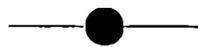


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



Producción de Bioinsecticidas



JORGE ALFREDO ARCAS



TESIS
1985



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6877/79 int 129



DEX-56204

445

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**



Producción de Bioinsecticidas



JORGE ALFREDO ARCAS



**TESIS
1985**

Tesis 475



DCN 11

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Centro de - Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección - del Doctor Rodolfo J. Ertola.

a mis padres

a Nora

Mi reconocimiento:

Al Doctor Rodolfo J. Ertola por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme el empleo de sus equipos e instalaciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el otorgamiento de sucesivas becas que permitieron la realización de estos estudios.

Mi agradecimiento:

Al Doctor Rodolfo J. Ertola por su guía y estímulo permanente.

Al Doctor Osvaldo M. Yantorno - por su inestimable asesoramiento.

Al Doctor José A. Catoggio por el análisis cuantitativo de iones practicado sobre muestras de extracto de levadura.

A la Lic. Mirta M. Faloci por su colaboración en el desarrollo del método inmunolectroforético.

Al Ing. Agr. Eliseo A. Arrarás - por su cooperación en el desarrollo del ensayo biológico.

Al Sr. Julio C. Figari por su inapreciable asistencia técnica, y al resto del personal del CINDEFI.

I N D I C E

	Página
* PARTE GENERAL	1
1. <u>INTRODUCCION</u>	2
1.1. Clasificación de los métodos de control.	3
1.1.1. Control natural.	4
1.1.2. Control por aplicación de métodos mecánicos y físicos.	4
1.1.3. Control por aplicación de prácticas agrícolas.	4
1.1.4. Control genético.	4
1.1.4.1. Por "variedades vegetales resistentes".	5
1.1.4.2. Control autocida.	5
1.1.5. Control por métodos químicos.	5
1.1.5.1. Control químico "no insecticida".	5
1.1.5.2. Control químico por "insecticidas propiamente dichos".	7
1.1.6. Control biológico.	8
1.1.6.1. Clasificación de los insecticidas biológicos.	10
1.1.6.1.1. Según la asociación natural con su huésped.	10
1.1.6.1.2. Según la naturaleza del patógeno.	10
1.1.6.1.2.1. Insecticidas fúngicos.	11
1.1.6.1.2.2. Insecticidas virales.	12
1.1.6.1.2.3. Insecticidas bacterianos.	14
2. <u>CONTROL BIOLOGICO POR BACILLUS THURINGIENSIS</u>	18
2.1. Microorganismo.	18
2.1.1. Clasificación de la especie <u>Bacillus thuringiensis</u> .	18
2.1.2. Productos tóxicos de <u>Bacillus thuringiensis</u> y acción tóxica de los mismos.	21
2.1.2.1. El cristal de <u>Bacillus thuringiensis</u> .	23
3. <u>PRODUCCION DE INSECTICIDAS BIOLOGICOS</u>	27
3.1. Producción industrial de <u>Bacillus thuringiensis</u> .	27
3.1.1. Medios de cultivo empleados a nivel industrial.	28
3.1.2. Separación y formulación de las pastas celulares.	30
3.1.3. Estandarización de las formulaciones.	32
4. <u>OBJETIVOS</u>	33
* PARTE EXPERIMENTAL	34
1. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	35
1.1. Microorganismo.	35
1.2. Inóculos.	35
1.3. Medios.	36
1.4. Sistemas de cultivo utilizados.	38
1.5. Determinación de la concentración celular.	43
1.5.1. Medida turbidimétrica.	43
1.5.2. Determinación de peso seco.	43
1.6. Recuento de esporos viables resistentes al calor.	44

	Página
1.7. Medida de pH.	44
1.8. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de O ₂ (K _{la}).	44
1.9. Medida del porcentaje de Oxígeno disuelto.	45
1.10. Determinación de la presión osmótica.	45
1.11. Determinación del consumo de glucosa.	45
1.12. Determinación del consumo de Oxígeno.	45
1.13. Determinación de la actividad bioinsecticida de las suspensiones esporo-cristal.	46
1.13.1. Cría de larvas.	46
1.13.2. Cría de larvas para bioensayo.	48
1.13.3. Bioensayos.	48
1.13.4. Determinación de la concentración letal 50 (CL ₅₀).	49
1.14. Determinación por rocket inmunolectroforesis de la delta-endotoxina de <u>Bacillus thuringiensis</u> .	51
1.14.1. Obtención del antígeno.	51
1.14.2. Preparación del gradiente lineal de Urografina.	51
1.14.3. Fraccionamiento del gradiente.	53
1.14.4. Preparación del antisuero.	54
1.14.5. Solubilización de las muestras.	55
1.14.6. Electroinmunoensayo.	55
2. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	58
2.1. Influencia del grado de aireación.	59
2.2. Ensayos preliminares con medios de cultivo.	62
2.3. Influencia del agregado de iones.	64
2.4. Influencia de la naturaleza y concentración de la fuente de Nitrógeno.	77
2.4.1. Naturaleza de la fuente nitrogenada.	77
2.4.2. Concentración de la fuente nitrogenada.	82
2.5. Empleo de extracto de raíz de malta como fuente alternativa de Nitrógeno y factores de crecimiento.	86
2.6. Influencia de la naturaleza y concentración de la fuente de Carbono.	90
2.7. Efecto de la concentración de los componentes del medio de cultivo sobre parámetros de crecimiento y productividad de <u>Bacillus thuringiensis</u> .	95
2.8. Desarrollo de <u>Bacillus thuringiensis</u> en cultivo discontinuo alimentado (CDA).	107
* CONCLUSIONES GENERALES	113
* BIBLIOGRAFIA	116

P A R T E G E N E R A L

1. I N T R O D U C C I O N

Desde la antigüedad, el hombre ha entablado una constante e incansable lucha contra los insectos. Esta se ha - visto motivada por encontrar, entre ellos, a los responsa--bles de producir serios daños a su salud y economía.

Se conocen aproximadamente un millón de especies de insectos, de las cuales, afortunadamente, tan sólo 15.000 - pueden ser consideradas como plagas.

Desde el punto de vista del papel que las mismas juegan sobre la sociedad y la economía, se las puede clasifi--car, en forma global como: plagas domésticas, sanitarias y agrícolas.

Las plagas domésticas limitan sus efectos a causar - problemas en el confort y sanidad de espacios reducidos. - Dentro de éstas encontramos como ejemplo a moscas, mosqui--tos, cucarachas, polillas, hormigas y también las llamadas "pestes de granos almacenados" (caso típico de gorgojos).

La importancia de las dos restantes no necesita ser enfatizada, no obstante se puede acotar que dentro de las plagas sanitarias nos encontramos con aquellas que originan "daño en forma directa" (caso de insectos que producen pica--duras, acompañadas generalmente de procesos irritativos) y aquellos insectos que actúan como "portadores o transmiso--res de enfermedades".

Por último tenemos a las plagas agrícolas, entre las que encontramos a las plagas "aéreas" y "subterráneas", res--ponsables de causar al hombre serios trastornos económicos.

Esta clasificación, si bien puede ser sometida a crí--ticas por no presentar límites nítidos entre las plagas do--mésticas y sanitarias, es universalmente aceptada.

En la naturaleza, encontramos un equilibrio ecológi--co, en el cual predadores naturales y enfermedades propias de los insectos son los principales factores que modulan - los niveles de población de los mismos. Si por algún motivo

estos factores se ven afectados (sea por un descenso en el número de predadores o la aparición de una descendencia con marcada resistencia, entre otros), ese equilibrio natural - se verá afectado. Como consecuencia de este fenómeno, la población de insectos podrá ver incrementado su número hasta alcanzar niveles que van desde el llamado "umbral económico" hasta llegar a producir un "daño económico".

En el primero de estos casos, se crea una situación de alarma, en la que se puede empezar a pensar en la aplicación de alguna táctica de control. En este estadio, no es justificable aún la instrumentación de alguna de ellas, debido a que las inversiones involucradas no alcanzarían a compensar las pérdidas que se podrían llegar a producir.

En el segundo de estos casos, el cultivo se ve seriamente comprometido, motivo por el cual se debe proceder al tratamiento del mismo.

En el caso particular de las plagas sanitarias, al estar de por medio la salud del hombre, los criterios adoptados al respecto son diferentes.

Hasta no hace muchos años, cuando la densidad de población del insecto considerado como plaga sobrepasaba el umbral económico se pensaba en "exterminar", sin entrar en mayores consideraciones sobre las alteraciones que se podrían llegar a producir sobre la ecología del sistema. Actualmente los conceptos al respecto han cambiado profundamente, hablándose más bien de "control" o "manejo de plagas".

1.1. Clasificación de los métodos de control.

Por lo anteriormente expuesto, se hace evidente que, bajo determinadas circunstancias, se hace necesaria la aplicación de alguna táctica de control de insectos. Los métodos de control pueden ser: natural, por aplicación de métodos mecánicos y físicos, por aplicación de prácticas agríco

las, genético, químico y biológico.

1.1.1. Control natural.

Se lleva a cabo sin la intervención del hombre. Así-
tenemos:

a) Barreras naturales: que impiden la dispersión de-
los insectos más allá de determinadas regiones geográficas.

b) Factores abióticos: tales como distintos tipos de
suelos y cambios bruscos en las condiciones climáticas.

c) Enemigos naturales: entre los que encontramos pre-
dadores naturales, parásitos y enfermedades propias de los-
insectos.

1.1.2. Control por aplicación de métodos mecánicos y físi- cos.

Este hace referencia al empleo de redes y trampas. -
Son muy efectivos en recintos acotados, caso de hogares e -
invernaderos. Su utilización en espacios abiertos no es re-
comendable, pudiendo afectar bajo estas condiciones a menos
del 5% de la población objeto de control.

1.1.3. Control por aplicación de prácticas agrícolas.

En este caso se recomienda:

a) El trillado del campo y evitar el desarrollo de -
malezas, destruyendo los restos del cultivo después de la -
cosecha para evitar que los insectos encuentren un ámbito -
adecuado para su desarrollo.

b) La utilización de "cultivos trampa". Conociendo -
la preferencia de la plaga de aparición habitual en una re-
gión geográfica por un determinado cultivo, se destina par-
te del lote para su siembra con un cultivo trampa, de forma
tal de "distráer la atención del insecto" hasta la época de
cosecha.

1.1.4. Control genético.

1.1.4.1. Por "variedades vegetales resistentes".

Se han obtenido variedades en las cuales se han exaltado los fenómenos de:

"Antixenosis" (o fenómeno de no preferencia). Este - puede ser debido a ligeros cambios en el color del vegetal, cambios en la reflexión de la luz solar por parte de las hojas, tamaño, forma y tacto de las mismas, o también al incremento en la síntesis de sustancias repulsivas para los - insectos.

"Antibiosis". El vegetal produce un efecto patológico sobre la fisiología normal del insecto.

"Tolerancia". El vegetal puede soportar el ataque -- sin que ello altere profundamente su normal desarrollo.

1.1.4.2. Control autocida.

En este tipo de control, parte de la población de -- los insectos es expuesta a radiaciones de forma tal de lograr su esterilidad. Luego de la cópula se obtendrán huevos no viables.

El control autocida requiere un acabado conocimiento de los hábitos de la especie a controlar o especie "blanco".

1.1.5. Control por métodos químicos.

1.1.5.1. Control químico "no insecticida".

a) Atractantes. Constituidos por un conjunto de sustancias (llamadas semioquímicos) que alteran la forma normal de actuar de los insectos. Son conocidas como "mensajeros de comportamiento".

