad para cultivo	Muestra
A	0.50 g (2 muestras de)	Insecto: Parásitos dipteros de elote
B	0.25 g (2 muestras de)	Insecto: Parásitos dipteros de frijol
C	0.50 mL (1 muestra de)	Insecto: Gusanos parásitos de elote

Nota: En el caso de las muestras de gusanos parásitos de elote, estos no se secaron sino que se obtuvo un líquido.



## II. Cultivo de muestras

### **Material y equipo.**

- ◆ Bata, guantes y cubrebocas
- ◆ Cajas de petri
- ◆ Gradilla
- ◆ Guantes de asbesto
- ◆ Matraz erlenmeyer con tapón de baquelita de 500mL
- ◆ Matraz volumétrico de 100mL
- ◆ Mechero bunsen
- ◆ Mechero fisher
- ◆ Pipetas graduadas de 5.0mL
- ◆ Rejilla de asbesto
- ◆ Tripie
- ◆ Tubos de ensayo de 13 x 100
- ◆ Vaso de precipitados de 100mL
- ◆ Vaso de precipitados de 250mL
- ◆ Incubadora (marca Riossa, modelo EC, serie ECML)
- ◆ Olla exprés de acero inoxidable (marca Presto de 21 L con manómetro)

### **Soluciones.**

- ◆ Solución salina al 0.85 %

### **Medio de cultivo.**

- ◆ Agar soya tripticaseína (marca Bioxon, lote 06B10871/01FEB01)

### Método y resultados.

a) La muestra pesada o medida, se diluye en una serie de 6 tubos de ensaye hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  en el tubo final (Ver ejemplo en el esquema).

Nota. Se desecha del ultimo tubo el volumen determinado (0.5mL) para que no interfiera con la concentración deseada.

b) A continuación se preparan 6 caja de petri, con una oblea de agar preformada (Agar Soya Trypticaseína =AST) y se marcan o identifican con la dilución respectiva de la muestra.

c) Se vierte en cada una de las cajas 1mL de cada una de las diluciones de la muestra, se mezcla perfectamente y se agrega una segunda capa muy delgada del agar.

d) Después de solidificar, se incuba a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

Figura 4. Esquema para la siembra de muestras sólidas por dilución en placas.

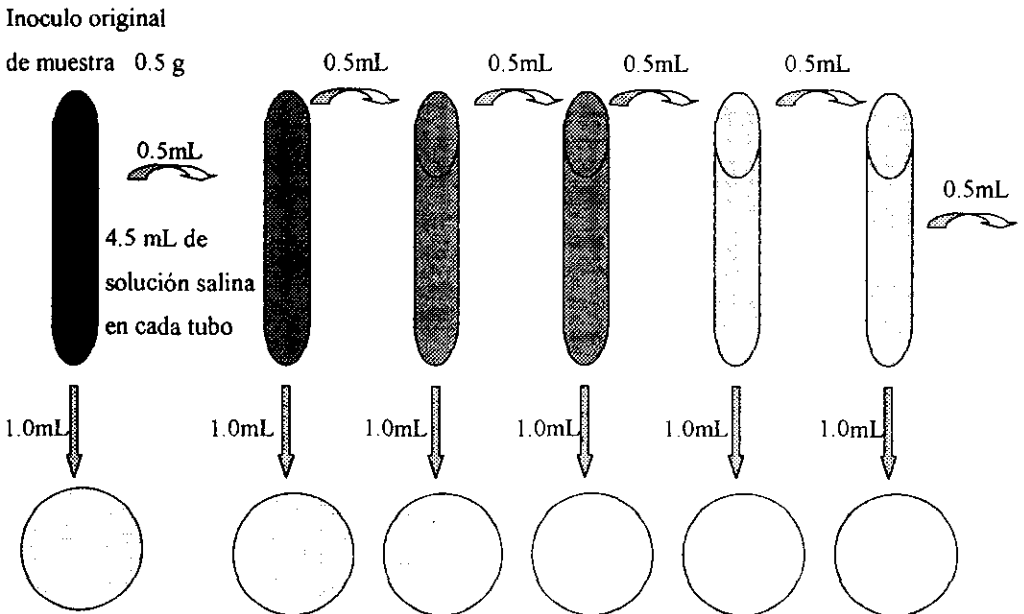


Tabla 3. Resultados después de las 48 horas de incubación.

Clave	Observaciones
<b>A</b>	Existió crecimiento de diversas colonias en cada una de las 6 diluciones, se elige para trabajar la dilución de $1 \times 10^{-3}$ por contar con 4 tipos coloniales diferentes y separados susceptibles para su aislamiento, además de contar con la morfología colonial requerida y presentar morfología microscópica bacilar, presuntamente.
<b>B</b>	Existe crecimiento de colonias bacterianas sólo en diluciones $1 \times 10^{-1}$ , $1 \times 10^{-2}$ y $1 \times 10^{-4}$ . Se eligen 3 colonias sospechosas para su resiembra de la dilución $1 \times 10^{-1}$ .
<b>C</b>	Se elige dilución $1 \times 10^{-5}$ por contar con 3 tipos de colonias bacterianas sospechosas de <i>Bacillus</i> .

- e) Se procede a la purificación y aislamiento de cada una de las colonias sospechosas, para detectar la posible presencia de *Bacillus thuringiensis*.

### III. Purificación y aislamiento

#### **Material y equipo.**

- ◆ Asa bacteriológica para siembra
- ◆ Bata, guantes y cubrebocas
- ◆ Cajas de petri
- ◆ Guantes de asbesto
- ◆ Matraz erlenmeyer con tapón de baquelita de 500mL
- ◆ Mechero bunsen
- ◆ Mechero fisher
- ◆ Microscopio
- ◆ Portaobjetos y cubreobjetos para tinciones
- ◆ Rejilla de asbesto
- ◆ Tripie
- ◆ Vaso de precipitados de 250mL
- ◆ Incubadora (marca Riossa, modelo EC, serie EMCL)
- ◆ Olla exprés de acero inoxidable (marca Presto de 21 L con manómetro)

#### **Reactivos e Indicadores**

- ◆ Alcohol-acetona
- ◆ Cristal violeta
- ◆ Lugol
- ◆ Safranina

#### **Medio de cultivo**

- ◆ Agar soya tripticaseína (marca Bioxon, lote 06B10871/01FEB01)

#### **Método y resultados**

- a) De cada una de las muestras se procede a realizar la resiembra de las colonias sospechosas, con asa bacteriológica sobre medio de cultivo AST, en cajas de petri, incubación a 35°C por 24 horas, para poder lograr un mejor aislamiento y purificación de esas colonias sospechosas.

Tabla 4. Resultados de la resiembra de las colonias sospechosas.

Clave	Colonia	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
A	e	Tamaño de la colonia: 0.4 – 0.6 cm Consistencia: cremosa Borde: irregular Elevación: plana Color: beige Luz reflejada: opaca Luz transmitida: opaca Se elige para su purificación por contar con morfología macroscópica y microscópica cercana a la buscada para <i>Bacillus thurigiensis</i> .	Bacilos Gram positivos
	x	Tamaño de la colonia: 0.7 – 1.0 cm Consistencia: cremosa Borde: irregular Elevación: plana Color: beige Luz reflejada: opaca Luz transmitida: opaca Se elige para su purificación por contar con morfología macroscópica y microscópica cercana a la buscada para <i>Bacillus thurigiensis</i> .	Bacilos Gram positivos

Sigue tabla 4. Resultados de la resiembra de las colonias sospechosas.

Clave	Colonia	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
B	f	Tamaño de la colonia: 1.0 – 1.5 cm Consistencia: mucoide Borde: irregular Elevación: convexa Color: beige Luz reflejada: brillante Luz transmitida: opaca Colonias de apariencia húmeda, se descarta por morfología microscópica.	Cocos Gram positivos
	g	Tamaño de la colonia: 0.2 – 0.3 cm Consistencia: cremosa Borde: irregular Elevación: plana Color: blanquecino Luz reflejada: brillante Luz transmitida: opaca Colonia contaminada, se descarta por morfología microscópica.	Mezcla de Bacilos largos Gram positivos, y Bastones cortos Gram positivos
	h	Tamaño de la colonia: 0.2 – 0.5 cm Consistencia: cremosa Borde: regular, colonias redondas Elevación: umbonadas Color: beige Luz reflejada: brillante Luz transmitida: opaca Se descarta por morfología macroscópica.	Bastones cortos Gram positivos

Sigue tabla 4. Resultados de la resiembra de las colonias sospechosas.

Clave	Colonia	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
C	m	Tamaño de la colonia: 0.2 – 0.3 cm Consistencia: cremosa Borde: regular, colonias redondas Elevación: convexa Color: beige Luz reflejada: opaca Luz transmitida: opaca Se descarta por morfología macroscópica y microscópica.	Cocos Gram positivos
	n	Tamaño de la colonia: 0.3 – 0.5 cm Consistencia: cremosa Borde: irregular Elevación: plana Color: blanquecino Luz reflejada: opaca Luz transmitida: opaca Se descarta por morfología macroscópica y microscópica.	Cocos Gram negativos
	o	Tamaño de la colonia: 0.2 – 0.3 cm Consistencia: cremosa Borde: regular, colonias redondas Elevación: convexa Color: beige Luz reflejada: opaca Luz transmitida: opaca Se descarta por morfología macroscópica y microscópica.	Cocos Gram positivos

- b) Las colonias elegidas para su purificación, se resiembran en tubos de agar inclinado AST, para su identificación bioquímica.