Los más difundidos son las feromonas, de las cuales, las hormonas sexuales tienen un uso más generalizado. Son - muy efectivas, pero su uso está limitado a espacios reducidos (caso de invernaderos) debido a su alto costo. Se las - suele emplear en el manejo integrado de plagas, junto a la aplicación de métodos mecánicos y físicos.

b) Repelentes. Generalmente empleados en los hogares

o en espacios abiertos.

c) Hormonas juveniles y ecdisona. Los insectos, antes de alcanzar la adultez, sufren una serie de transformaciones conocidas con el nombre de metamorfosis. De acuerdo a los cambios sufridos por las formas inmaduras, antes de llegar a adulto, tenemos tres tipos de metamorfosis:

"Ametábola". Si bien no es una verdadera metamorfosis, es igualmente incluida dentro de esta clasificación. Es más conveniente hablar en este caso de crecimiento del individuo. No se producen cambios en la forma del insecto, pero sí en su tamaño.

"Gradual o hemimetábola". Compreendida por una serie de formas inmaduras (ninfas) hasta llegar al adulto con alas y genitales desarrollados. Las ninfas, en este caso son parecidas a los adultos.

"Holometábola o metamorfosis propiamente dicha". El insecto pasa de larva a adulto alado, siendo las etapas de desarrollo perfectamente diferenciables.

Por ser invertebrados, la estructura de los insectos es soportada por un exoesqueleto, el que es renovado en más de una oportunidad durante su ciclo vital. El cambio del mismo se conoce como "muda".

Se conocen dos tipos de hormonas que actúan sobre ella: la "ecdisona" u hormona de la muda (que da al insecto la señal para que mude) y las "hormonas juveniles" (que le indican a que estadio debe mudar). Ellas han sido utilizadas en el control de plagas por desbalance o descompensación hormonal. De esta forma se han obtenido adultoides o bien insectos que mudan constantemente. Se han empleado también otra clase de sustancias conocidas como "precocenos" que producen adultos precoces con genitales inmaduros.

Otras sustancias empleadas y de menor grado de sofistación son:

d) Bloqueadores de alimentación. Integrados por compuestos organometálicos.

e) Inhibidores de síntesis de quitina. Compuestos -

por agentes alquilantes, generalmente peligrosos para el hombre.

1.1.5.2. Control químico por "insecticidas propiamente dichos".

Se han adoptado varios criterios para su clasificación:

1.1.5.2.1. De acuerdo al "origen" o "naturaleza" de los mismos se los ha agrupado en dos categorías:

a) Naturales. Caso de nicotina, rotenona y piretrinas.

b) Sintéticos.

1.1.5.2.2. Adoptando un criterio más "cronológico", teniendo en cuenta el grado de evolución y sofisticaciones crecientes encontramos insecticidas de:

a) Primera generación. Dentro de ellos encontramos a los "inorgánicos" (compuestos arsenicales y fluorados), "fumigantes" (gases o líquidos con alta presión de vapor) y los "botánicos" (equivalentes a los naturales de la clasificación anterior).

b) Segunda generación. Conocidos también como neurotóxicos, integrados por compuestos organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides. La toxicidad de los mismos e inespecificidad (son de amplio espectro), sumado a su generalmente elevada persistencia en el medio ambiente y uso indiscriminado, no necesitan ser recalçadas.

c) Tercera generación. Encontramos ejemplos de ellos en las hormonas juveniles y ecdisona, feromonas e inhibidores de síntesis de quitina. Si bien estos agentes ejercen un control químico no insecticida, son igualmente incluidos en esta clasificación teniendo en cuenta su grado de sofisticación.

La buena utilización de insecticidas va generalmente acompañada de un acabado conocimiento del comportamiento y hábitos del insecto, junto a un número de aplicaciones y dosis perfectamente establecidos. Lamentablemente, la falta -

de información por parte del usuario ha hecho que estos in-
secticidas se hayan aplicado sin criterio, por lo que los -
lapsos de tiempo estimados hasta la aparición de descenden-
cia con resistencia adquirida (aproximadamente diez años), -
se han visto reducidos, motivo por el cual surgió en el hom-
bre la necesidad imperiosa de sintetizar insecticidas cada-
vez más tóxicos⁽¹⁾.

1.1.6. Control biológico.

En 1965 Garret⁽²⁾ definió control biológico como --
cualquier condición o práctica bajo las cuales, un insecto-
considerado plaga, o su actividad, son reducidos por la ac-
ción de cualquier otro organismo viviente (excepto el hom-
bre) con el resultado de una disminución de su incidencia.

Esta es una definición evidentemente amplia, en la -
cual está implícita la presencia de entidades que hacen al-
control natural. A los fines del presente trabajo será teni-
da en cuenta la esencia de la misma en la que están involu-
crados los microorganismos como responsables del control --
biológico⁽³⁾.

Así podemos hablar de control "macrobiológico" (caso
de predadores naturales y artrópodos responsables de parasi-
tosis en insectos) y "microbiológico" refiriéndonos expresa-
mente a los microorganismos⁽⁴⁾.

Como ya se mencionó, del total de especies de insec-
tos conocidas, unas 15.000 son consideradas plagas. De ---
ellas tan sólo 300 son de sumo interés para su control por-
los daños económicos que producen o bien por poner en juego
la salud del hombre⁽⁵⁾.

Afortunadamente, asociadas a ellas, encontramos una-
serie de microorganismos conocidos como entomopatógenos⁽⁶⁾ -
los que, como su nombre lo indica, presentan actividad pató-
gena contra los insectos.

Aproximadamente 1.500 microorganismos de ocurrencia-
natural han sido identificados como agentes potencialmente-
insecticidas. El empleo de los mismos para regular las po-

blaciones de insectos se conoce como "control microbiano de insectos" (7).

Este término hace referencia a la utilización racional de un agente causante de mortandad entre los insectos blanco, con la idea de reducir su número (8).

En los últimos 15 años se ha desarrollado un creciente interés en el uso de insecticidas biológicos (9). Esto se debe en gran parte a problemas asociados con el empleo intensivo e indiscriminado de los insecticidas químicos. No sólo porque afectan por igual tanto a las especies blanco como a las que son benéficas para el hombre, sino que además su inadecuada utilización a llevado a la aparición y desarrollo de resistencia entre las especies objeto de control (10) dejando además, en el medio ambiente, residuos riesgosos para otras formas de vida, tanto vegetal como animal. Por otra parte, el control logrado con los insecticidas biológicos o bioinsecticidas, es ocasionalmente mejor y menos costoso que el químico (11).

Por todos estos motivos, los bioinsecticidas han sido vistos como una forma alternativa de controlar pestes, jugando un rol muy importante en el "manejo integrado de plagas" (6).

Uno de los aspectos salientes de los insecticidas biológicos, es su estrecho rango de acción (alta especificidad), lo que les permite controlar las poblaciones de interés sin afectar a las demás. Se ha observado que el empleo de los mismos no produce desarrollo de resistencia, estimándose que de llegar a detectarse, la aparición de la misma sería mucho más lenta que la presentada por los insecticidas químicos (7). Así, encontramos datos de empleo de este tipo de productos en determinadas regiones de E.E.U.U., en las que se han realizado aplicaciones intensivas durante 20 años sin tener evidencia de efectos adversos sobre el medio ambiente o aparición de resistencia dentro de la plaga controlada (12).

Con la idea de proceder a un control biológico, es -

importante conocer la relación existente entre el insecto blanco y el patógeno a utilizar, en vías de determinar la estrategia a emplear en el control de la plaga. Conocer el efecto del medio ambiente y factores físicos sobre el huésped y patógeno, es también de suma importancia. Así, por ejemplo, la incidencia solar, temperatura, lluvias y humedad relativa pueden alterar el comportamiento de los insectos y sus hábitos nutricionales, haciendo fracasar la habilidad de los microorganismos para infectarlos. El modo de aplicación del agente, el material sobre el que está soportado, dosificación y programación de las aplicaciones, pueden determinar la efectividad del control a corto o largo plazo⁽⁷⁾.

1.1.6.1. Clasificación de los insecticidas biológicos.

1.1.6.1.1. Según la asociación natural con su huésped pueden ser:

- a) Patógenos no obligados.
- b) Patógenos obligados.

Los últimos son generalmente fastidiosos y restringidos a un huésped o grupo de huéspedes, mientras que los primeros pueden tener una asociación transitoria con el huésped o llevar una vida libre la mayor parte del tiempo.

Para ser empleados como bioinsecticidas, los microorganismos deben cumplir con ciertos requisitos, a saber:

- El microorganismo debe encontrarse siempre en el insecto afectado y no en el sano.

- El organismo debe poder crecer en cultivos puros fuera del huésped.

- El cultivo puro, cuando es inoculado en el insecto susceptible debe iniciar la sintomatología clásica previa a su muerte.

- El microorganismo se debe poder reaislar a partir del huésped infectado artificialmente y ser recultivado.

1.1.6.1.2. Según la naturaleza del patógeno, se los clasifica como insecticidas a base de: hongos, virus, bacterias y

protozoarios.

A los fines del presente trabajo, la discusión se verá limitada a la utilización de los tres primeros, dada la importancia económica que presentan los mismos.

1.1.6.1.2.1. Insecticidas fúngicos.

Las infecciones naturales por hongos juegan un papel preponderante en el control de muchas plagas de interés. -- Ocasionalmente, la mortandad producida alcanza niveles epizooticos, causando el colapso total de la población afectada.

Bassi⁽¹³⁾, en 1835, fue el primero en demostrar que el hongo Beauveria bassiana podía causar la muerte en gusanos de seda. No sólo contribuyó al entendimiento de la muerte en insectos, por infecciones, sino que además puntualizó que los microorganismos podrían ser empleados en la lucha contra las plagas.

Se han identificado más de 500 especies de hongos capaces de producir infecciones en insectos⁽¹⁴⁾, siendo los ejemplares más sobresalientes Verticillium lecanii, Hirsutiella thompsonii, Metarhizium anisopliae y Beauveria sp.

Debido a que la mayoría de ellos no deben ser necesariamente ingeridos para causar infección, pudiendo actuar por colonización superficial, pueden ser empleados en cualquier etapa del desarrollo del insecto. No obstante, a pesar de su potencial como agentes insecticidas, su utilización en forma masiva se ha visto limitada. Esto, se debe -- quizás, a que se conoce relativamente poco sobre su modo de acción y muchos de sus exponentes más destacados se ven -- afectados por las condiciones macro y microclimáticas. Además, en general, no se ha establecido adecuadamente su seguridad o efecto sobre muchas especies no blanco y animales superiores y la tecnología para su producción en gran escala, es dificultosa y en algunos casos no se ha desarrollado aún⁽⁷⁾. A pesar de ello, se han elaborado y llevado a nivel comercial algunos insecticidas fúngicos a base de Beauveria bassiana. Su acción sobre Leptinotarsa decemlineata es am--

pliamente reconocida. Aplicaciones en suelos infectados con ella han demostrado su efecto letal sobre larvas de primer- y segundo estadio⁽¹⁵⁾. En algunos casos se la ha utilizado en aplicaciones combinadas con pequeñas dosis de malatión -⁽¹⁶⁾. Esta especie junto a Beauveria brongniartii, son las más conocidas de todas las especies de hongos entomopatógenos, teniendo acción sobre más de 400 especies de insectos. De las antes mencionadas, Beauveria bassiana es la más ampliamente utilizada en el control de plagas⁽¹⁷⁾.