#### IV. Identificación presuntiva

##### **Material y equipo.**

- ◆ Asa bacteriológica para siembra
- ◆ Bata, guantes y cubrebocas
- ◆ Gradillas
- ◆ Guantes de asbesto
- ◆ Matraz erlenmeyer con tapón de baquelita de 500mL
- ◆ Mechero bunsen
- ◆ Mechero fisher
- ◆ Microscopio
- ◆ Rejilla de asbesto
- ◆ Tripie
- ◆ Tubos de ensaye de 13 x 100 y 18 x 150
- ◆ Vaso de precipitados de 250mL
- ◆ Incubadora (marca Riossa, modelo EC, serie ECML)
- ◆ Olla exprés de acero inoxidable (marca Presto de 21 L con manómetro)

##### **Medios de cultivo.**

- ◆ Agar soya tripticaseína (marca Bioxon, lote 06B1871/01FEB01)
- ◆ Caldo soya tripticaseína

##### **Pruebas bioquímicas**

- ◆ Almidón (Hidrólisis de)
- ◆ Caldo BHI, para crecimiento a 40°C
- ◆ Caldo para nitratos
- ◆ Caldo rojo fenol más carbohidratos: glucosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, salicina y xilosa. Un tipo de carbohidrato para cada tubo.
- ◆ Crecimiento en cloruro de sodio al 6%
- ◆ Gelatina (Hidrólisis de)
- ◆ Medio para Voges Proskauer
- ◆ MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)
- ◆ TSI (Agar hierro triple azúcar)
- ◆ Urea de Christensen



### Reactivos e indicadores.

- ◆ Acido sulfanilico
- ◆ Alfa naftilamina
- ◆ Alfa naftol
- ◆ Cloruro de sodio
- ◆ Hidróxido de potasio
- ◆ Reactivo de Kovac
- ◆ Rojo de metilo

### Método y resultados.

- a) Se someten a una batería de pruebas bioquímicas que identifican a *Bacillus thurigiensis*, las ahora cepas que fueron elegidas del aislamiento secundario por coincidir con las características morfológicas macroscópicas coloniales y microscópicas que las señalan como probables *Bacillus thurigiensis*.
- b) Las pruebas bioquímicas son inoculadas cada una con cada cepa obtenida, se incuban a 35°C y se realiza la lectura de sus resultados hasta las 20 horas.
- c) Después de leer los resultados, aquellas cepas que cumplan con un 70% de las características propias de *Bacillus thurigiensis*, son identificadas presuntivamente como dicha especie.
- d) Para control de los resultados, se someten a las mismas pruebas bioquímicas, dos cepas control de género y especie conocida, proporcionadas por el cepario de “Campo I de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (U.N.A.M.)” y los resultados de las pruebas bioquímicas para *Bacillus thurigiensis* fueron cotejados y comparados con los que se reportan en el manual Bergey, 12ª ed. 1989. (16)

Tabla 5. Identificación presuntiva, pruebas y resultados.

Prueba bioquímica	Resultados				
		Cepas elegidas Claves:		Cepas control *c.z.	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ae	Ax	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Formación de ácido a partir de:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	+	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	-
Manitol	-	+	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+
Salicina	-	+	-	-	+
Xilosa	-	-	-	-	-
Movilidad	+	-	+	+	-
Hidrólisis de:					
Almidón	+	-	+	+	-
Gelatina	+	+	+	+	+
Crecimiento en:					
Agar Urea de Christensen	+	-	+	-	-
Caldo nutritivo a 40°C	+	+	+	+	+
NaCl al 6%	+	-	-	-	-
Formación de Indol	-	-	-	-	-
TSI (Agar hierro triple azúcar)	A/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Prueba Voges – Proskauer a:					
pH < 6	+	-	-	-	+
pH > 7	-	+	-	-	+
Producción de nitratos	+	+	+	+	+

(+) Resultado reactivo ó positivo de la prueba

(-) Resultado negativo de la prueba

(A/A) Producción de ácido en la parte alta del tubo, y también en el fondo del tubo

(K/A) Producción de un alkali en la parte superior del tubo, y ácido en el fondo

\* Cotejar anexos pruebas bioquímicas para su interpretación

Ae y Ax Claves asignadas para las colonias elegidas presuntivamente como *Bacillus thuringiensis* (ver p 41) aislada a partir de insectos plaga dípteros de maíz.

\*c.z. Cepas control proporcionadas por el cepario de la F.E.S. Zaragoza U.N.A.M.

Se elige presuntivamente la cepa Ax por coincidir en un 83.33% con las pruebas para *Bacillus thuringiensis*, y por presentar esporas en la tinción para esporas con verde de malaquita. Se procede a su caracterización bioquímica para certificar se trata de *Bacillus thuringiensis*.

## **Capítulo 4. Caracterización Bioquímica de *Bacillus thuringiensis* (Segunda parte experimental)**

- ❖ ¿Qué es una caracterización bioquímica ?
- ❖ Caracterización bioquímica, parte experimental
  - Pruebas
  - Resultados
- ❖ Matriz en tablero de ajedrez
- ❖ Coeficientes de similitud

#### 4.1. ¿Qué es una caracterización bioquímica?

El término <caracterización bioquímica>, es quizá un término que no se encuentra definido en ningún diccionario o libro, pero que para nuestros fines de estudio significa ubicar y nombrar dentro de una familia y especie a una bacteria aislada de fuentes naturales (identificarla), con base a su comportamiento bioquímico, medido a través de una batería de pruebas bioquímicas .

La taxonomía es la teoría de la clasificación, nomenclatura y la identificación. Con base a esta materia es como nos inspiramos en el término de <caracterización bioquímica>, como una especie de taxonomía, en el particular caso de esta tesis como taxonomía bacteriana; sin embargo sin igualar los términos, pues el trabajo que se realiza en la taxonomía bacteriana implica muchos conocimiento y trabajo de laboratorio de alta calidad y reconocimiento.

La primera parte de este siglo fue testigo de avances notables en bioquímica, genética y otras áreas de la biología; sin embargo, la taxonomía avanzó lentamente por un camino azaroso y contribuyó poco a la biología como un todo. Hasta finales de la década de 1950 los taxa (*grupo de individuos de cualquier rango*) bacterianos aún se definían con base a unas cuantas características clave, y eran comunes los géneros heterogéneos mal definidos, con excepción de unas cuantas especies de importancia médica, la identificación de cultivos bacterianos aislados era casi imposible.

La llegada de la era de las computadoras, y por lo tanto de la capacidad de manejar grandes cantidades de información en forma rápida, significó un avance que revolucionó la metodología de la taxonomía bacteriana. Sneath introdujo el concepto de taxonomía numérica en 1957, y desde entonces se han dedicado diversas publicaciones con respecto a este tema.

La taxonomía numérica consiste en:

“El arreglo de los organismos de un grupo con base en el total de sus características, como resultado de métodos numéricos”

La taxonomía numérica requiere que se estudien el mayor número posible de aspectos (rasgos o caracteres) de la biología de los organismos, que se denominan unidades taxonómicas operacionales u OTU por sus siglas en inglés. En la tabla 6, se enlistan los principales caracteres usados en la taxonomía bacteriana.

Tabla 6. Caracteres usados en la taxonomía numérica de bacterias.

Categoría de la prueba	Prueba
Morfología de la colonia	Presencia de pigmentos no difusibles o difusibles, fluorescentes, no fluorescentes o luminosos. Tamaño y forma de la colonia (presencia de colonias en propagación)
Micromorfología	Tinción de Gram y reacciones de tinción ácido-resistentes. Presencia de cocos, bacilos, micelios, vainas. Tamaño celular. Estructuras de fijación. Presencia de gránulos intracelulares. Motilidad (flagelos polares o periféricos, o deslizantes). Pruebas de di o polimorfismo. Presencia de esporas.
Características de crecimiento	Presencia de anillo o túnica, o crecimiento turbio o floculento en caldo de cultivo. Aerobiosis o anaerobiosis Crecimiento de 0 a 10% (p/v) de cloruro de sodio. Requerimientos especiales para el crecimiento; por ejemplo: aminoácidos, vitaminas o iones metálicos.

Sigue tabla 6. Caracteres usados en la taxonomía numérica de bacterias.

Categoría de la prueba	Prueba
<b>Bioquímica</b>	<p><i>Metabolismo fermentador u oxidativo de la glucosa.</i></p> <p>Presencia de catalasas, oxidasa u otras enzimas.</p> <p>Capacidad para degradar moléculas complejas; por ejemplo: almidón, tributirina.</p> <p>Producción de ácido a partir de carbohidratos.</p> <p>Producción de indol y H<sub>2</sub>S.</p> <p>Prueba de rojo de metilo.</p> <p>Reducción de nitrato.</p> <p>Reacción de Voges-Proskauer.</p>
<b>Pruebas de inhibición</b>	<p>Presencia o ausencia de crecimiento en presencia de antibióticos, colorantes y otros compuestos inhibidores; por ejemplo: cianuro de potasio.</p>
<b>Utilización de compuestos como única fuente de carbono para energía y crecimiento</b>	<p>Presencia o ausencia de crecimiento en presencia de compuestos que contienen carbono; por ejemplo: alanina, fructuosa, maltosa, y citrato de sodio.</p>
<b>Serología</b>	<p>Presencia o ausencia de reacciones de aglutinación a antisueros específicos.</p>
<b>Quimiotaxonomía</b>	<p>Presencia o ausencia de componentes subcelulares; por ejemplo: ácidos micólicos y menaquinonas.</p>
<b>Genética molecular</b>	<p>Presencia de reacciones guanina + citosina específicas (G + C) del DNA.</p>
<b>Fagotipificación</b>	<p>Presencia de patrones especificados de tipificación de bacteriofagos.</p>

La taxonomía bacteriana también sigue una serie de pasos para efectuarse, y estos son:

1. Selección de la cepa, necesidad de cultivos puros.
2. Selección de la prueba, es decir la selección de los caracteres conocidos también como OTU, descritos en la tabla anterior. No existen normas inflexibles e invariables que regulen la elección de las pruebas (caracteres) a aplicar.
3. Registro de datos, resultados de las pruebas.
4. Captura de datos.
5. Sistemas de identificación: Análisis computarizado, matriz en tablero de ajedrez, comparación de porcentajes de similitud de las pruebas realizadas, algunas veces si se carece de estos sistemas, pueden utilizarse coeficientes matemáticos con valor de discriminación
6. Interpretación de resultados.

Con base en esta información podemos realizar la caracterización bioquímica de *Bacillus thuringiensis*, aislado a partir de insectos muertos, y para mayor validez se eligieron una serie de categorías de pruebas bioquímicas para comparar OTU (unidades taxonómicas operacionales) ó caracteres biológicos, que se ensayaron 35 veces cada una y se realizaron lecturas a las 18, 24, 48 y 72 horas de las mismas para certificar la confiabilidad del resultado.