Se conocen también preparados comerciales a base del hongo Metarhizium anisopliae. Uno de ellos es elaborado en Brasil y su producción en gran escala se realiza sobre granos de arroz en bolsas de polietileno o en botellas de vidrio. Se ha empleado con éxito en el control de Mahanarva posticata⁽¹⁸⁾.

Hirsutella thompsonii es otro importante ejemplo. Es conocido como agente regulador natural, causante de epizootias en poblaciones de Phyllocoptruta oleivora, importante peste de citrus. A pesar de esporular muy pobremente en medio sólido o medio líquido, lo que produce serias complicaciones para su producción a nivel industrial, sus aplicaciones han sido sumamente exitosas. Actúa causando inicialmente una gran reducción en la población atacada, manteniéndola a la misma en niveles bajos por períodos relativamente prolongados (aproximadamente seis meses)⁽¹⁹⁾.

Otro hongo, Verticillium lecanii, es conocido por su alta patogenicidad sobre áfidos. Es cultivado en gran escala en medios sólidos y líquidos. Cuando es esparcido, sus esporos desarrollan sobre el insecto blanco penetrando la cutícula, causándole la muerte pocos días después. Su empleo está restringido por problemas de supervivencia de los esporos en condiciones de sequedad, tornando dificultosa su producción y almacenamiento⁽²⁰⁾.

1.1.6.1.2.2. Insecticidas virales.

Muchos patólogos de insectos consideran a los virus como los entomopatógenos potencialmente más importantes. La

mayoría de estos pertenecen a las familias Baculoviridae, - Poxviridae, Reoviridae, Iridoviridae, Parvoviridae, Picornoviridae y Rhabdoviridae.

Los baculovirus de artrópodos, son un grupo de patógenos obligados aislados a partir de sus huéspedes específicos. Se los ha clasificado en dos grandes grupos integrados por los llamados NPV y GV virus⁽²¹⁾.

Los NPV y GV baculovirus han recibido la mayor atención dentro de los insecticidas virales y su importante rol en el control de plagas ha estimulado el interés por su bioquímica y mecanismos de infección⁽²²⁾. Su compleja estructura, sumado al hecho de no tener relación química, física o propiedades biológicas en común con ningún virus conocido, hallado en vegetales o vertebrados, además de su marcado potencial entomopatógeno, los convirtió en el grupo considerado de mayor importancia como agente pesticida⁽²³⁾.

Los preparados comerciales a base de NPV y GV, son relativamente estables en el medio ambiente. Se han realizado estudios en los cuales las partículas virales fueron formuladas acompañadas con agentes protectores de las radiaciones U.V. de uso común en otros insecticidas biológicos, hallando un considerable aumento de supervivencia de las mismas⁽²⁴⁾. De hecho es habitual formular los productos, previa aplicación a campo, con sustancias que los protejan de la luz U.V. y que además permitan optimizar su almacenaje, suspensión y aplicación final⁽²⁵⁾.

La importancia de estos agentes, en el manejo programado de plagas, es ampliamente reconocida⁽²⁶⁾. No obstante, las posibilidades y limitaciones en su empleo están dadas por la seguridad, persistencia y compatibilidad de los preparados⁽²⁷⁾.

Es común el empleo de dos técnicas de producción a nivel industrial. Una de ellas es la propagación de las partículas virales en tejidos de invertebrados. Pero la más difundida, si bien menos elaborada, es el desarrollo de los virus en sus huéspedes específicos⁽²⁸⁾. Si bien este método

requiere gran cantidad de mano de obra, la simplicidad operativa y productividad final, que alcanza valores del orden de 9×10^9 partículas virales por larva⁽²⁹⁾, hacen de éste, el sistema de producción casi universal.

El control de las etapas productivas es de vital importancia pues, si bien no se han hallado, en las formulaciones, bacterias u hongos patógenos, sí se detectó la presencia de patógenos oportunistas⁽³⁰⁾. El cultivo de los virus se realiza en los laboratorios bajo condiciones controladas, empleándose la producción para el control de plagas agrícolas y forestales^(31,32).

Al igual que insecticidas biológicos de otra naturaleza, su eficacia se ve afectada por el estado larvario del huésped y dosis empleada. Así, la susceptibilidad de Spodoptera litoralis es inversamente afectada por la edad de las larvas, desde el segundo hasta el quinto estadio del desarrollo larvario⁽³³⁾.

A diferencia de los insecticidas fúngicos, los que como ya se mencionó, no necesariamente deben ser ingeridos para causar infección, los virales deben ingresar al huésped. Principalmente lo hacen por vía oral, motivo por el cual deben ser utilizados antes de detectarse daños económicos de consideración. Otras vías alternativas de ingreso al insecto son a través de los espiráculos o por medio de parásitos portadores del patógeno^(34,35).

1.1.6.1.2.3. Insecticidas bacterianos.

Se ha identificado una gran variedad de bacterias patógenas para los insectos. La mayoría de ellas pertenecen a las familias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae y Bacillaceae.

Con excepción de esta última, las restantes están integradas por microorganismos asporógenos.

Se han aislado aproximadamente 100 bacterias con marcado potencial insecticida, pero solo cuatro de ellas (Bacillus thuringiensis, Bacillus sphaericus, Bacillus lentimorbus y Bacillus popilliae) han sido detenidamente examinadas

para su empleo en el control de plagas.

Es un hecho de significativa importancia, que sólo - aquellas bacterias capaces de esporular, hayan sido utilizadas como agentes bioinsecticidas. Esto se debe, probablemente, a que los preparados comerciales a base de esporos, han demostrado ser lo suficientemente estables, en el medio ambiente, como para asegurar el éxito del control.

Con fines evidentemente prácticos, un "insecticida - bacteriano" es definido como una bacteria, producto o actividad de la misma que produce la muerte en insectos. Por - "control bacteriano" se entiende la influencia adversa de - una bacteria sobre un insecto.

Los microorganismos pertenecientes a la familia Bacillaceae han recibido la mayor atención. Entre sus exponentes más destacados encontramos a los cuatro bacilos citados con anterioridad. Todas estas bacterias son capaces de esporular. Bacillus thuringiensis y Bacillus popilliae, presentan la peculiaridad de formar, durante su ciclo vital, una estructura cristalina discreta que acompaña al esporo, mientras que Bacillus lentimorbus y Bacillus sphaericus son -- acristalíferos ^(5,12) .

Desde el punto de vista de la asociación natural con el huésped, Bacillus popilliae y Bacillus lentimorbus son - patógenos obligados, mientras que Bacillus sphaericus y Bacillus thuringiensis son patógenos no obligados.

Bacillus popilliae es una bacteria cristalófora, patógena para varias especies de escarabajos ⁽³⁶⁾ . Cuando los esporos de este microorganismo son ingeridos por larvas de la especie sensible, se produce una invasión del hemocel -- del huésped. Tras la eclosión de los esporos, seguida de ciclos de proliferación de las células vegetativas del bacilo y subsecuente esporulación, se produce la muerte de la larva. La masa de esporos acumulada en la larva muerta, es liberada en los alrededores. Estos esporos pueden ser ingeridos por otras larvas de escarabajos, iniciando un nuevo ciclo infectivo.

La infección producida por este microorganismo es conocida como "muerte lechosa", debido al aspecto lechoso que presenta la hemolinfa del insecto que contiene los esporos de Bacillus popilliae. La muerte causada por Bacillus lentimorbus presenta las mismas características. No obstante, la producida por Bacillus popilliae se conoce como "muerte tipo A" y la producida por Bacillus lentimorbus "muerte tipo B". Ambos tipos pueden ser perfectamente diferenciados por el color que toman las larvas muertas y por la presencia de cuerpos parasporales refráctiles adyacentes a los esporos de Bacillus popilliae, cuya presencia no es detectable en el caso de Bacillus lentimorbus.

Teóricamente, ambos microorganismos representarían una forma de insecticida microbiano perpetuo, pero las propiedades físicas y químicas de los suelos, así como también las condiciones climáticas y las prácticas de uso habitual en agricultura y horticultura, influyen negativamente sobre su natural eficacia⁽³⁷⁾.

Algunas especies de mosquitos son reconocidas por ser transmisoras de enfermedades que causan serios problemas a la salud humana. Desde 1940, los mosquitos han sido controlados principalmente con el empleo de pesticidas orgánicos, pero con el desarrollo de resistencia observada entre las poblaciones de estos insectos, acoplado a los altos costos de los insecticidas químicos basados en derivados del petróleo, han llevado al hombre a la búsqueda de métodos alternativos de control. Una buena alternativa es el control bacteriano⁽³⁸⁾.

Bacillus sphaericus, es otra importante bacteria de la familia Bacillaceae. Posee una marcada actividad insecticida sobre larvas de mosquitos, afectando sensiblemente a los miembros de las especies Culex, Anopheles y Aedes⁽³⁹⁾.

No todas las cepas de Bacillus sphaericus poseen la misma actividad larvicida. La potencia de la bacteria varía notablemente con la especie de mosquito a la que es enfrentada. Así por ejemplo, las larvas de Culex y Anopheles sue-

len ser más sensibles que las de Aedes⁽⁴⁰⁾. Así mismo, existen también cepas de Bacillus sphaericus que no son tóxicas, siendo totalmente imposible, por métodos bioquímicos clásicos, diferenciarlas de aquellas con actividad insecticida (41). Se han aislado varias cepas de este microorganismo, todas ellas reconocidas y aceptadas por la Organización Mundial de la Salud, pero sólo una de ellas, conocida universalmente como la cepa 1593, ha sido hallada como la más apta por su alto potencial larvicida⁽⁴²⁾, además de ser estable y fácil de desarrollar a nivel industrial⁽⁴³⁾. El cultivo de ésta en gran escala, se puede llevar a cabo empleando medios de cultivo a base de subproductos industriales o medios sintéticos. En general se emplean aminoácidos como la fuente preferida de Nitrógeno, requiriendo además, para su desarrollo, la presencia de biotina y tiamina y sales de Ca^{+2} y Mn^{+2} para la esporulación⁽⁴⁴⁾.

De las bacterias entomopatógenas presentadas, sólo falta hacer mención de Bacillus thuringiensis. Debido a que una cepa de este microorganismo fue utilizada para realizar el presente trabajo, el tratamiento y consideraciones particulares sobre la misma se desarrollan separadamente.

2. CONTROL BIOLÓGICO POR BACILLUS THURINGIENSIS

2.1. Microorganismo.

Los microorganismos entomopatógenos han recibido la atención de microbiólogos e insectopatólogos por más de 100 años.

En 1902, Ishiwata, realiza en Japón el primer aislamiento de una bacteria esporógena, responsable de la muerte de gusanos de seda. Este microorganismo no fue objeto de estudios detallados hasta que en 1915, otros dos investigadores japoneses, Aoki y Chigasaki, observaron que sólo los -- cultivos bien esporulados del bacilo aislado por Ishiwata, -- podían causar la muerte de gusanos de seda, cuando éstos -- los ingerían. Este fenómeno no fue observado con los culti-- vos en fase vegetativa. Estos investigadores notaron tam--- bién que las larvas que habían ingerido los cultivos esporu-- lados adquirirían rápidamente la sintomatología clásica pre-- via a su muerte, sugiriendo que ello se debía a la expresión de una acción tóxica.

Prácticamente en forma simultánea, Berliner aisla en Thuringia, Alemania, una bacteria con características similares, a partir de larvas muertas de polillas de la harina. Este microorganismo fue denominado Bacillus thuringiensis - (45) .