## 4.2. Parte experimental

### Caracterización bioquímica

#### Material y equipo.

- ◆ Asa bacteriológica para siembra
- ◆ Bata, guantes y cubrebocas
- ◆ Gradillas
- ◆ Guantes de asbesto
- ◆ Matraz erlenmeyer con tapón de baquelita de 500mL
- ◆ Mechero bunsen
- ◆ Mechero fisher
- ◆ Microscopio
- ◆ Rejilla de asbesto
- ◆ Tripie
- ◆ Tubos de ensaye de 13 x 100 y 18 x 150
- ◆ Vaso de precipitados de 250mL
- ◆ Incubadora (marca Riossa, modelo EC, serie ECML)
- ◆ Olla exprés de acero inoxidable (marca Presto de 21 L con manómetro)

#### Medios de cultivo.

- ◆ Agar soya tripticaseína (marca Bioxon, lote 06B1871/01FEB01)
- ◆ Caldo soya tripticaseína

#### Pruebas bioquímicas

- ◆ Almidón (Hidrólisis de)
- ◆ Caldo BHI, para crecimiento a 40°C
- ◆ Caldo para nitratos
- ◆ Caldo rojo fenol más carbohidratos: glucosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, salicina y xilosa
- ◆ Crecimiento en cloruro de sodio al 6%
- ◆ Gelatina (Hidrólisis de)
- ◆ Medio para Voges Proskauer
- ◆ MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)
- ◆ TSI (Agar hierro triple azúcar)
- ◆ Urea de Christensen

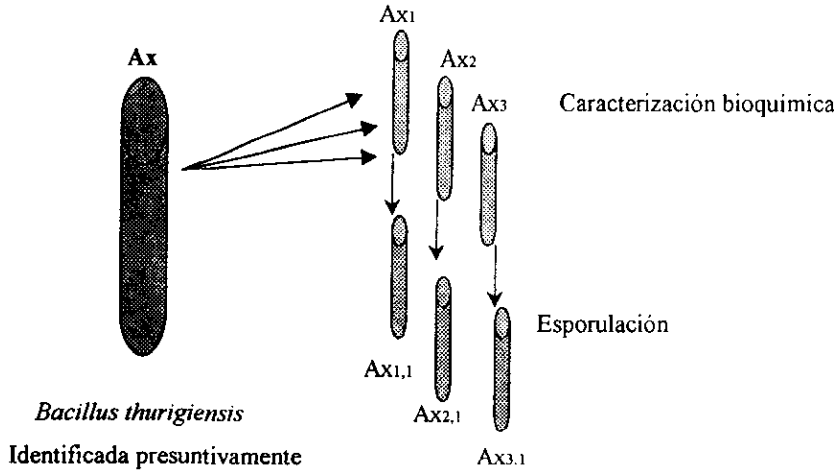


### **Reactivos e indicadores.**

- ◆ Acido sulfanilico
- ◆ Alfa naftilamina
- ◆ Alfa naftol
- ◆ Cloruro de sodio
- ◆ Hidróxido de potasio
- ◆ Reactivo de Kovac
- ◆ Rojo de metilo

## Método y resultados.

- a) La cepa identificada como *Bacillus thuringiensis*, es resembrada y genera seis nuevas resiembras, de las cuales tres de ellas son sometidas a las mismas pruebas bioquímicas utilizadas para su identificación, pero en un rango de 35 ensayos cada una.



- b) Los resultados serán leídos a las 18, 24, 48 y 72 horas de incubación, en las pruebas que así sea posible, a una temperatura de 35°C.

### Nota.

1. Por la cantidad de pruebas a realizar, se generan cultivos en caldo nutritivo de soya tripticaseína, saturados de bacteria, es decir con una alta concentración de la misma, colocando una asada abundante del microorganismo en 20 mL del caldo por 24 horas a 35°C. A continuación se les agrego a las pruebas bioquímicas en caldo un inóculo de 0.4 mL de cultivo de esta proliferación de bacterias, siguiendo las condiciones establecidas en el inciso anterior.
2. Para las pruebas sólidas y semisólidas, se realizan 4 resiembras de la cepa original (resiembra asignada de la cepa madre aislada de *Bacillus thuringiensis*).

- c) Después de obtenidos los resultados, se realiza una matriz en tablero de ajedrez para sacar la conclusión de los resultados, en base a los porcentajes obtenidos de los 35 ensayos de cada prueba.
- d) También se calculan coeficientes matemáticos para la discriminación y similitud de resultados.
- e) Las tres cepas restantes son utilizadas para la cuantificación de esporas.

### 4.3. Matriz en tablero de ajedrez

Este sistema de identificación, consiste en un cuadro de identificación global ideado por Farmer et. al 1985, para ser usado en los CDC (Center of Disease Control) de Estados Unidos con el objeto de identificar todas las especies, biogrupos y grupos entéricos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Consiste en una matriz grande con características bioquímicas para géneros y especies, los cuadros que se intercepten, tienen un porcentaje resultados de la repetición (ensayo) de una prueba bioquímica, para una bacteria en cuestión, los resultados anotados sólo son positivos ó reactivos para cada característica bioquímica evaluada.

De acuerdo con este tablero, una reacción se considera positiva si el 90% o más de los resultados es reactivo, negativa si el 10% o menos de los resultados reaccionan o no producen la característica evaluada y variable (v) si un 11-89% de los resultados son positivos o reactivos.

La capacidad para determinar las reacciones positivas o negativas para las diversas características evaluadas en este tipo de sistema de identificación da como resultado un alto grado de exactitud diagnóstica. La principal desventaja de la matriz en tablero de ajedrez es lo tedioso de comparar punto por punto los diversos resultados de las repeticiones que se manejen.

## RESULTADOS.

Tabla 7. Matriz en tablero de ajedrez, con los porcentajes de resultados positivos (+) y reactivos de las pruebas bioquímicas seleccionadas para *Bacillus thurigiensis*, para las resiembras de la cepa AX: Ax1.

Prueba	<i>Bacillus thurigiensis</i>	Cepa Ax1 (Primera resiembra)				Conclusión la prueba es: (+) positiva (-) negativa (v) variable.
Formación de ácido a partir de:	Comportamiento de acuerdo al manual Bergey 12ª ed.	18 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
Glucosa	+	97.14%	97.14%	97.14%	97.14%	+
Lactosa	-	0%	0%	14.29%	14.29%	V
Maltosa	+	96.97%	96.97%	96.97%	96.97%	+
Manitol	-	0%	0%	0%	0%	-
Sacarosa	+	100%	100%	100%	100%	+
Salicina	-	0%	0%	0%	0%	-
Xilosa	-	0%	0%	0%	0%	-
Movilidad	+	100%	100%	100%	100%	+
Hidrólisis de:						
Almidón	+				100%	+
Gelatina	+				100%	+
Crecimiento en:						
Agar Urea de Christensen	+			94.28%	94.28%	+
Caldo nutritivo a 40°C	+	100%	100%	100%	100%	+
NaCl al 6%	+	100%	100%	100%	100%	+
Formación de Indol	-				0%	-
TSI (Agar hierro triple azúcar)	A / A	0% / 100%	0% / 100%	0% / 100%	0% / 100%	- / + K / A
Prueba Voges Proskauer a:	-					
pH < 6	+				100%	+
pH > 7	-				0%	-
Producción de nitratos	+		91.43%			+

(+) Resultado reactivo ó positivo de la prueba

(-) Resultado negativo de la prueba

(A/A) Producción de ácido en la parte alta del tubo, y también en el fondo del tubo

(K/A) Producción de un alkali en la parte superior del tubo, y ácido en el fondo

\* Cotejar anexos pruebas bioquímicas para su interpretación

Tabla 8. Matriz en tablero de ajedrez, con los porcentajes de resultados positivos (+) y reactivos de las pruebas bioquímicas seleccionadas para *Bacillus thuringiensis*, para las resiembras de la cepa AX: Ax2.

Prueba	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cepa Ax2 (Segunda resiembra)				Conclusión la prueba es: (+) positiva (-) negativa (v) variable.
		18 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
Formación de ácido a partir de:	Comportamiento de acuerdo al manual Bergey 12ª ed.					
Glucosa	+	80.0%	80.0%	85.70%	85.70%	V
Lactosa	-	0%	0%	14.29%	14.29%	V
Maltosa	+	100%	100%	100%	100%	+
Manitol	-	0%	0%	0%	0%	-
Sacarosa	+	100%	100%	100%	100%	+
Salicina	-	0%	0%	0%	0%	-
Xilosa	-	0%	0%	0%	0%	-
Movilidad	+	100%	100%	100%	100%	+
Hidrólisis de:						
Almidón	+				100%	+
Gelatina	+				100%	+
Crecimiento en:						
Agar Urea de Christensen	+			100%	100%	+
Caldo nutritivo a 40°C	+	100%	100%	100%	100%	+
NaCl al 6%	+	100%	100%	100%	100%	+
Formación de Indol	-				0%	-
TSI (Agar hierro triple azúcar)	A / A	0% / 100%	0% / 100%	0% / 100%	0% / 100%	- / + K / A
Prueba Voges Proskauer a:	-					
pH < 6	+				100%	+
pH > 7	-				0%	-
Producción de nitratos	+		100%			+

(+) Resultado reactivo ó positivo de la prueba

(-) Resultado negativo de la prueba

(A/A) Producción de ácido en la parte alta del tubo, y también en el fondo del tubo

(K/A) Producción de un alkali en la parte superior del tubo, y ácido en el fondo

\* Cotejar anexos pruebas bioquímicas para su interpretación

Tabla 9. Matriz en tablero de ajedrez, con los porcentajes de resultados positivos (+) y reactivos de las pruebas bioquímicas seleccionadas para *Bacillus thuringiensis*, para las resiembras de la cepa AX: Ax3.

Prueba	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cepa Ax3 (Tercera resiembra)				Conclusión la prueba es: (+) positiva (-) negativa (v) variable.
		18 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
Formación de ácido a partir de:	Comportamiento de acuerdo al manual Bergey 12ª ed.					
Glucosa	+	97.14%	97.14%	97.14%	97.14%	+
Lactosa	-	0%	0%	0%	0%	-
Maltosa	+	100%	100%	100%	100%	+
Manitol	-	0%	0%	0%	0%	-
Sacarosa	+	100%	100%	100%	100%	+
Salicina	-	0%	0%	0%	0%	-
Xilosa	-	0%	0%	0%	0%	-
Movilidad	+	100%	100%	100%	100%	+
Hidrólisis de:						
Almidón	+				100%	+
Gelatina	+				100%	+
Crecimiento en:						
Agar Urea de Christensen	+			94.28%	94.28%	+
Caldo nutritivo a 40°C	+	100%	100%	100%	100%	+
NaCl al 6%	+	100%	100%	100%	100%	+
Formación de Índol	-				0%	-
TSI (Agar hierro triple azúcar)	A / A	0% / 100%	0% / 100%	0% / 100%	0% / 100%	- / + K / A
Prueba Voges Proskauer a:						
pH < 6	+				100%	+
pH > 7	-				0%	-
Producción de nitratos	+		100%			+

(+) Resultado reactivo ó positivo de la prueba

(-) Resultado negativo de la prueba

(A/A) Producción de ácido en la parte alta del tubo, y también en el fondo del tubo

(K/A) Producción de un alkali en la parte superior del tubo, y ácido en el fondo

\* Cotejar anexos pruebas bioquímicas para su interpretación

#### 4.4. Coeficientes de similitud

Sólo pocos de los muchos métodos posibles para medir valores de similitud son de uso rutinario en bacteriología, las formulas de algunos métodos potencialmente útiles son conocidas como "coeficientes de valor discriminatorio para microbiología", de estos métodos, son dos los que se utilizan en la mayoría de las publicaciones relacionadas con estudios de taxonomía numérica de bacterias (según Austin y Priest, 1992) a saber los coeficientes de Asociación simple y Jaccard.