2.1.1. Clasificación de la especie Bacillus thuringiensis.

En la octava edición del Manual Bergey⁽⁴⁶⁾, la familia Bacillaceae es dividida en cinco géneros. Al primero de ellos, género Bacillus, pertenecen las bacterias entomopatógenas que revisten mayor importancia.

El género Bacillus está dividido en dos grupos. El grupo I, comprende 22 especies de amplia distribución, mientras que el grupo II comprende 26 especies, las cuales han recibido menor atención. Bacillus thuringiensis es el sexto

integrante del grupo I.

Los microorganismos pertenecientes a esta especie se diferencian de Bacillus cereus por ser patógenos para larvas de lepidópteros y por la producción de un cuerpo cristalino en la célula (raramente 2 o 3) durante la fase de esporulación. Son móviles, aerobios, esporógenos, tienen un ancho de 1,0 a 1,2 micrones y un largo de 3 a 5 micrones. Desarrollan a temperaturas desde 10 hasta 45°C. Son Gram positivos, peroxidasa positivos, acetilesterasa positivos, hidrolisan el almidón y caseína y reducen NO_3^- a NO_2^- .

En 1946, Smith y colaboradores⁽⁴⁷⁾ proponen que Bacillus thuringiensis sea considerado una variante de Bacillus cereus. Años más tarde, en 1958, Heimpel y Angus⁽⁴⁸⁾ dan los lineamientos generales para clasificar a los bacilos cristalóforos. Finalmente, en 1960, los mismos autores⁽⁴⁹⁾ recomiendan que Bacillus thuringiensis sea reconocida como una especie separada. En los años 1962, 1968 y 1973, de Barjac y Bonnefoi^(50,51,52) desarrollan un esquema de clasificación de Bacillus thuringiensis basado en el análisis serológico de los antígenos flagelares (H). Esta clasificación que hoy divide a la especie en 28 serotipos, es la más ampliamente difundida y empleada con mayor frecuencia en la bibliografía al hacer referencia a una cepa en particular de Bacillus thuringiensis. Así por ejemplo, la cepa utilizada en el presente trabajo es conocida como Bacillus thuringiensis variedad kurstaki serotipo 3a3b. A pesar de la difusión generalizada de esta clasificación, se han desarrollado otros métodos para clasificar a la especie. Norris, en 1964⁽⁵³⁾ descubre, por análisis electroforético, que los "patterns" de esterases de células vegetativas de Bacillus thuringiensis, eran diferentes para cada serotipo. Sekijima y Ono⁽⁵⁴⁾, en 1982, proponen clasificar a la especie en base a los antígenos somáticos-O-estables al calor. Una clasificación más reciente debida a De Lucca II⁽⁵⁵⁾, divide a la especie en base a la reactividad de sus miembros frente a lectinas de distinta naturaleza.

Tabla N°1

Clasificación de Bacillus thuringiensis en base al -
análisis serológico de los antígenos flagelares (H).

variedad	serotipo
thuringiensis	1
finitimus	2
alesti	3a
kurstaki	3a3b
sotto	4a4b
dendrolimus	4a4b
kenyae	4a4c
galleriae	5a5b
canadensis	5a5c
entomocidus	6
subtoxicus	6
aizawai	7
morrisoni	8a8b
ostriniae	8a8c
tolworthi	9
darmstadiensis	10
toumanoffi	11a11b
kyushuensis	11a11c
thompsoni	12
pakistani	13
israelensis	14
indiana	15
dakota	16
tohokuensis	17
kumanotoensis	18
tochigiensis	19
wuhanensis	20
colmeri	21

2.1.2. Productos tóxicos de Bacillus thuringiensis y acción tóxica de los mismos.

La actividad larvicida que caracteriza a Bacillus thuringiensis frente a una gran variedad de lepidópteros, es atribuida a la producción de una serie de factores. Estos pueden ser agrupados en dos categorías. La primera de ellas incluye a las toxinas propiamente dichas o toxinas verdaderas, que comprende a la proteína cristalina o delta-endotoxina y a exotoxinas identificadas por su estabilidad al calor. La segunda categoría está integrada por los esporoviables y las exoenzimas.

Teóricamente es posible que las entidades nombradas se encuentren en los cultivos de Bacillus thuringiensis en cantidades suficientes como para ser cuantificadas, pero la producción de ellas se ve afectada por la composición de los medios de cultivo utilizados, como así también por la estabilidad propia de cada una de ellas⁽⁴⁵⁾.

Bacillus thuringiensis variedad kurstaki es una bacteria que presenta un particular interés científico y económico debido a que produce, concomitantemente al proceso de esporulación, una inclusión parasporal cristalina, también llamada delta-endotoxina⁽⁵⁶⁾ o simplemente "cristal", la cual es letal para una amplia gama de lepidópteros^(57,58).

Este cristal, en estado nativo, se presenta bajo la forma de protoxina, totalmente insoluble a pH neutro. A diferencia de la mayoría de los insecticidas de amplia difusión, este cristal no es un veneno de contacto, motivo por el cual, debe ser necesariamente ingerido por la larva del insecto sensible, para ejercer su efecto tóxico. Una vez alojado en el intestino del insecto debe ser solubilizado y activado, adquiriendo de esta forma características letales.

Debido a que su solubilización se lleva a cabo a altos valores de pH, se torna comprensible el porqué de su alta especificidad para larvas de lepidópteros. Estos insectos presentan en su jugo intestinal valores de pH que oscilan entre 9 y 10,5, condición ésta que crea un entorno ade-

cuado para la solubilización del cristal.

Lecadet y Dedonder, en estudios sucesivos^(59,60,61), mencionan la presencia, en el jugo intestinal de Pieris brassicae, de dos clases de enzimas proteolíticas, de acción similar a la de la tripsina y quimiotripsina, capaces de disolver a la delta-endotoxina. Faust y colaboradores⁽⁶²⁾, sugirieron que la disolución del cristal, in vivo, es debida principalmente al elevado valor de pH local originado por el contenido intestinal de CO_3K_2 , más que a una verdadera acción proteolítica.

Los estudios realizados recientemente por Toja y Aizawa⁽⁶³⁾, con larvas de gusanos de seda, revelaron que las proteasas presentes en el jugo intestinal de estos insectos son esenciales para facilitar la disolución del cristal. Estos autores postularon que el pH que presenta el contenido intestinal de las larvas de lepidópteros, causa principalmente un ablandamiento o aflojamiento de la estructura del cristal. Las enzimas proteolíticas actuarían solamente sobre aquellos cristales que hubiesen sufrido tal modificación.

Una vez que el cristal es disuelto y activado, es decir, durante el pasaje de protoxina a toxina, se produce la liberación de polipéptidos que ejercerán su acción tóxica, originando en el insecto síntomas patológicos característicos. Dependiendo de la dosis, la respuesta tóxica puede variar desde una cesación temporaria de la ingesta, hasta una parálisis total y muerte posterior.

En primera instancia se produce un ataque a las células del epitelio intestinal, pudiéndose observar una separación celular y eventual ruptura total de la membrana basal. Como consecuencia del ataque, se ve aumentada la actividad secretora del epitelio intestinal. Se incrementa la permeabilidad a los iones sodio y potasio, aumentando considerablemente la concentración de este último en la hemolinfa. Así mismo, se ve estimulada la velocidad de demanda de glucosa por parte del intestino medio. El insecto finalmente -

muere horas después de haber ingerido el cristal ^(64,65,66) .

Debido a las condiciones de alcalinidad presentes en el jugo intestinal de las larvas de lepidópteros, los esporos de Bacillus thuringiensis no encuentran un entorno adecuado para su desarrollo. Esto hace que los esporos por sí solos no puedan ejercer un efecto tóxico. No obstante si -- una larva sensible ingiere una suspensión de esporos y cristales, la acción tóxica producida por los últimos, puede -- permitir a los esporos atravesar la pared del intestino y -- pasar al hemocel o cavidad general del insecto. Bajo estas circunstancias, los esporos encuentran condiciones más propicias para su germinación. Tras su eclosión, las células vegetativas de Bacillus thuringiensis inician ciclos de multiplicación y esporulación. La bacteria finalmente invade -- el hemocel, pudiendo morir el insecto por una verdadera septicemia. Por lo general, la acción tóxica de Bacillus thuringiensis es consecuencia de una acción combinada de cristales y esporos. No obstante, el carácter letal de este microorganismo es debido principalmente a la acción tóxica de la delta-endotoxina, actuando los esporos como coadyuvantes de la misma ^(8,45) .

Es importante recalcar que si bien la cepa empleada en el presente trabajo no produce exotoxinas es actualmente utilizada, a nivel industrial, en la elaboración de insecticidas biológicos por presentar un nivel tóxico varias veces superior al presentado por distintas cepas de la variedad thuringiensis, empleadas hasta el aislamiento de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki ⁽¹²⁾ .

2.1.2.1. El cristal de Bacillus thuringiensis.

Como se indicara oportunamente, Bacillus thuringiensis produce durante el proceso de esporulación, una inclusión parasporal cristalina, también llamada delta-endotoxina o simplemente "cristal".

En cultivos de este microorganismo la formación del cristal comienza a evidenciarse dos o tres horas después de

finalizada la fase de crecimiento exponencial^(67,68), coincidiendo con las fases III a IV de la esporulación⁽⁶⁹⁾.

Estudios realizados con marcadores radiactivos, pusieron en evidencia que la síntesis de la casi totalidad de las proteínas constituyentes del cristal, se lleva a cabo de novo durante la etapa de formación del espora⁽⁷⁰⁾. Pequeñas cantidades de los componentes del cristal, son también sintetizados por las células en estado vegetativo⁽⁷¹⁾.

Si bien existen opiniones coincidentes sobre la existencia de un marcado sincronismo entre los fenómenos de formación del espora y síntesis del cristal, la relación existente entre estas dos entidades, ha generado controversias.

Así por ejemplo, Somerville⁽⁶⁸⁾ demostró en estudios efectuados por microscopía electrónica, que la formación del cristal está estrechamente asociada a la formación del exospora. No obstante, Bechtel y Bulla Jr⁽⁷²⁾, sugirieron que el cristal es sintetizado sin ninguna clara asociación con algún componente del espora. Sin embargo, estudios efectuados solubilizando las proteínas presentes en la pared del espora y enfrentándolas con antisuero obtenido a partir del cristal solubilizado, revelaron una total inactivación de las primeras. Estos resultados pusieron en evidencia la existencia de una estrecha asociación entre la formación del exospora y síntesis del cristal⁽⁷³⁾.

Nishimura y Nishiitsutsuji-Uwo⁽⁷⁴⁾, obtuvieron mutantes asporógenos, con la idea de investigar la formación del cristal. Si bien las cepas obtenidas por mutación no formaban esporos, la esporulación en ellas progresaba normalmente hasta la etapa III.

Estos autores, si bien no lograron encontrar relación morfológica alguna entre las primeras etapas de la esporulación y síntesis de la delta-endotoxina, ponen especial atención al hecho de que en sus estudios no observaron formación de cristales, sin que antes se alcanzaran los primeros estadios de la esporulación.

Existen evidencias de que la síntesis del cristal de

distintas especies de Bacillus thuringiensis, podría estar sometida a regulación por plásmidos⁽⁷⁵⁾. De hecho, los genes que contienen la información para la síntesis de la protoxina, en el caso particular de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki HD-1, han sido localizados en plásmidos^(76, 77) y en el cromosoma⁽⁷⁸⁾.