Coeficiente	Abreviatura	Fórmula
Asociación simple	$S_{SM}$	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$
Jaccard (Descuenta los apareamientos negativos)	$S_J$	$\frac{a}{a + b + c}$

De manera sencilla estos coeficientes miden las relaciones entre pares de OTU y se diseñaron pensando en diversas disciplinas, como botánica, paleontología etc. Se observa que las formulas se basan en un grupo de simbolos: a, b, c, d. Estos simbolos corresponden a la cantidad de apareamientos positivos (a) y negativos (d), así como la cantidad de resultados diferentes (b, c) entre un par de OTU.



Así para la caracterización bioquímica realizada del aislamiento de *Bacillus thuringiensis* a partir de insectos muertos colectados en silos, nosotros podemos expresar este par de OTU, como los resultados, que tenemos de la batería de pruebas bioquímicas para *Bacillus thuringiensis* extraída del manual Bergey y que son nuestra referencia especial para la identificación de *Bacillus thuringiensis*, con los resultados obtenidos de los 35 ensayos realizados a las tres resiembras de la cepa obtenida del aislamiento, es decir:

		Resultados para OTU1 (Referencia del manual Bergey)	
		+	-
Resultados para OTU2	+	a	b
(Ensayos probados de la cepa aislada)	-	c	d

Con esta relación nosotros podemos calcular numéricamente el rango de similitud de la cepa aislada con la referencia bibliográfica, y validar una vez más que la bacteria aislada es *Bacillus thuringiensis*. La escala de valores con este coeficiente variará entre “cero”, para la diferencia total, a “uno” para la similitud total entre pares de OTU.

Resultados referencia bibliográfica, manual Bergey	+	-	+	-
Resultados cepa aislada de <i>Bacillus thuringiensis</i>	+	-	-	+
	a	d	c	b

De acuerdo con la conclusión en los resultados obtenidos por el sistema de identificación de matriz de ajedrez tenemos:

Pruebas o caracteres bioquímicos elegidos (19)	Resultados cepa de referencia, manual Bergey <i>Bacillus thuringiensis</i>	Resultados obtenidos de las cepas aisladas		
		Cepa Ax1	Cepa Ax2	Cepa Ax3
<b>Formación de ácido a partir de:</b>				
Glucosa	+	+	V	+
Lactosa	-	V	V	-
Maltosa	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-
<b>Movilidad</b>	+	+	+	+
<b>Hidrólisis de:</b>				
Almidón	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+
<b>Crecimiento en:</b>				
Agar Urea de Christensen	+	+	+	+
Caldo nutritivo a 40°C	+	+	+	+
NaCl al 6%	+	+	+	+
<b>Formación de Indol</b>	-	-	-	-
<b>TSI (Agar hierro triple azúcar)</b>	(A / A) +/+	-/+	-/+	-/+
<b>Prueba Voges – Proskauer a:</b>				
pH < 6	+	+	+	+
pH > 7	-	-	-	-
<b>Producción de nitratos</b>	+	+	+	+

(+ ) Resultado reactivo ó positivo de la prueba

( - ) Resultado negativo de la prueba

(A/A) Producción de ácido en la parte alta del tubo, y también en el fondo del tubo

(K/A) Producción de un alkali en la parte superior del tubo, y ácido en el fondo

\* Cotejar anexos pruebas bioquímicas para su interpretación

Totales para el cálculo de similitud:

Numero de pruebas 19

Símbolo	Cepa Ax1	Cepa Ax2	Cepa Ax3
a	12 coincidentes +/+	11 coincidentes +/+	12 coincidentes +/+
d	5 coincidentes -/-	5 coincidentes -/-	6 coincidentes -/-
c	1 no coincidente +/-	1 no coincidente +/-	1 no coincidente +/-
b	0 no coincidentes -/+	0 no coincidentes -/+	0 no coincidentes -/+

Sustitución de resultados en los coeficientes:

Cepa Ax1

$$S_{SM} = \frac{12 + 5}{12 + 5 + 1 + 0}$$

$$S_{SM} = "0.9444"$$

$$S_J = \frac{12}{12 + 0 + 1}$$

$$S_J = "0.9230"$$

Cepa Ax2

$$S_{SM} = \frac{11 + 5}{11 + 5 + 1 + 0}$$

$$S_{SM} = "0.9411"$$

$$S_J = \frac{11}{11 + 0 + 1}$$

$$S_J = "0.9166"$$

Cepa Ax3

$$S_{SM} = \frac{12 + 6}{12 + 6 + 1 + 0}$$

$$S_{SM} = "0.9473"$$

$$S_J = \frac{12}{12 + 0 + 1}$$

$$S_J = "0.9230"$$

## Capítulo 5. Esporulación de *Bacillus thuringiensis* (Tercera parte experimental)

- Proceso de esporulación de *Bacillus thuringiensis*
- Esporulación :
  - Técnica
  - Resultados

## 5.1. Proceso de esporulación de *Bacillus thuringiensis*

La respuesta de diversos microorganismos, entre ellos las bacterias, cuando se hallan ante condiciones desfavorables desde el punto de vista atmosférico y nutritivo principalmente, es la formación de estructuras muy resistentes que funcionan como semillas conocidas como: esporas.

Las bacterias vegetativas del género *Bacillus*, cuando se encuentran en condiciones desfavorables, producen intracelularmente una spora que después se separa de la célula. Una endospora bacteriana es un compacto de supervivencia sumamente eficaz, ya que es hasta diez mil veces más resistente al calor que la célula vegetativa y hasta cien veces más resistente a la radiación ultravioleta. En ausencia de nutrientes puede sobrevivir durante años y posiblemente durante siglos.

### Estructura de la spora

La spora de *Bacillus thuringiensis*, es del todo similar a cualquier spora bacteriana, esta constituida de los siguientes elementos:

- ◆ **Protoplasma.** El protoplasma de la spora, que a veces se denomina núcleo, contiene unas macromoléculas, como ADN, ARN y enzimas, que se hallan también en el protoplasma de las células vegetativas. El interés de estos polímeros de protoplasma de la endospora bacteriana se centra principalmente en su resistencia al calor y a la radiación, es característica esta relacionada a la presencia del ácido dipicolínico, que es un energético agente quelante y que se encuentra formando un complejo con los iones calcio, este ácido puede constituir más del 10% del peso seco de la spora.
- ◆ **Corteza.** Rodeando el protoplasma de la spora se encuentra una rígida estructura llamada corteza. La rigidez y protección que tiene la corteza de la spora y que la diferencia de la pared celular de la bacteria es la presencia de un peptidoglucano, constituido por una lactama del ácido murámico que tiene uniones con restos de ácido

diaminopimélico, que a su vez esta sustituido por restos de L-alanina, otra diferencia con la pared celular de la bacteria.

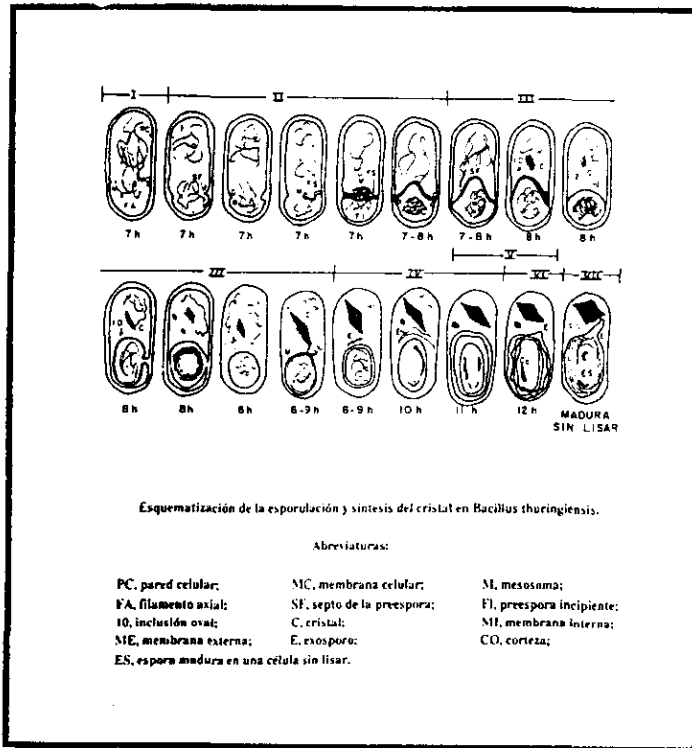
- ◆ Cubiertas. Alrededor de la corteza hay unas capas , que forman la cubierta de las espora, están constituidas por polipéptidos excepcionalmente ricos en restos de cisteina. La presencia de dichas proteínas en la cubierta exterior de la espora puede serla responsable de las propiedades hidrófobas de las endosporas bacterianas.

#### Proceso de formación de la espora y aparición del cuerpo para esporal ( $\delta$ -endotoxina)

Para el estudio de la formación de las endosporas, se ha designado seis estadios de diferente tiempo de duración y donde se suceden distintos cambios bioquímicos hasta la formación completa de la espora.

- ◆ Estadio I. (7 horas para *Bacillus thuringiensis*), comienza la renovación de las proteínas de la célula y la excreción de enzimas amilasa, proteasa y ribosidasa (formación de un filamento axial).
- ◆ Estadio II. (7-8 horas), se caracteriza por la formación del septo de la espora, durante este estadio se separan los cromosomas, yendo uno de ellos hacia uno de los extremos de la célula, donde queda incluido en un compartimento formado por la invaginación de la membrana plasmática. También se sintetiza la alanina deshidrogenasa.
- ◆ Estadio III. (8-9 horas), aparece en la célula un protoplasma esporal reconocible, este protoplasma lo forma la membrana plasmática al dilatarse desde el punto en que esta adherida al septo hasta el polo de la célula. Durante el estadio III se sintetizan: enzimas del ciclo ATC y del ciclo glioxilato, junto con la catalasa y la fofatasa alcalina, y aparece el cristal paraesporal o cristal proteico o cristal tóxico o  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, que ya ha sido descrito en las propiedades tóxicas del mismo.
- ◆ Del estadio IV al VI (9-12 horas), se completa la maduración de la espora con la formación de la corteza y cubiertas esporales.

Figura 2. Diagrama esquemático de la esporulación de *Bacillus thuringiensis*. (4)



## 5.2. Esporulaci3n

### M3todo.

- a) De la resiembra de la cepa elegida presuntivamente como *Bacillus thurigiensis*, se designar3n tres tubos o cepas para el proceso de esporulaci3n, estas cepas contenidas en tubos de agar inclinado, se mantienen en refrigeraci3n a 4°C, durante 5 meses.
- b) Al cabo de este t3rmino se realiza tinci3n para esporas de cada cepa y se realiza la cuenta de c3lulas y esporas de acuerdo a la siguiente formula.

$$\text{Indice de esporulaci3n} = \frac{\text{N3mero de esporas (endo 3 exo)}}{\text{Total contado de esporas exo + Bacterias contadas con o sin esporas}} \times 100$$

### Resultados.

Cepa Ax1.1

Bacterias contadas con y sin espora: 120

Esporas ex3genas contadas: 23

Espora ex3genas y endogenas: 103

$$\text{Indice de esporulaci3n} = \frac{103}{23 + 120} \times 100$$

Indice de esporulaci3n = 72.02 %



Cepa Ax2,1

Bacterias contadas con y sin espora: 93

Esporas exógenas contadas: 15

Espora exógenas y endogenas: 92

$$\text{Indice de esporulación} = \frac{92}{15 + 93} \times 100$$

$$\text{Indice de esporulación} = 85.18 \%$$

Cepa Ax3,1

Bacterias contadas con y sin espora: 93

Esporas exógenas contadas: 19

Espora exógenas y endogenas: 109

$$\text{Indice de esporulación} = \frac{109}{19 + 93} \times 100$$

$$\text{Indice de esporulación} = 97.32\%$$

### 5.3. Identificación del cuerpo paraesporal

Como se ha mencionado durante los primeros capítulos, la importancia bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis*, es principalmente proporcionada por el cuerpo paraesporal que aparece durante el estadio III de la esporulación, que también es llamado cristal proteico o cristal tóxico o  $\delta$ -endotoxina, al aparecer durante la fase de esporulación se puede aprovechar su identificación como la prueba contundente de que la cepa que se este estudiando se trata de *Bacillus thuringiensis* .

La identificación de este cuerpo se logra mediante la observación al microscopio (a 100x) de una tinción de esporas con verde de malaquita o inclusive una tinción de gram, el cuerpo paraesporal es fácilmente teñible por tratarse de una proteína y además identificable por su forma y tamaño respecto a la espora de la bacteria. En la tinción con verde de malaquita se observa de color rojo por la safranina y en la tinción de gram se observan de color azul oscuro. Para ver técnica y fundamento de las tinciones ir a la parte dos de los anexos con este nombre.

Cabe hacer señalar que esta identificación se puede realizar por medios microscópicos más sofisticados, pero por circunstancias propias del proyecto sólo nos basamos en estas tinciones. Los resultados obtenidos al microscopio fueron una serie de fotografías, que están colocadas en la parte 4 de los anexos, página 89, donde se señala a la bacteria y el cristal, lamentablemente las tomas se hicieron a sólo 1000x aumentos, por lo que tomamos como referencia otras fotografías con mayor aumento para compararlas.

**ANALISIS DE RESULTADOS  
(PARTE EXPERIMENTAL)**

## ANALISIS DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el proyecto fueron totalmente satisfactorios, gracias al conocimiento de la naturaleza de *Bacillus thuringiensis*, esta bacteria logro ser aislada de un insecto plaga muerto, aunque el agar utilizado fue un agar nutritivo que no llevo ningún antibiótico inhibitorio, no fue limite para la obtención del bacilo. En esta primera parte del proyecto, resulto interesante la cantidad de colonias bacterianas que se encontraron infectando a los diversos insectos, que eran no sólo de un tipo bacteriano sino de varios (bacilos, cocos, cocobacilos). Posteriormente en la resiembra de las colonias sospechosas se obtuvieron resultados más claros y con la ayuda de la morfología microscópica y las tinciones de Gram, se simplifico el trabajo a dos tipos bacterianos que parecian ser *Bacillus thuringiensis*: cepas Ae y Ax provenientes ambas de los parásitos dípteros de elote. Esta conclusión fue realizada después de sembrar las seis diluciones respectivas de los tres insectos muestreados, aunque no en la primera siembra, pues existieron problemas con las temperaturas de incubación lo que originó que en más de una ocasión se repitieran las siembras.

Gracias al comportamiento bioquímico de las bacterias (pruebas bioquímicas), se pudo dilucidar claramente que sólo una de las dos cepas: Ax podría identificarse presuntivamente como *Bacillus thuringiensis*, y después con la caracterización bioquímica confirmarlo certeramente.

Cabe señalar que la prueba más importante para diferenciar a *Bacillus thuringiensis* de *Bacillus cereus*, es la presencia del cuerpo paraesporal ó cristal proteico dentro de la célula durante el proceso de esporulación, este seguimiento se realizo aparte, por el tiempo que dimos a la bacteria para esporular, manteniendo tres resiembras de la cepa elegida presuntivamente como *Bacillus thuringiensis* en refrigeración para estimular el mayor tiempo posible su esporulación y con ello la presencia del cristal.

Con respecto a los resultados de las pruebas bioquímicas en los diferentes ensayos realizados, se encontraron resultados muy interesantes, como la producción de ácido a partir de diversos carbohidratos, en esta prueba vislumbramos que el comportamiento de la bacteria no fue el mismo en un 100%, sino que tuvo ligeras variables en tres carbohidratos principalmente: Glucosa , Lactosa y Maltosa, y además en la prueba de TSI (Agar Hierro Triple azúcar), la asimilación de los carbohidratos no fue la misma, pues mientras que en medio líquido se producía ácido, en base sólida no paso lo mismo, con estos detalles podemos dejar asentada la variabilidad bioquímica de una bacteria, qué es indudable su presencia con los cambios generacionales, es decir con subsiguientes resiembras.

Durante las pruebas realizadas en la caracterización bioquímica se repitieron “35” ensayos para cada uno de los “19” caracteres o pruebas bioquímicas elegidas para identificar a *Bacillus thurigiensis* donde el hecho antes planteado fue demostrado, pues se realizaron dichos ensayos en tres resiembras de la cepa originalmente elegida, es decir de Ax, surgieron Ax<sub>1</sub>, Ax<sub>2</sub> y Ax<sub>3</sub>, que dieron lugar a porcentajes en el tablero de ajedrez diferentes y de igual forma para los coeficientes de similitud.

Los resultados obtenidos de los numerosos ensayos fueron resumidos por medio de tablas que presentanan estos resultados en forma de porcentajes (tablero de ajedrez) donde se utilizo el siguiente criterio para ratificar se trataba de una cepa de *Bacillus thurigiensis*: una reacción se considera positiva si el 90% o más de los resultados es reactivo, negativa si el 10% o menos de los resultados reaccionan o no producen la característica evaluada y variable (v) si un 11-89% de los resultados son positivos o reactivos. Obtenida la conclusión del resultado fue fácil calcular los coeficientes de similitud de las tres cepas: Ax<sub>1</sub>, Ax<sub>2</sub> y Ax<sub>3</sub>, contra la referencia bibliográfica del manual Bergey 12<sup>a</sup> ed. (16), donde los resultados fueron muy satisfactorio, pues los coeficientes oscilaron entre 0.91 y 0.94, que si recordamos la similitud total es la obtención de coeficientes iguales a “1”.

Así de las tres cepas manejadas la cepa Ax3 fue la más cercana con un coeficiente de 0.9473, con respecto a la determinación del índice de esporulación, aunque el conteo al microscopio resulta algo difícil y pesado, se puede constatar por los porcentajes, que la refrigeración por un tiempo prolongado es un excelente método para inducir a este proceso, y también en este caso en particular de *Bacillus thuringiensis*, se observó la presencia de cuantiosos cristales proteicos, de forma semirectangular y romboide, una vez más prueba fehaciente de que se logró aislar esta bacteria de alto interés agrícola e industrial.

## Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados al inicio de esta tesis, podemos concluir, que se logró el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* de una fuente natural como lo son los insectos muertos, y que la metodología empleada, de acuerdo con los recursos con que cuenta la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", no fue una limitante para realizar un trabajo con excelentes frutos: se logró rescatar y dar la importancia que se merece a las características morfológicas y fisiológicas de un microorganismo, para logra identificarlo y ubicarlo dentro de un genero taxonómico de familia y especie (caracterización bioquímica). Así como también se cumplio con un objetivo más cercano a propiciar un sistema de elaboración de bioinsecticidas a partir de un simple hecho, la estimulación de la esporulación bacteriana con una metodología muy sencilla y a nivel de laboratorio basico como es la refrigeración por periodos prolongados de tiempo.

Todos los objetivos planteados fueron alcanzados satisfactoriamente.

## Capítulo 6. Biotecnología como parte del Manejo Integral de Plagas

- ❖ **Definición de Biotecnología**
- ❖ **Biotecnología en la elaboración de Bioinsecticidas**
- ❖ **Productos comerciales de *Bacillus thuringiensis***



## 6.1. Definición de Biotecnología

Biotecnología es:

“Cualquier técnica que utiliza seres vivos o parte de ellos, para hacer productos ó modificarlos, para mejorar plantas o animales o para desarrollar microorganismos para usos específicos”

“Es la actividad interdisciplinaria que se basa en la aplicación integrada de los conocimientos de la Biología Molecular, Bioquímica Genética, Microbiología e Ingeniería Bioquímica para la utilización de organismos, algunas de sus partes ó productos, en la obtención de bienes y servicios” (Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM, 1988)

Dentro de los objetivos planteados en esta tesis manejamos el hecho de que la cepa pura obtenida de *Bacillus thuringiensis* se trataría posiblemente en otros trabajos para llegar a la formulación del bioinsecticida, que no es tema a tratar del presente trabajo, sin embargo si es importante conocer el proceso básico para la elaboración de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis*.

La biotecnología ocupa un sitio de suma importancia en estos procesos, pues como se defino anteriormente la biotecnología es la ciencia que se encarga de la búsqueda de las diversas técnicas encaminadas a recuperar y transformar seres vivos o sus productos que tiene propiedades especificas de mucha ayuda al ser humano, como es el caso de los bioinsecticidas, que en el primer capitulo se describió su definición, características y ventajas.