Evidentemente, existiendo de por medio un fenómeno temporal para la aparición del cristal, la célula debe elaborar señales reguladoras para asegurar la producción de la protoxina en un momento dado y en cantidades necesarias para formar la inclusión. Así, Minnich y Aronson⁽⁷⁹⁾, efectuaron estudios trabajando a distintas temperaturas y realizando transferencias de plásmidos a mutantes acristalíferos, - en los cuales se había detectado la ausencia de uno o más plásmidos presentes en la cepa salvaje, lograron establecer la presencia en el caso de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki, de plásmidos que contienen la información para la síntesis de la protoxina y otros que regulan la cantidad de protoxina a formar y finalmente un plásmido que regula la expresión de los anteriores en base a la temperatura a la cual se halla el cultivo.

El control para la biosíntesis del cristal, según Klier y colaboradores⁽⁸⁰⁾, se realiza a nivel de la transcripción. Se ha demostrado que en las células vegetativas existe una RNA-polimerasa-I que no se une al promotor de la secuencia de genes que codifican la protoxina, pero en la etapa de esporulación aparece una RNA-polimerasa-II que sí es capaz de unirse a dicho promotor para comenzar la transcripción.

Químicamente el cristal es una glicoproteína. La importancia que tiene el mismo en la fisiología de Bacillus thuringiensis es obvia si tenemos en cuenta que representa aproximadamente entre el 20 y el 30% del peso seco de la célula^(81, 82, 83).

Está formado por varias subunidades cuyo peso molecular aproximado es de $1,34 \times 10^5$ daltons. Esta glicoproteína

se presenta como una protoxina la que, bajo determinadas -- condiciones, es convertida en una molécula tóxica de peso -- molecular aparente $6,8 \times 10^4$ daltons ^(82,84). En base a es-- tas determinaciones de peso molecular se llegó a la conclu-- sión que la subunidad constituyente del cristal es un díme-- ro ⁽⁸⁵⁾.

Huber y colaboradores ⁽⁸⁶⁾ determinaron que la estruc-- tura del cristal está soportada por la presencia de puentes disulfuro entre las distintas subunidades. Aparentemente la reducción de estos enlaces es la única modificación covalen-- te necesaria para disolver el cristal sin pérdida de la to-- xicidad.

El cristal de Bacillus thuringiensis está compuesto-- aproximadamente por un 95% de proteínas y un 5% de carbohi-- dratos. Los ácidos aspártico y glutámico son los aminoáci-- dos más abundantes, llegando a totalizar un 25% del conteni-- do de la fracción protéica del cristal. Por análisis cuanti-- tativo de azúcares se pudo determinar que la glucosa en un 3,8% y manosa en un 1,8%, son los únicos carbohidratos pre-- sentes ⁽⁸⁵⁾. Sin embargo los cristales formados por otra -- subespecie, Bacillus thuringiensis variedad israelensis, le-- tal sólo para varias familias de dípteros tales como mosqui-- tos ^(87,88,89,90), moscos domésticas ⁽⁹¹⁾ y jejenes ⁽⁹²⁾, pre-- senta una distribución de azúcares diferente. Además de glu-- cosa y manosa, contiene fucosa, ramnosa, xilosa y galactosa-- mina ⁽⁸⁴⁾.

Desde el punto de vista de su conformación espacial, el cristal es una bipirámide de base cuadrada, compuesto -- por subunidades esféricas que presentan un empaquetamiento-- cúbico compacto ^(93,94). Si bien la mayoría de las subespe-- cies de Bacillus thuringiensis producen un solo cristal con estas características, la variedad israelensis puede produ-- cir dos o tres cristales de tamaño y forma variable ^(7,84).

La forma del cristal es relativamente constante, no-- así su tamaño, el que puede verse afectado por las condicio-- nes de operación y medios de cultivo empleados ^(45,95).

3. PRODUCCION DE INSECTICIDAS BIOLÓGICOS

La producción en escala industrial de microorganismos entomopatógenos puede llevarse a cabo por medio de la utilización de dos clases de técnicas:

a) Empleando procesos fermentativos (procesos in vitro).

b) Empleando huéspedes sensibles vivos (procesos in vivo).

En el primero de estos casos, la fermentación puede realizarse empleando cultivos sumergidos o bien por desarrollo del microorganismo en cultivos con sustrato sólido (cultivos en superficie). La utilización de estas técnicas se ve limitada al caso particular de entomopatógenos facultativos.

Los procesos in vivo son empleados para la producción de patógenos obligados⁽⁵⁾.

3.1. Producción industrial de Bacillus thuringiensis.

Desde que se observó que la actividad insecticida de preparados a base de Bacillus thuringiensis podía sufrir variaciones sustanciales, muchos autores supusieron la existencia de una relación entre la producción de delta-endotoxina y la cepa utilizada.

Es un hecho demostrado que la toxicidad de distintas cepas de Bacillus thuringiensis puede variar significativamente con la composición del medio de cultivo y condiciones de operación empleados en la elaboración. De hecho, es totalmente incorrecto decir que la utilización de una estirpe con demostrada actividad insecticida pueda garantizar buenos resultados.

Estas observaciones ponen en evidencia que la elección del medio de cultivo y condiciones de operación a ser

empleados en la producción industrial, deben ser elegidos.- con detenimiento en vías de asegurar el éxito de la fermentación.

La producción de Bacillus thuringiensis es, en primera instancia, un problema evidentemente tecnológico^(96,97).

Los procesos en cultivo sumergido han sido elegidos como los más apropiados para llevar adelante la producción en gran escala de Bacillus thuringiensis.

En la figura N°1 se presenta una línea de producción típica para la obtención de Bacillus thuringiensis en cultivo sumergido.

El desarrollo del microorganismo se inicia a partir de cepas conservadas por liofilización o congelamiento en Nitrógeno líquido. A partir de ellas se siembran tubos con agar inclinado, los que se dejan desarrollar 24 a 48 horas. Estos tubos son empleados para sembrar erlenmeyers que serán utilizados como inóculos de uno o más tanques agitados de pequeña escala, para finalmente llegar al tanque de producción. La cantidad de inóculo puede variar, no obstante la misma está comprendida dentro del rango de un 2 a 5% en volumen del fermentador principal. Los fermentadores utilizados tienen un volumen que varía entre 50.000 y 125.000 litros.

3.1.1. Medios de cultivo empleados a nivel industrial.

Los medios utilizados están compuestos por fuentes de Carbono, fuentes de Nitrógeno y factores de crecimiento y sales minerales. La mayoría de ellos están constituidos completamente por productos naturales o subproductos industriales. Así por ejemplo, como fuentes nitrogenadas se suele emplear harina de pescado, harina de semillas de algodón, agua de macerado de maíz, harina de soja, autolizados de levadura y caseína⁽⁸⁾. Como fuentes de Carbono se utilizan hidrolizados de maíz, almidón y dextrosa⁽⁹⁷⁾.

Dada la importancia económica del tema, es muy escasa la bibliografía sobre condiciones de cultivo y medios de

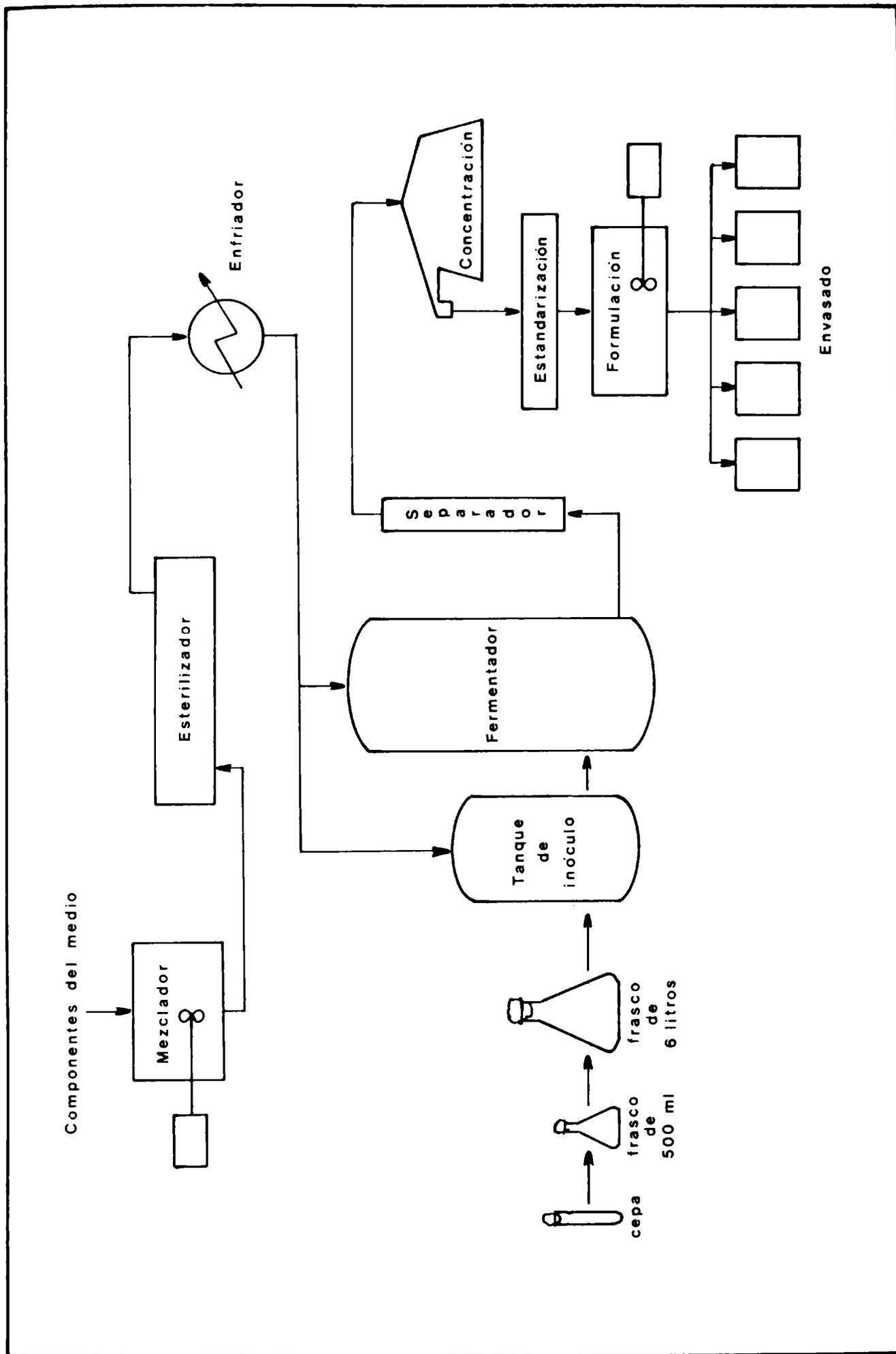


Figura N°1. Línea de producción de Bacillus thuringiensis en cultivo sumergido.

producción, limitándose prácticamente a patentes internacionales. Así se sugiere el empleo de melaza de remolacha o caña en concentración de 1,86%, harina de semillas de almidón al 1,4%, agua de macerado de maíz al 1,7% (en base a sólidos) y 0,1% de CaCO_3 . Con este medio se mencionan concentraciones finales de 2 a 5×10^9 esporos/ml. Los medios más característicos empleados contienen combinaciones de harina de pescado de 3 a 5%, harina de semillas de algodón de 2 a 3%, harina de soja de 2 a 3%, $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ al 1% y almidón de 0,5 a 1%⁽¹²⁾. El pH de los medios es generalmente ajustado entre 7,00 a 7,60 y la temperatura de cultivo mantenida a -30°C .

La bibliografía hace especial incapié en la necesidad de contar con cultivos bien aireados para alcanzar una alta frecuencia de esporulación y formación de cristales^(98, 99). Se ha observado que en medios de cultivo bajo condiciones de aireación deficiente, Bacillus thuringiensis puede desarrollarse y multiplicarse, pero para obtener una buena esporulación y síntesis de delta-endotoxina son necesarias energéticas condiciones de aireación⁽⁸⁾.

3.1.2. Separación y formulación de las pastas celulares.

Una vez concluida la etapa de producción del cultivo, los esporos y cristales deben ser separados del caldo. De la totalidad de éste, generalmente menos del 10% es recuperado bajo la forma de esporos, cristales, restos celulares y gran cantidad de sólidos, motivo por el cual se debe proceder a una separación primaria a fin de recuperar los esporos y cristales. Las técnicas de separación generalmente utilizadas son por centrifugación o filtración de la totalidad del caldo⁽¹⁰⁰⁾. La pasta celular obtenida por estas vías es posteriormente procesada para darle a los productos formas comerciales. Por lo general los productos terminados son presentados como polvos mojables, líquidos emulsionables y en menor proporción como granulados⁽¹⁰¹⁾.

Los polvos conteniendo Bacillus thuringiensis, son -

manufacturados por secado spray de la totalidad del caldo o de la pasta celular⁽⁹⁾. Los concentrados celulares también pueden ser secados en secadores al vacío trabajando a temperaturas de aproximadamente 50°C⁽¹⁰²⁾. La torta seca así obtenida, es posteriormente pulverizada⁽¹⁰⁰⁾.

Para obtener productos líquidos, el proceso descrito por Cords⁽¹⁰²⁾ es el más empleado. En este procedimiento el pH de la pasta celular es ajustado entre 3,5 y 4,5 y luego se le adicionan sales minerales y productos oleosos para estabilizar los preparados. Cords hace referencia a otra forma alternativa de obtener preparados líquidos por molienda de las pastas celulares secas y agregado de agentes conservadores y aceites, la que es emulsificada con agua y pequeñas cantidades de agentes emulsionantes.

Además de poseer un marcado potencial insecticida, los preparados comerciales deben cumplir con una serie de requisitos, de forma tal de asegurar el éxito del control. Por tal motivo, los formulados comerciales llevan incorporados una serie de aditivos. Una vez efectuada la aplicación a campo, los insecticidas biológicos se deben dispersar adecuadamente sobre las superficies de las hojas o de los frutos de los cultivos a proteger de la acción de los insectos, formando un película líquida o sólida estable. Muchos materiales han sido empleados con tal propósito, incluyendo entre otros leche en polvo, caseína, gelatina, saponinas y jabones. En primera instancia muchos de ellos han sido utilizados en forma empírica, pero con posterioridad se puso énfasis en la utilización de compuestos más específicos y de reconocida eficacia⁽¹⁰³⁾.

No es suficiente que el producto se haya dispersado adecuadamente, sino que además debe quedar perfectamente adherido a la superficie del cultivo a proteger, de forma tal que no sea removido por acción del viento, lluvias o formación de rocío. A tal fin se han utilizado harinas, dextrinas, gomas y compuestos sintéticos como el caso de cloruro de polivinilo, que forma una suspensión dispersable en -

agua la que, una vez seca, forma películas insolubles que resisten la acción de la lluvia⁽¹⁰⁴⁾.

Dada la sensibilidad de las formulaciones comerciales a la acción de las radiaciones solares, especialmente a la luz ultravioleta, que afectan considerablemente la perdurabilidad de los preparados en el medio ambiente, los productos llevan incorporados protectores contra las mismas.

Se suelen incorporar también estimulantes de la ingestión, de forma tal de atraer a los insectos hacia los focos en donde se encuentra concentrado el principio activo.

Es evidente que los aditivos deben ser seleccionados con extrema precaución ya que los mismos no deben reducir la viabilidad de los esporos ni producir efectos desnaturantes sobre la delta-endotoxina⁽⁸⁾.

3.1.3. Estandarización de las formulaciones.

Hasta hace unos años, los insecticidas biológicos a base de Bacillus thuringiensis eran estandarizados en base al número de esporos viables por unidad de volumen o unidad de peso de los productos terminados. No obstante, cuando se descubrió que dos cepas que dieran origen al mismo número de esporos podían presentar niveles de actividad tóxica muy diferentes frente al mismo insecto⁽⁹⁷⁾, se debió recurrir a una nueva metodología para estandarizar las formulaciones. Actualmente la actividad insecticida de los preparados comerciales es expresada en Unidades Internacionales⁽⁹⁶⁾ determinadas en ensayos biológicos o bioensayos, comparando la potencia de los productos con una preparación estandarizada preparada en el Instituto Pasteur de París, a la cual se le ha asignado en forma arbitraria una actividad de 1.000 Unidades Internacionales/mg. Los productores preparan sus propios estándares secundarios y los enfrentan en ensayos biológicos frente a los productos por ellos elaborados a fin de estandarizar la potencia de los preparados comerciales -
(12)

4. O B J E T I V O S

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una tecnología nacional de producción de un insecticida biológico a base de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki.

Para alcanzar tal objetivo se debieron cumplimentar etapas parciales:

a) Seleccionar condiciones de aireación adecuadas a nivel de erlenmeyers agitados que aseguraran una alta tasa de esporulación y formación de cristales.

b) Estudiar las necesidades nutricionales del microorganismo para definir la composición de un medio de cultivo adecuado para su desarrollo.

c) Poner a punto un ensayo biológico y un método inmunoelectroforético para el dosaje de la actividad tóxica de los preparados.

d) Estudiar en escala de tanques agitados a nivel de laboratorio, diferentes sistemas de producción (cultivo discontinuo y discontinuo alimentado) con medios con alta concentración de nutrientes para alcanzar elevadas productividades.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

1. MATERIALES Y METODOS

1.1. Microorganismo.

Para la realización del presente trabajo se empleó una cepa de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki HD-1 serotipo 3a3b, gentilmente cedida por el Northern Regional-Research Laboratory (Preoria, Illinois). Esta fue mantenida por liofilización para disponer de la misma por períodos de tiempo prolongados. A partir de estos liofilizados, se sembraron periódicamente tubos con agar inclinado del Medio de mantenimiento (ver composición en el punto 1.3.), los que fueron llevados para su desarrollo a cuarto estufa a 30°C durante 48 horas. Estos tubos fueron conservados en heladera a 4°C por períodos de tiempo inferiores a 6 meses, luego de lo cual se procedió a la apertura de un nuevo liofilizado.

1.2. Inóculos.

Los tubos conservados en heladera a 4°C, como se indicara anteriormente, fueron utilizados para la preparación de los inóculos.

A tal fin, el desarrollo celular de los mismos, fue resuspendido con 15 ml de solución fisiológica, con ayuda de un ansa en anillo. Erlenmeyers de 1.000 ml, conteniendo 100 ml de Medio de inóculo (ver composición en el punto 1.3.), fueron sembrados con 2 ml de dicha suspensión, alcanzándose una concentración inicial de 2,5 a 3,5 x 10⁶ esporos/ml de medio de cultivo. Luego de 15 horas de incubación a 30°C en cuarto estufa, trabajando en agitador rotatorio, suficiente volumen del desarrollo celular alcanzado en el Medio de inóculo, fue transferido a los erlenmeyers o tanques conteniendo medio de proceso, con la idea de alcanzar-

una concentración celular inicial de 1 a 4×10^7 células/ml de medio de proceso.

En el caso particular de los estudios realizados sobre la influencia del agregado de iones, se partió del desarrollo celular obtenido en los tubos conservados en heladera a 4°C. Dicho desarrollo fue resuspendido con agua destilada estéril. Suficiente volumen de la misma se utilizó como inóculo de los medios de proceso con la idea de alcanzar la concentración inicial antes mencionada.

1.3. Medios.

En la realización del presente trabajo se emplearon los medios que se detallan a continuación:

Medio de mantenimiento (g/l): extracto de levadura, 2; extracto de carne, 1; peptona, 5; NaCl, 5; agar, 15. El pH se ajustó a 7,2 antes de esterilizar.

Medio de inóculo (g/l): extracto de levadura, 4; glucosa, 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,041; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 4; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,030; K_2HPO_4 , 3; KH_2PO_4 , 3.

En la Tabla N°2 se detalla la composición de los medios de referencia utilizados en los procesos, los cuales fueron tomados como base para los estudios realizados. Las modificaciones introducidas a cada uno de ellos se indican en los puntos correspondientes.

Preparación del extracto de raíz de malta (ERM): 1 parte de brote de raíz de malta más 10 partes de agua destilada se llevaron a ebullición durante media hora con agitación periódica. El líquido se separó por filtración y posterior centrifugación para obtener una solución límpida. El extracto así obtenido presentó un residuo seco de 34,2 g/l y una concentración de Nitrógeno total de 5,39 g por cada 100 g de sólidos de ERM, determinada por el método de micro Kjeldahl (105).

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave-

Tabla N°2

Composición de los medios de referencia.

Componentes (g/l)	Medios N°							
	1	2	3	10	12	25	71	80
*Glucosa	2	10	10	10	10	10	8	8
(NH ₄) ₂ SO ₄		1	1	1	1	1	1	1
**Extracto de levadura	15	4	4	4	4	4	4	4
**Bacto peptona			4					
CaCl ₂ .2 H ₂ O		0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
MgSO ₄ .7 H ₂ O		4	4	4	4	1	1	1
MnSO ₄ . H ₂ O		0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
FeSO ₄ .7 H ₂ O		0,0135	0,0135					
CuSO ₄ .5 H ₂ O		0,0075	0,0075					
ZnSO ₄ .7 H ₂ O		0,0075	0,0075					
KH ₂ PO ₄	3	3	3	3	3	3	3	1
K ₂ HPO ₄	3	3	3	3	3	3	3	1

* Carlo Erba; ** Difco. Los restantes componentes de los medios que figuran en la Tabla son grado analítico.

a 121°C durante 15 minutos.

Previamente a su esterilización, los medios fueron divididos en cuatro fracciones (fuente de Carbono, fuente de Nitrógeno, sales minerales y buffer) para evitar interacciones indeseables. Luego de esterilizados, los medios se integraron en campana de flujo laminar.

El pH de los medios líquidos fue ajustado a 7,00 antes de su esterilización.

En el caso particular de los ensayos en sistema de cultivo discontinuo alimentado, debido a las elevadas concentraciones de nutrientes que, por motivos de diseño, se debieron utilizar en los reservorios de alimentación, se debió recurrir a la esterilización por filtración empleando para tal fin, una unidad filtrante Millipore, equipada con un prefiltro y un filtro de 0,45 y 0,20 micrones de diámetro de poro, respectivamente. La unidad, equipada con los filtros, fue autoclavada a 119°C durante una hora.

1.4. Sistemas de cultivo utilizados.

Los ensayos preliminares destinados a estudiar el efecto del grado de aireación y requerimientos nutricionales sobre el desarrollo de Bacillus thuringiensis, se realizaron empleando erlenmeyers de 1.000 ml de capacidad. El volumen de medio utilizado, sea en el caso del desarrollo de los inóculos como en el caso de los medios para proceso, fue de 100 ml. En el caso particular de los estudios efectuados sobre la influencia del grado de aireación sobre el desarrollo del microorganismo, los volúmenes de medio fueron variados según se detalla oportunamente.

Los ensayos fueron realizados en cuarto estufa a 30°C, donde los erlenmeyers fueron ubicados en agitador rotatorio de 2,5 cm de excentricidad y agitados a 200 r.p.m..