## 6.2. Biotecnología en la elaboración de Bioinsecticidas

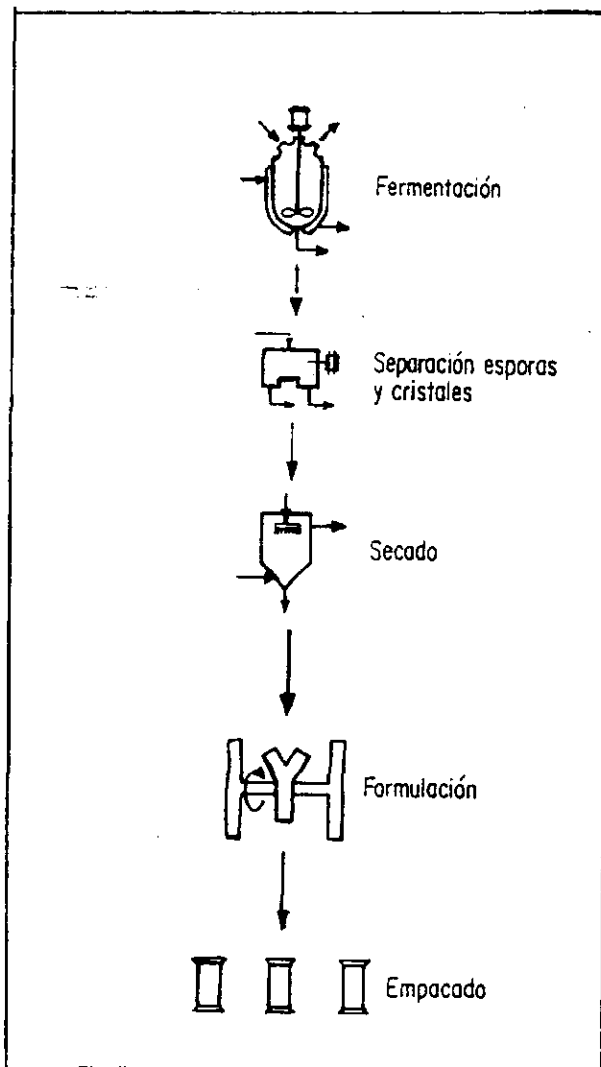
La tecnología más usada para la producción de *Bacillus thuringiensis* es la fermentación sumergida en biorreactores aireados y agitados. Los detalles de la fermentación, el proceso de la recuperación y purificación de las esporas y cristales y la formulación de productos se mantienen como secretos industriales. Sin embargo, se puede señalar que el proceso de fermentación es principalmente empírico y que debe ser determinado para cada cepa en particular.

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* son fáciles de cultivar en medios artificiales ya que sus requerimientos nutricionales no son muy complicados. Para producir la máxima cantidad de ingrediente activo al menor costo se requieren materias primas baratas. Para el cultivo de *Bacillus thuringiensis* se emplean como fuentes de carbono y nitrógeno materiales que contienen proteína insoluble, como la melaza, líquido de remojo de maíz y harina de soya. *Bacillus thuringiensis* puede utilizar este material ya que produce grandes cantidades de enzimas extracelulares que le permiten solubilizar y degradar dicho material.

El proceso de producción de los bioinsecticidas no es complicado. En términos generales este proceso consta de las siguientes etapas (figura 6):

- a) Fermentación
- b) Separación de las esporas y cristales del medio de cultivo
- c) Secado
- d) Formulación y,
- e) Empacado

Figura 6. Proceso básico para la elaboración de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis*.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### 6.3. Productos comerciales de *Bacillus thuringiensis*

Los principales productos comerciales basados en *Bacillus thuringiensis*, se dividen en varios tipos a saber:

a) Producto de primera generación:

Son aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo un conjunto de toxinas y esporas provenientes de una cepa nativa, generalmente aislada del suelo o de insectos muertos. Los ejemplos representativos de este tipo son "Dipel" producido por la compañía Abbot Laboratories.

b) Productos de segunda generación:

Son los constituidos por un conjunto de toxinas y esporas provenientes de una cepa en la que previamente se introdujeron por medio de un proceso de conjugación los plasmidos donde están contenidos los genes Cry de varias cepas nativas. Son ejemplos de este tipo de productos "Agree" producido por Ciba Geigy y "Foil" producido por Ecogen.

c) Productos de tercera generación:

Son aquellos cuya formulación contiene bacterias muertas de la especie *Pseudomonas fluorescens* a las que previamente les fueron clonados los genes que codifican las delta-endotoxinas. La tecnología utilizada para elaborar estos productos se conoce como "CellCap" es propiedad de la empresa Mycogen.

## **Anexos**

- 1. Pruebas bioquímicas, composición y fundamento**
- 2. Técnicas de tinción**
- 3. Control de calidad**
- 4. Fotografías de *Bacillus thuringiensis***

## 1. Pruebas bioquímicas composición y fundamentos.

PRUEBA BIOQUÍMICA UTILIZADA	COMPOSICION	PRINCIPIO	INTERPRETACION
Rojo fenol más carbohidrato	Caldo nutritivo Carbohidrato (el de interés para identificar o diferenciar la bacteria de estudio) Rojo fenol-indicador	Determinar la utilización de carbohidratos como base de nutrición, evidenciada por el cambio de color del indicador por la formación de productos ácidos secundarios resultado de la utilización del carbohidrato.	Positivo. Utilización del carbohidrato, color amarillo pH 7.0-8.0.  Negativo no utiliza el carbohidrato, color rojo
MIO (Movilidad Indol Ornitina)	Peptona Tryptofano Ornitina Agar Cloruro de sodio Agua destilada	La prueba evalúa tres aspectos de las bacterias, su posibilidad de moverse (poseer flagelos), por tratarse de un medio semisólido, la producción de Indol a causa de la presencia de la enzima triptofanasa que hidroliza y desamina el triptófano y la descomposición de la Ornitina por enzimas decarboxilasas sustrato-específicas.	<u>Movilidad</u> Positiva, si existe crecimiento difuso por todo el medio Negativo, sólo existe crecimiento a lo largo de la picadura de inoculación. <u>Indol</u> Positivo, al reaccionar con el reactivo de Kovacs dando un color rojo Negativo, sin reacción por no tener producción de Indol, no hay cambio en el color del reactivo de Kovacs. <u>Ornitina</u> Positivo, existe la descarboxilación, el medio cambia a color amarillo. Negativo, no existe descarboxilación, el medio conserva su color.

Hidrólisis de almidón	20g de Agar 5g de peptona 3g de extracto de carne 5g de cloruro de sodio 20g de almidón soluble 1000mL de Agua destilada	Algunas bacterias son capaces de romper los enlaces del almidón mediante la exosima amilasa, formando retos de maltosa y glucosa, este hecho se ve evidenciado al agregar alguna solución de yodo.	Hidrólisis de almidón positiva. Almidón + Yodo-Amarillo (Amilasa positiva) Negativa. Almidón + Yodo-azul oscuro, amilasa negativa
Hidrolisis de gelatina	Caldo nutritivo 12 - 15% de gelatina	La facultad de descomponer la gelatina por la enzima gelatinasa, derivándose en la licuefacción de la gelatina.	Positiva, licuefacción (no gelifica al ser refrigerada) Negativa, gelifica al ser refrigerada.
Crecimiento en Agar Urea de Christensen	1g de peptona 5g de cloruro de sodio 2g de fosfato monopotásico 1g de glucosa (0.1%) 20g de Urea (20%) 0.012g de rojo fenol 15-20g de Agar 1000mL de agua destilada	Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa.	Hidrolizadores rápidos de urea, color rojo rosado en todo el medio Hidrolizadores lentos de urea, color rosado en un principio sólo en el pico de la flauta, que de forma gradual se extiende por el tubo. No hidrolizadores de urea, el medio conserva su color amarillo original.
Caldo nutritivo 40°C	Caldo BHI (Infusión cerebro-corazón) 200g/L Infusión de cerebro de ternera 250g/L Infusión de corazón de res 10 g/L Peptona de gelatina 2 g/L Dextrosa Agua destilada c b p.	Evalúa la capacidad de crecimiento (tolerancia) de la bacteria a condiciones más altas de temperatura de lo normal.	Positivo, crecimiento de la bacteria en el medio. Negativo, sin crecimiento bacteriano.

Continuación de pruebas bioquímicas

PRUEBA BIOQUÍMICA UTILIZADA	COMPOSICION	PRINCIPIO	INTERPRETACION
Crecimiento en NaCl al 6%	Caldo BHI (Infusión cerebro-corazón) 200g/L Infusión de cerebro de ternera 250g/L Infusión de corazón de res 10 g/L Peptona de gelatina 2 g/L Dextrosa 5 g/L Cloruro de sodio Agua destilada c.b.p.	Evalúa la capacidad de regulación osmótica en un medio hipertónico.	Positivo, existe crecimiento bacteriano. Negativo, sin crecimiento bacteriano a causa del choque osmótico.
TSI	Lactosa Sacarosa Rojo de fenol Agua destilada Agar Peptona Sulfato de hierro y amonio Glucosa	Determinar la capacidad de un organismo de utilizar y fermentar un carbohidrato específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gas y posible producción de ácido sulfhídrico.	
<p><b>Interpretación:</b></p> <p>El medio tiene una cantidad limitante de glucosa y 10 veces más lactosa y sacarosa por lo que:</p> <p>A/A Esta reacción se denomina ácido sobre ácido y se caracteriza porque todo el medio permanece de color amarillo, se dice entonces que el organismo es fermentador de lactosa.</p> <p>K/A Reacción alcalina sobre ácido, se presenta cuando el microorganismo no fermenta la lactosa y busca sus nutrientes a través del metabolismo proteico, utiliza la peptona, que se produce en la superficie del tubo por la presencia de oxígeno, los productos de degradación por esta vía son alcalinos (como el amoníaco), por lo que se observa una coloración roja en la parte alta del tubo gracias a la presencia del indicador, y la parte del fondo permanece amarilla debido al metabolismo anaerobio de la glucosa, que se llevo a cabo primero hasta antes de agotarse esta carbohidrato.</p> <p>Gas, la presencia de este estará revelada por la ruptura o levantamiento del medio del tubo y ocurre generalmente con los microorganismos fermentadores de lactosa.</p> <p>H<sub>2</sub>S, se evidencia la producción de ácido sulfhídrico, por formar un precipitado negro con el sulfato de hierro.</p>			