En todos los tratamientos se realizaron repeticiones en el tiempo a fin de establecer la reproducibilidad de re-

sultados.

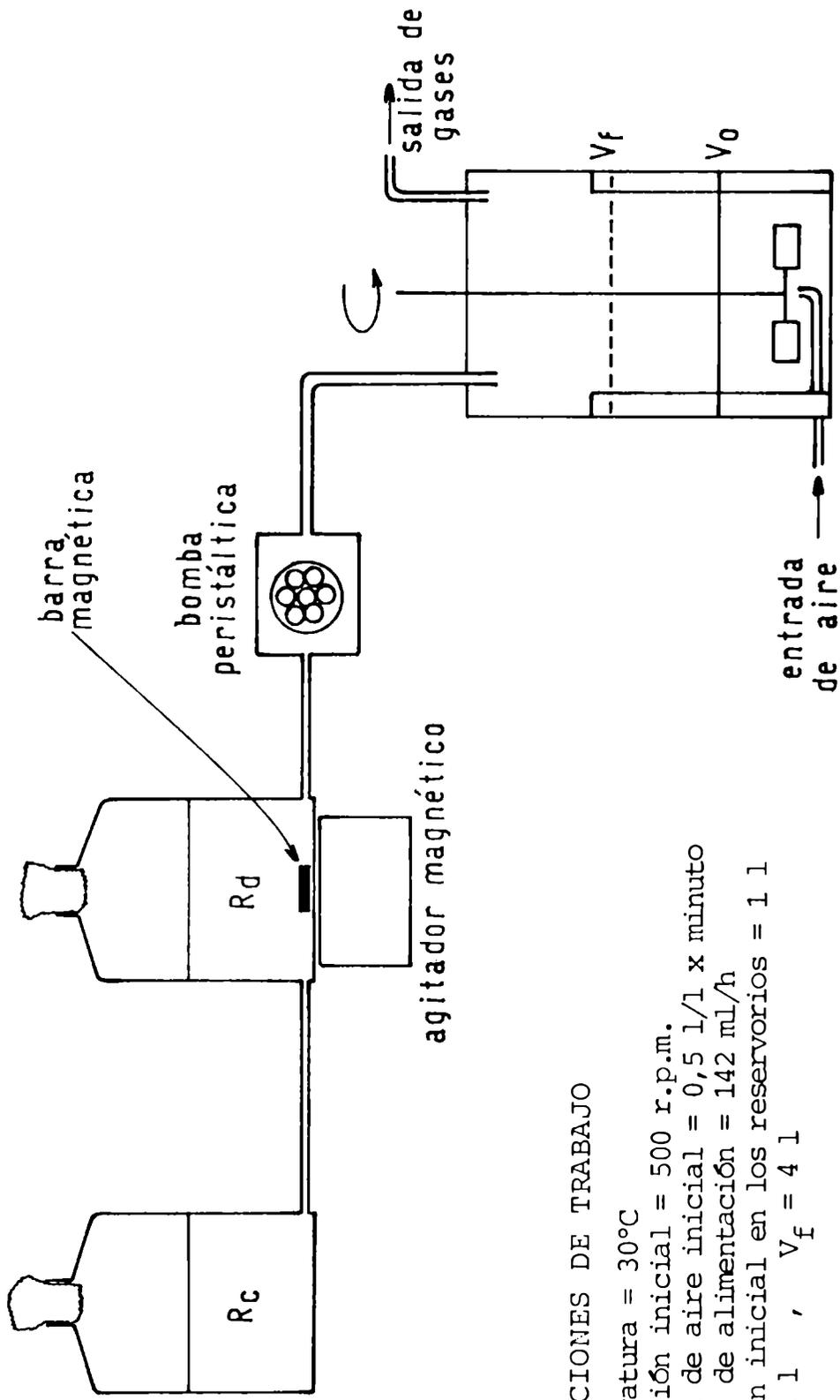
Los estudios de condiciones de operación y efecto de concentraciones crecientes de los componentes del medio de cultivo sobre el desarrollo de Bacillus thuringiensis, se realizaron empleando sistemas de cultivo discontinuo. A tal fin, se utilizaron unidades de fermentación marca LKB, equipadas con reactores de vidrio de 6 l de capacidad total. Estas unidades están provistas además de accesorios para el control de temperatura, pH, agitación, caudal de aire, espuma y O₂ disuelto, sumado a la posibilidad de agregar en forma continua o discontinua, medio de cultivo fresco de acuerdo al sistema de cultivo a emplear.

El volumen de medio de cultivo utilizado en estos ensayos fue de 3 l. Las condiciones iniciales de aireación y agitación fueron fijadas en 0,5 l de aire/l de medio de cultivo x minuto y 500 r.p.m., respectivamente. En aquellos cultivos en que fue necesario, estas condiciones de operación fueron variadas durante el proceso, de modo de evitar que el porcentaje de O₂ disuelto alcanzara valores inferiores al 20% del valor de saturación.

La temperatura durante el cultivo se controló a 30°C. En estos estudios se empleó el mismo esquema de repeticiones que en el caso de los estudios en escala de erlenmeyer.

El control de espuma durante el cultivo se realizó por el agregado de agente antiespumante marca Darmex-Sag 471 en solución acuosa al 10%. Debido a que las unidades de fermentación están equipadas con electrodos para el control de espuma, el agregado de agente antiespumante se realizó en forma automática.

Los estudios en sistema de cultivo discontinuo alimentado (CDA) se llevaron a cabo en el equipo descrito para realizar los estudios en cultivo discontinuo, más los accesorios que se muestran en la figura N°2, con el objeto de adecuarlo al tipo de alimentación y condiciones empleadas, que se detallan en la misma. Este tipo de sistema de cultivo se caracteriza por producir un aumento de volumen en el-



CONDICIONES DE TRABAJO

Temperatura = 30°C
 Agitación inicial = 500 r.p.m.
 Caudal de aire inicial = 0,5 l/l x minuto
 Caudal de alimentación = 142 ml/h
 Volumen inicial en los reservorios = 1 l
 $V_0 = 2 \text{ l}$, $V_f = 4 \text{ l}$

MEDIOS DE CULTIVO

Inicial en el fermentador = N°80 (ver Tabla N°2)
 En Rd = medio N°80 x 10,5
 En Rc = medio N°80 x 31,5

Figura N°2. Esquema del equipo empleado en los estudios en CDA y condiciones de trabajo utilizadas.

fermentador, durante el período de tiempo que dura la alimentación. El medio de cultivo fresco que ingresa al reactor va incrementado su concentración en función del tiempo, dependiendo fundamentalmente la forma del perfil de alimentación de las condiciones de diseño.

En los estudios realizados, el tipo de alimentación obtenido empleando el dispositivo indicado resultó ser lineal⁽¹⁰⁶⁾. Para lograr tal perfil, se recurrió a la utilización de dos reservorios (designados en la figura N°2 como Rc: reservorio concentrado y Rd: reservorio diluido) conectados entre sí y a la atmósfera (vasos comunicantes). El segundo de ellos (Rd), se encuentra agitado mecánicamente durante el período de alimentación y está comunicado al fermentador a alimentar, por medio de una bomba peristáltica. A medida que la bomba envía medio al reactor desde el reservorio Rd, pasa medio concentrado del reservorio Rc al Rd, de forma tal que la concentración de nutrientes en Rd aumenta en función del tiempo. Para lograr este incremento lineal, es necesario que no haya fenómenos de difusión entre los reservorios (la concentración de nutrientes en Rc debe permanecer constante) y que la densidad de las soluciones sea similar.

El diseño de las experiencias se realizó de acuerdo al modelo matemático descrito por Mignone⁽¹⁰⁷⁾, en el cual ambos reservorios son geoméricamente idénticos. Las ecuaciones fundamentales del mencionado modelo, utilizadas para el cálculo de las concentraciones de los reservorios y caudal de alimentación, son las siguientes:

a) Concentración celular:

$$X = \frac{X_0 V_0 + YF \left(S_0 + \frac{V_0 K}{F} \right) t + Kt^2}{V_0 + Ft} \quad (1) \text{ para crecimiento restringido.}$$

Donde:

X = concentración celular (g/l)

X₀ = concentración celular al inicio de la alimentación (g/l).

V_0 = volumen inicial del cultivo discontinuo (l)

Y = rendimiento celular $\left(\frac{\text{g de biomasa producida}}{\text{g de sustrato consumido}} \right)$

F = caudal de alimentación (l/h)

S_0 = concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación (g/l)

t = tiempo de alimentación (h)

El parámetro K se relaciona con los inherentes al cultivo según la ecuación:

$$K = \frac{u_0 X_0}{Y} - \frac{F S_0}{V_0} \quad (2)$$

Donde:

u_0 = velocidad específica de crecimiento que presenta el cultivo en el momento en que se inicia la alimentación (h^{-1})

y con los relativos a las variables tecnológicas de la alimentación con las ecuaciones:

$$S_{DO} = S_0 + \frac{V_0 K}{F} \quad (3)$$

$$S_c = S_{DO} + \frac{4 V_{OD} K}{F} \quad (4)$$

Donde:

S_{DO} = concentración de sustrato limitante en el reservorio diluido en el momento de iniciar la alimentación (g/l)

S_c = concentración de sustrato limitante en el reservorio concentrado (g/l)

V_{OD} = volumen de medio en el reservorio diluido en el momento de iniciar la alimentación (l)

b) Variación de volumen en el fermentador:

$$V = V_0 + Ft \quad (5)$$

V = volumen del cultivo durante la alimentación (l)

c) Concentración de sustrato:

$S = 0$ para crecimiento restricto.

S = concentración de sustrato limitante durante la alimentación (g/l)

d) Diseño del cultivo discontinuo alimentado.

El diseño del CDA requiere el conocimiento de los siguientes parámetros: u_o , X_o , V_o , Y y S_o los que se conocen a partir de experiencias previas en cultivo en sistema discontinuo.

Los pasos a seguir para el diseño son los siguientes:
1°) Se fija primero un valor de F y con los datos antes mencionados se calcula el valor de K (ecuación 2).
2°) De acuerdo a las posibilidades del fermentador a utilizar se fija un valor de V_{OD} (el volumen total a adicionar es $2 V_{OD}$) y con éste y el valor de K anteriormente calculado se determina S_{DO} por la ecuación (3) y luego S_c por la ecuación (4). De este modo se puede estimar "a priori" la concentración en cada reservorio y obtener una alimentación apropiada con respecto a los requerimientos de nutrientes del cultivo.

1.5. Determinación de la concentración celular.

1.5.1. Medida turbidimétrica.

La densidad óptica (D.O.) de las suspensiones celulares se efectuó a 625 nm, utilizando un fotolorímetro Turner modelo 330. Como diluyente de las muestras se empleó agua destilada. Se realizaron diluciones de las muestras tomadas a diferentes horas de proceso, de forma tal que la D.O. leída estuviese comprendida entre 0,2 y 0,4 unidades de densidad óptica (U.D.O.). El crecimiento celular alcanzado, determinado por esta técnica, se expresó en U.D.O..

1.5.2. Determinación de peso seco.

Muestras de 10 ml (medidos con pipeta de doble aforo) tomadas a distintas horas durante el transcurso del cultivo

se centrifugaron en una centrífuga refrigerada marca Sorvall modelo RC-5B, a 14.630 g durante 10 minutos. El sedimento - obtenido se lavó con agua destilada en 3 oportunidades, voll cándose finalmente sobre tubos previamente tarados, los cual les se llevaron a estufa a 105°C hasta peso constante. El - peso seco de la biomasa obtenida en los cultivos se expresó en gramos por litro (g/l).