<p>Voges- Proskauer</p>	<p>7g Polipeptona 5g Glucosa 5g Fosfato dipotásico Agua destilada hasta 1L.</p>	<p>Este medio es utilizado también para la prueba de rojo de metilo, que evalúa la formación de productos altamente ácidos a partir de glucosa por la vía de fermentación de ácidos mixtos, y también evalúa la formación de ácido piruvico, que es metabolizado por otras vías metabólicas, de acuerdo a los sistemas enzimáticos de las diferentes bacterias, una de estas vías da como resultado la producción de acetoina, un producto final de reacción neutra, que se evidencia con la presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio al 40%, la acetoina es convertida en diacetilo y el <math>\alpha</math>-naftol sirve como catalizador para producir un complejo rojo.</p>	<p>Para leer esta prueba el manual Bergey considera, <math>pH &lt; 6</math> y <math>pH &gt; 7</math>, que se traduce a dividir el contenido de la prueba en dos tubos y evaluar por un lado rojo de metilo, agregando este reactivo y será positivo si se torna el medio de color rojo, que correspondería a un <math>pH &lt; 6</math>. Y por otro lado en si la prueba de VP, que al agregar el hidróxido de potasio y el <math>\alpha</math>-naftol confieren el <math>pH &gt; 7</math> y será positiva si se presenta el complejo colorido rojo después de 15 minutos pero en menos de una hora.</p>
<p>Caldo Nitratos</p>	<p>3g Extracto de carne 5g Peptona 1g Nitrato de potasio Agua destilada hasta 1L. Reactivo A: <math>\alpha</math>-naftilamina 5g en ácido acético 5N hasta 1L. Reactivo B: Acido sulfanílico 8g en ácido acético 5N hasta 1L.</p>	<p>Sólo algunas bacterias tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos, extrayendo el oxígeno de los nitratos para reducirlos a nitritos, la presencia de estos se detecta mediante el agregado de <math>\alpha</math>-naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un colorante diazonio rojo, p-sulfobenceno-azo-<math>\alpha</math>-naftilamina</p>	<p>Positivo, la formación de un color rojo. Negativo, no hay formación de complejo colorido, pero hay que tener en cuenta si existe producción de gas, pues esto señala que la reducción fue llevada hasta nitrógeno molecular y sería un falso negativo.</p>

## 2. Técnicas de tinción.

Tinción de Gram.

Es una tinción diferencial usada para demostrar las propiedades tintoriales de dos tipos:

Las bacterias llamadas grampositivas que retienen el colorante cristal violeta después de una decoloración en la que su pared celular no se degrada, y se ven de color azul oscuro y las bacterias gram negativas cuya pared celular no es tan resistente y se degrada con la acción violenta del decolorante.

Técnica:

1. Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire.
2. Se fija el material en el portaobjetos pasándolo 3 o 4 veces a través de la llama de un mechero, de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de tinción.
3. Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie con solución de cristal violeta.
4. Después de un minuto de exposición al cristal violeta se lava totalmente con agua destilada.
5. Se cubre el frotis con solución de yodo durante un minuto, se lava nuevamente.
6. Se sostiene el frotis entre los dedos pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona, hasta que no se desprenda color violeta.
7. Se lava con agua corriente y se coloca otra vez en el soporte, se cubre la superficie con contratinción de safranina durante un minuto. Se lava con agua corriente.
8. Se coloca el preparado en posición vertical dejando que drene el exceso de agua.
9. Se examina el frotis en el microscopio.

Interpretación, las bacterias gram positivas se tiñen de color azul oscuro y las gram negativas se ven de color rosado.

### Tinción Shaeffer – Fulton (tinción de esporas).

La espora se forma en alguna región de la célula bacteriana que se rodea de una cápsula muy refrigente. La composición de la espora en relación con la célula ordinaria varía principalmente por su menor contenido en agua y la presencia característica de ácido dipicolínico. La resistencia a las condiciones físicas desfavorables se debe al compuesto formado por este ácido y sales de calcio, formando dicoiplinato de calcio.

#### Técnica:

1. Cubrir la preparación con verde malaquita, y calentar a emisión de vapores por un minuto sin dejar secar el colorante.
2. Lavar con agua corriente.
3. Cubrir la preparación con safranina por 15 minutos.
4. Lavar con agua y dejar secar al aire.

**Interpretación:** Las esporas se observan al microscopio de color verde y el citoplasma de color rojo.

### 3. Control de calidad.

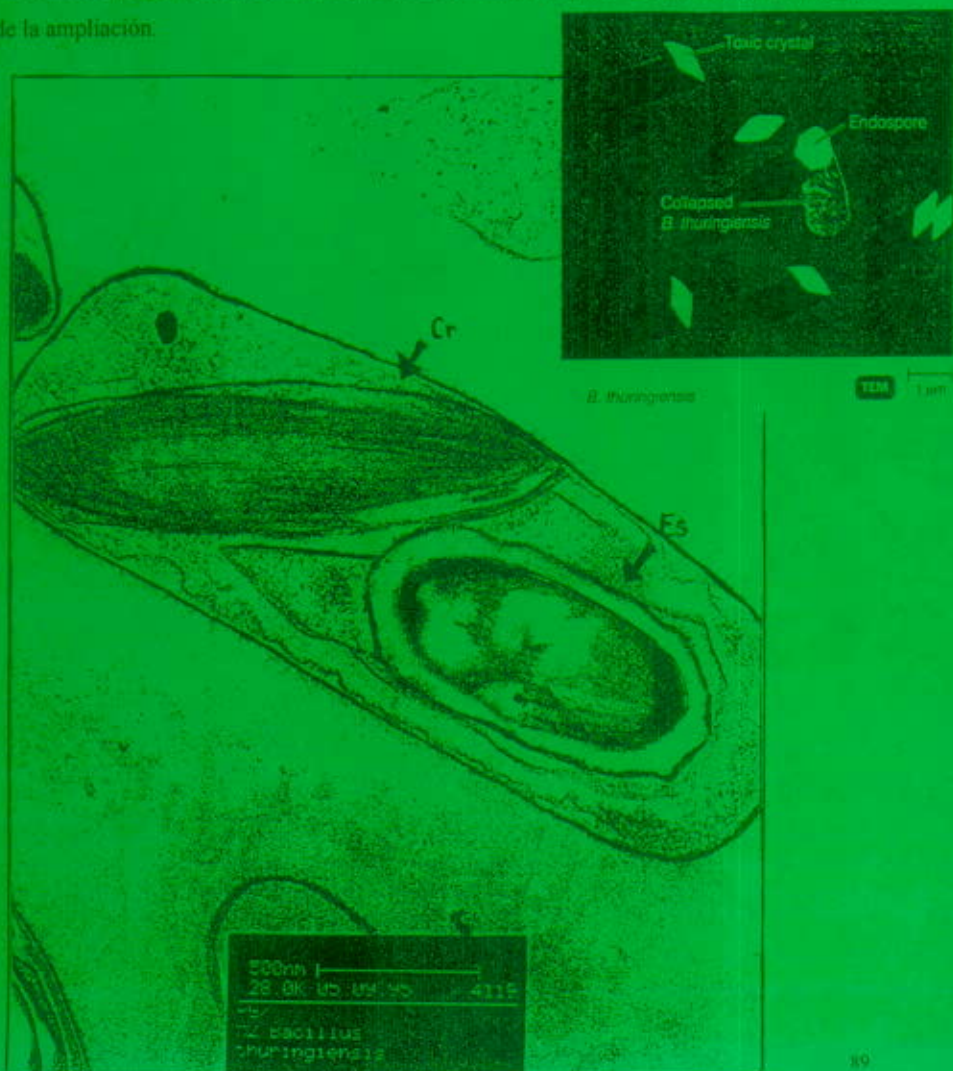
En la actualidad, calidad es sinónimo de excelencia, de garantía en cualquier servicio, así es entonces que el laboratorio de microbiología no está exento de la calidad, y en el caso de la presente tesis nuestro programa de control de calidad consistió en:

1. Aseguramiento de limpieza y desinfección en el área de trabajo, utilizando una solución de fenol al 10% para esto.
2. Protección del área de trabajo para evitar contaminantes, formando una barrera con tres mecheros fisher alrededor del área de trabajo y en un lugar cerrado, es decir sin corrientes de aire y paso frecuente de personas.
3. Lavado y esterilización de todo el material de vidrio utilizado, además de medios de cultivo y pruebas bioquímicas, también así requerido por los métodos de preparación.
4. El uso de bata, guantes y cubrebocas para protección de la persona y del trabajo realizado.
5. Para garantizar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas, además de un amplio apoyo bibliográfico, se usaron sepas alternativas para discriminar y discernir adecuadamente la identificación de *Bacillus thuringiensis*.
6. No se utilizó una cepa de referencia ATCC *Bacillus thuringiensis*, puesto que además de tratarse de una cepa de uso industrial muy cara, el principal objetivo del trabajo era obtenerla y aislarla de su entorno natural.

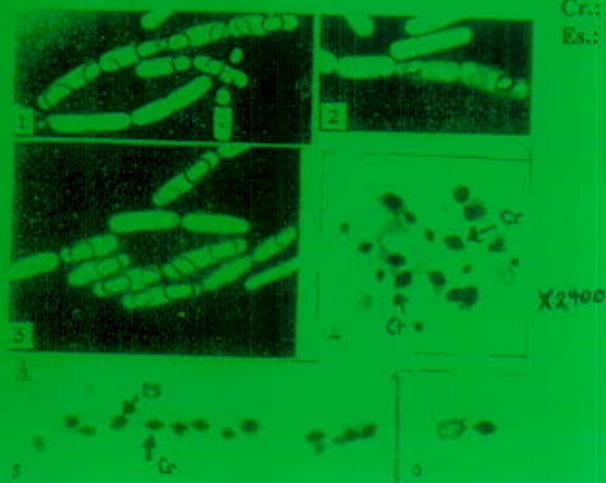
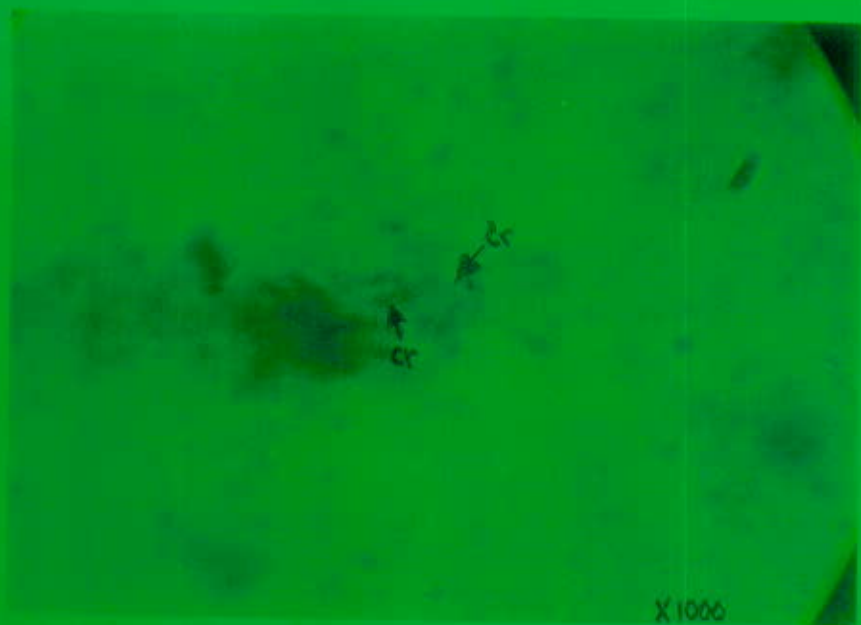
La calidad se refleja en los resultados de tu trabajo.

#### 4. Fotografías de *Bacillus thuringiensis*.

Fotografías tomadas con microscopio electrónico, donde se puede observar el tamaño y forma del cristal en comparación con la espora de la bacteria, proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M., Cuernavaca Morelos. Se desconoce el tamaño de la ampliación.



Arriba tinción de gram de *Bacillus thuringiensis*, cepa aislada Ax (ver páginas 41 y 46),  
abajo primera publicación de la presencia del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis*  
hecha por C.L. Hannay en 1953.



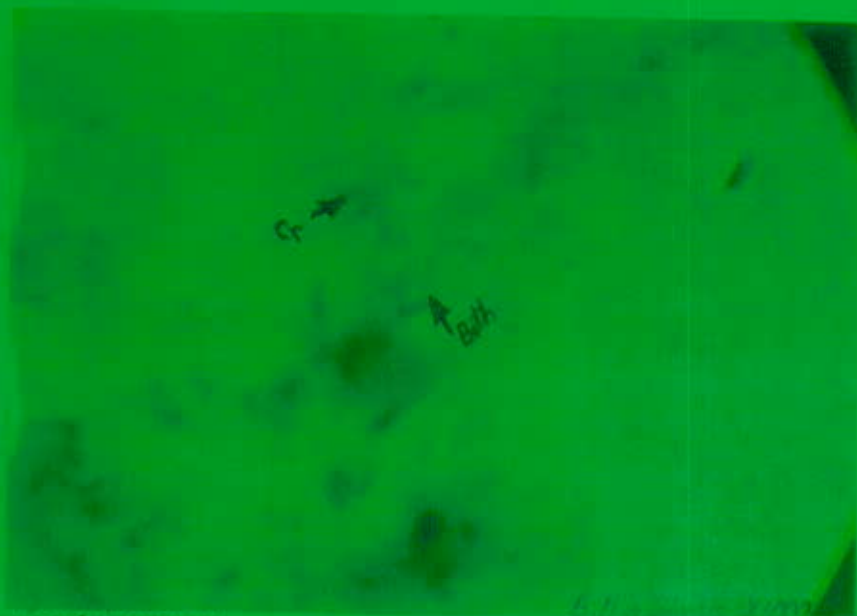
Cr.: Cristal proteico

Es.: Espora



*B. thuringiensis* x1000

TINCIÓN DE GRAM  
B.th: *Bacillus thuringiensis*  
Cr.: Cristal protéico

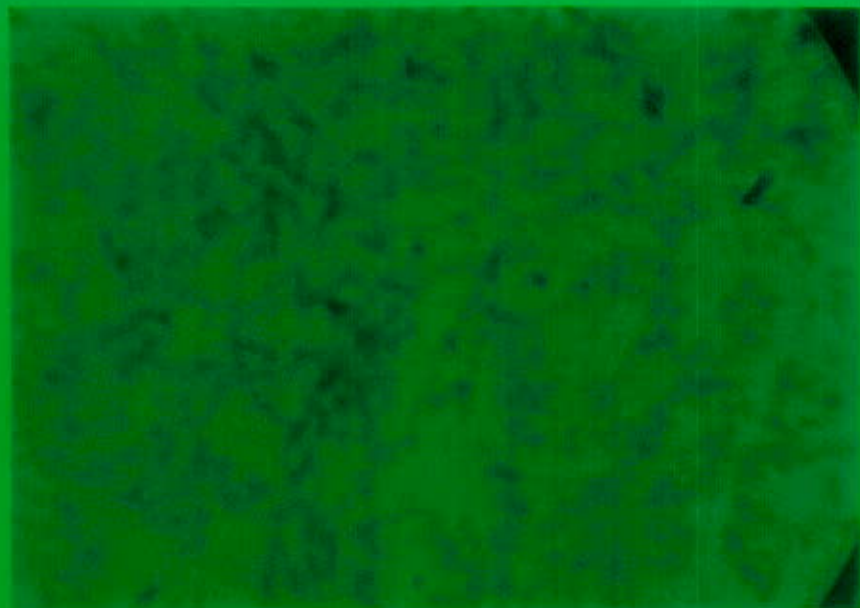


*B. thuringiensis* x1000

TINCIÓN DE GRAM

*Bacillus thuringiensis* x 1000

Tinción de esporas donde se observan numerosos bacilos de la cepa Ax aislada.



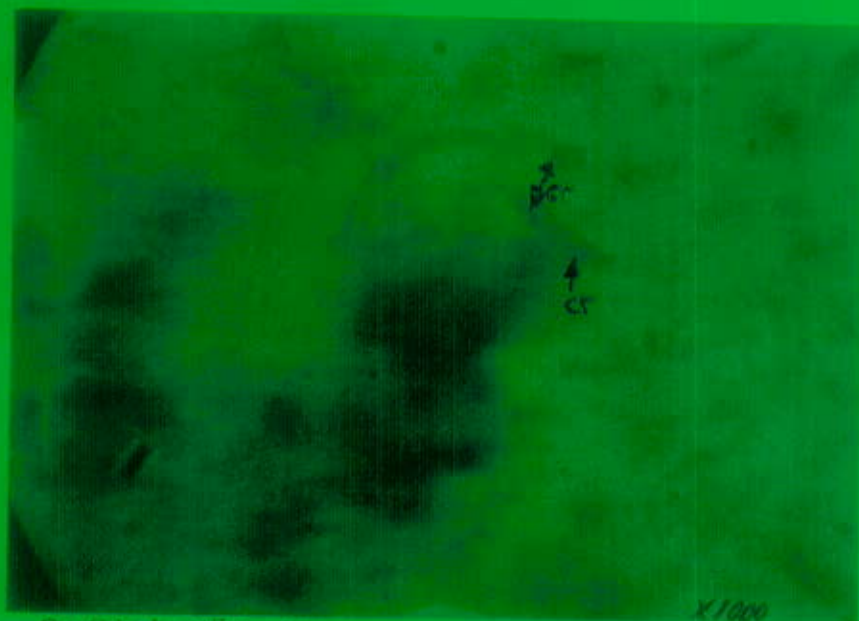
*Bacillus thuringiensis* x 1000







Bacillus thuringiensis x 1000



Cr.: Cristal protéico x 1000

Tinción con cristal violeta donde se observan bacilos aislados de la cepa Ax.



Bacillus thuringiensis (B.th) x 1000



(B.th) Bacillus thuringiensis x 1000

# ***Bibliografía***

## Bibliografía

1. Austin B., Priest F. Taxonomía bacteriana moderna. México:Edt. Limusa:1992.
2. Bailey S., Sidney F., Baron E. Diagnóstico microbiológico; 7ª ed. Argentina: Edt. Médica Panamericana:1989.
3. Barberá C: Pesticidas agrícolas; 4ª ed. España: Ediciones Omega: 1989.
4. Betchel D., Lee A., Bulla Jr. Electron microscope estudy of sporulation and paraesporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. Journal of Bacteriology. Vol 127, No 3. September1976, p. 1472-1481.
5. Brown C., Campbell I., Priest F. Introducción a la biotecnología. España: Edt. Acribia: 1989.
6. Cobos V., Gonzalez R., Alvarado J. Plaguicidas agrícolas, efectos indeseables. Ciencia y Desarrollo. Vol 23, Num 137. Noviembre-Diciembre de 1997.
7. Cowan S., Holt J., Krieg N., Murray R., et al. Bergey's manual of determinative bacteriology; 8ª ed. Unitet States of America: William & Wilkins: 1975 .
8. DavidsonR., Lyon W. Plagas de insectos agrícolas y del jardín. México: Edt. Limusa: 1992.
9. De Bach P. Control biologico de plagas de insectos y malas hierbas. México: Edt. Continental: 1992.
10. Delgado A., Amich S., Prieto S., SalveM. Laboratorio clinico: microbiología. España: Edt. Interamericana-Mc Graw Hill: 1994.
11. Galán L., Rodriguez C. Bioinsecticidas: microbiología industrial para su producción. Información Científica y Tecnológica. Vol 1, Num 154. Julio de 1989.
12. Galán L., Rodriguez C., Luna H. Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. México: Universidad de Nuevo León: 1996.
13. Hannay. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature. Vol 172. November 28, 1953.
14. Koneman E., Allen S., Dowell V., Janda W., Herbert M., Winn W. Diagnóstico mrobiológico; 3ª ed. Argentina: Edt. Médica Panamericana: 1997.

15. Lorence A. Los biopesticidas en el marco de la agricultura sustentable. México: Cam Bio Tec (Los cuadernos de vigilancia tecnologica): 1996.
16. Murray R., Brenner D., Holt J., Krieg N., Sneath P., et al. Bergey's manual of systematic bacteriology; 12ª ed. United States of America: William & Wilkins: 1989.
17. Peppler H., Perlman D. Microbial technology; 2ª ed. Vol 1. United States of America: Tacademic Press: 1979.
18. Pumarola A., Rodriguez A., Garcia J., Piedrola G. Microbiología y parasitología médica; 2ª ed. España: Edt. Masson-Salvat medicina:1994.
19. Realpe M., Montoya D., Orduz S., Reseña bibliografica: *Bacillus thurigiensis*, legado para el siglo XXI. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol 1, Num 1. Enero de 1998, p 11-27.
20. Rodrigo A., Cardenas A., Espinosa G. Hechos en biotecnología. México:Editorial A.G.T.:1991.
21. Ronald M., Bartha R. Microbial ecology: fundamentals and aplicaciones; 3ª ed. United States of America: The Benjamin/ Cummings publishing company inc.:1993.
22. Rose A. Microbiología química; 2ª ed. España:Edt. Alhambra: 1977.
23. Sherris J. Y col. Microbiología médica. España:Edt. Doyma: 1993.
24. Sonenshein A., Hoch J., Losick R. *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. United States of America: American Society for Microbiology: 1993.
25. Sonnewirth A., Jarett L., Gradwohl: métodos y diagnóstico del laboratorio clínico; 8ª ed. Argentina: Edt. Médica Panamericana.
26. Tortora G., Funke B., Case C., Microbiologyan introduction; 5ª ed. United States of America: Cummins publishing company; 1995.
27. Van Emden H. Control de plagas y su ecología. Cuadernos de Biología. España: Ediciones Omega: 1977.