1.6. Recuento de esporos viables resistentes al calor.

El mismo se realizó por el método de dilución de las muestras de cultivo con solución fisiológica y siembra en - cajas de Petri conteniendo el medio mencionado en el punto- 1.3. para mantenimiento de la cepa.

Antes de iniciar la serie de diluciones, las muestras se sometieron a tratamiento térmico a 60°C durante 10- minutos, con el objeto de inactivar las células que eventualmente no hubiesen esporulado y aquellos esporos sensibles al calor. Las cajas sembradas, fueron incubadas invertidas en cuarto estufa a 30°C durante 12 horas, luego de lo cual se procedió al conteo de colonias.

Se efectuaron 5 repeticiones de cada dilución de --- muestra a evaluar, expresando los resultados en unidades - formadores de colonias por litro (UFC)

1.7. Medida de pH.

La misma se realizó utilizando un peachímetro marca- Metrohm model E-396-B.

1.8. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de O₂ (Kla).

Se realizó empleando el método de Cooper y colaborara-

dores⁽¹⁰⁸⁾ .

1.9. Medida del porcentaje de Oxígeno disuelto.

La misma se efectuó utilizando un electrodo galvánico marca Biotec, realizando lecturas continuas de modo tal de mantener los niveles de O₂ disuelto por encima del límite establecido en el punto 1.4..

1.10. Determinación de la presión osmótica.

La misma se realizó empleando un osmómetro manual -- marca Fiske modelo G-66.

1.11. Determinación del consumo de glucosa.

Se efectuó utilizando el método de Hyvarinen y Nikkila⁽¹⁰⁹⁾ sobre los sobrenadantes de las suspensiones celulares centrifugadas, obtenidas como se indicó en el punto -- 1.5.2..

1.12. Determinación del consumo de Oxígeno.

Fue calculado empleando la siguiente expresión⁽¹¹⁰⁾:

$$VCO = \frac{FN_2}{V} \left(\frac{pO_1}{p - pO_1 - pC_1} - \frac{pO_2}{p - pO_2 - pC_2} \right)$$

Donde:

VCO = velocidad de consumo de O₂ (l/l x h)

FN₂ = caudal del gas inerte (l/h)

p = presión total

- V = volumen del cultivo (l)
 po_1 = presión parcial de O_2 en el gas que ingresa al fermentador.
 pc_1 = presión parcial de CO_2 en el gas que ingresa al fermentador.
 po_2 = presión parcial de O_2 en el gas que sale del fermentador.
 pc_2 = presión parcial de CO_2 en el gas que sale del fermentador.

En la expresión de VCO la presión de vapor del agua no fue incluida porque los gases de salida del fermentador, antes de ser analizados, se hicieron pasar por lechos conteniendo silicagel, con el objeto de secarlos y evitar así interferencias en la determinación de CO_2 .

La presión parcial de O_2 en las muestras gaseosas se midió con un analizador paramagnético de O_2 marca Beckman - modelo OM-14, mientras que la de CO_2 con un analizador marca Hilger modelo SB/ K_2 . En éste último caso, el agua contenida en los gases de salida del fermentador interfiere en la medida (la determinación se basa en la absorción de radiación infrarroja), motivo por el cual la muestra fue secada como se mencionó anteriormente. Ambos analizadores son continuos y el caudal que se hizo pasar por los mismos, estuvo en todo momento dentro de los límites estipulados por los fabricantes.

La cantidad de O_2 consumida durante los cultivos se evaluó por integración calculando el área bajo la curva de VCO en función del tiempo de proceso. Este valor fue empleado con posterioridad en el cálculo del coeficiente Y_{x_m/O_2} .

Todos los valores calculados fueron referidos a condiciones normales de presión y temperatura.

1.13. Determinación de la actividad bioinsecticida de las suspensiones espora-cristal.

1.13.1. Cría de larvas.

Para la iniciación de la cría se obtuvieron larvas de panales de abejas infectados naturalmente por Galleria mellonella, procedentes de apiarios de la localidad de Vena do Tuerto, Provincia de Santa Fe.

Los mismos se mantuvieron a 30°C en cuarto estufa, a la oscuridad, hasta la aparición de mariposas, a partir de las cuales, previo apareamiento se obtuvieron los huevos.

El procedimiento empleado para la cría es una modificación del propuesto por Dutky y colaboradores⁽¹¹¹⁾. Se colocan 10 a 12 mg de huevos próximos a eclosionar (aproximadamente 300 huevos) en un frasco de cría de 1500 ml de capacidad, con tapa ancha, preferentemente metálica, con 20 a 30 perforaciones de 4 mm de diámetro y cubierta internamente por una malla de alambre y papel de filtro, de modo tal de lograr un cierre adecuado para evitar el escape de las larvas recién eclosionadas.

Sobre los huevos se coloca el alimento constituido por los siguientes componentes expresados en gramos: miel, 75; glicerina, 31; extracto de levadura (marca Oxoid), 3; Nestum 3 cereales (Nestlé), 125 y agua 25 ml.

Este alimento debe prepararse en la siguiente secuencia: mezclar la miel, el glicerol y el agua en baño a 50°C; enfriar hasta 40°C y agregar el extracto de levadura; esparcir el líquido sobre una bandeja conteniendo el Nestum y proceder al amasado hasta lograr una consistencia firme, darle a la masa la forma de la base del frasco y depositarla sobre los huevos. Este medio provee el alimento necesario para cubrir el período comprendido desde la eclosión hasta la formación de la pupa sin necesidad de nuevos agregados. El frasco es incubado a 30°C en completa oscuridad. Aproximadamente a la semana se inicia la eclosión de los huevos. A los 20 días se debe sacar el papel de filtro de la tapa. A los 40 días las larvas comienzan a tejer sus capullos. A los 50 días comienza el empupamiento y a los 70 a 80 días se observa plena aparición de mariposas.

Una vez que aparecen las mariposas se hace pasar una

corriente de CO₂ hasta lograr el total adormecimiento de las mismas. Luego se destapa el frasco y recolectan cuidadosamente las mariposas. Estas son colocadas en número de 10 a 12 (controlando que existan de ambos sexos) para su apareamiento en cajas de material plástico de 15 x 10 x 5 cm. En la tapa se coloca un papel plegado parafinado pegado con cinta adhesiva.

Las cajas de apareamiento se incuban a 30°C a la oscuridad (sin alimento) por espacio de 5 a 7 días, al cabo del cual ha ocurrido una completa ovoposición sobre el papel. Luego se retiran los huevos y se los limpia superficialmente con una corriente de aire (o bien por inmersión durante un minuto en agua lavandina al 5% y lavando con agua corriente durante 20 minutos). Es conveniente la desinfección permanente de todo el material para prevenir fundamentalmente infecciones fúngicas.

1.13.2. Cría de larvas para bioensayo.

Se utilizaron los mismos frascos que para la cría o bien cajas de Petri grandes. Se colocan 30 mg de huevos (aproximadamente 1.000 huevos) y sobre éstos una fina capa de alimento constituido por los siguientes componentes (en gramos): sacarosa, 1,75; glicerina, 2,1; Nestum, 4,4 y agua 1,75 ml preparado en el orden mencionado en el punto 1.13.1. Los frascos (o cajas) se colocan en cuarto estufa a 30°C y al cabo de 25 días (15 a 18 a partir de la eclosión) se obtienen larvas de aproximadamente 8 a 10 mm de longitud, apropiadas para la realización del bioensayo.

1.13.3. Bioensayos.

Para su realización se emplean cajas de Petri en número adecuado según la cantidad de tratamientos y repeticiones necesarias, que dependerán del diseño experimental a emplear.

En cada caja se coloca una masa constituida por los-

componentes mencionados en el punto anterior, depositándose de 10 a 12 larvas de las obtenidas en el mismo punto, constituyéndose esta caja en la unidad experimental. Las suspensiones que se desean testear deben ser agregadas en el agua o bien sustituir a ésta en las proporciones adecuadas para no alterar la consistencia de la masa.

Las cajas se llevan a cuarto estufa a 30°C a la oscuridad y diariamente se realizan recuentos de larvas muertas (es conveniente retirarlas ya que sino son ingeridas por el resto de las larvas) o también se pueden realizar mediciones de peso. Los datos obtenidos son sometidos al análisis de la varianza⁽¹¹²⁾ o a la determinación de dosis letal mediante regresión lineal⁽¹¹³⁾.

1.13.4. Determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀).

Para tal fin, cinco diluciones de suspensión esporocristal a ser testeadas, fueron incorporadas a la dieta artificial simplificada (según procedimiento desarrollado en el punto 1.13.3.) y siete repeticiones de seis larvas cada una, para cada una de las cinco diluciones fueron empleadas en los bioensayos. Todas las cajas conteniendo las larvas fueron incubadas a la oscuridad a 30°C durante cinco días, luego de lo cual se calculó el porcentaje de mortandad para cada dilución y la CL₅₀ fue determinada en un gráfico de probits en función del logaritmo de la concentración.

Se hace necesario recurrir a este tipo de cálculo ya que la mortandad no presenta una distribución normal, motivo por el cual se hace necesario normalizar los valores obtenidos en los bioensayos, con el fin de analizarlos estadísticamente. Por medio del empleo de tablas, la mortandad expresada en forma porcentual es transformada en valores normalizados (probits), los cuales pueden someterse al análisis de la varianza o a la determinación de dosis letal por regresión lineal.



Larvas de Galleria mellonella correspondientes al mismo estadio larvario. Las dos primeras larvas de la izquierda fueron alimentadas con la dieta artificial detallada en el punto 1.13.2. (testigos). Las cuatro restantes fueron alimentadas con la misma dieta a la que se le incorporó una suspensión esporo-cristal de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki.

1.14. Determinación por rocket inmunoelectroforesis de la - delta-endotoxina de Bacillus thuringiensis.

1.14.1. Obtención del antígeno.

Con tal objeto, Bacillus thuringiensis variedad kurs taki, fue cultivado en medio GYS⁽⁸³⁾ por aproximadamente 60 horas para obtener una suspensión de esporos y cristales.

La suspensión así obtenida, fue concentrada 10 veces por centrifugación a 10.160 g. El sedimento resultante, fue lavado en dos oportunidades con solución de Tween 80 al 1% y en una tercera con solución de Tween 80 al 1% y buffer -- Tris 20 mM y resuspendido en esta última solución a temperatura de 0°C.

Un volumen de 0,2 ml de esta suspensión, fue cuidadosamente depositado en capa sobre la superficie de un gradiente lineal de Urografina 76% (marca Schering Argentina) y centrifugado durante 4 horas a 10°C en una centrífuga Sorvall RC-5B operada a 9425 g en un rotor HS-4 (de la misma firma).

1.14.2. Preparación del gradiente lineal de Urografina.

Para tal fin se utilizó un dispositivo similar al -- descrito en la figura N°3. Los gradientes fueron obtenidos haciendo gotear desde el reservorio R₁, 5,5 ml de H₂O, mediante la utilización de una bomba peristáltica, al reservorio R₂ conteniendo Urografina concentrada en igual volumen que en el reservorio R₁. El segundo reservorio fue agitado constantemente con el empleo de una barra magnética, con el objeto de lograr una rápida uniformidad de la solución Urografina-agua. Del reservorio R₂ sale una prolongación que fue conectada a un tubo de centrífuga por medio de una segunda bomba peristáltica. A medida que pasa agua del reservorio R₁ al R₂, sale de éste una solución Urografina-agua que gotea sobre la pared de un tubo de centrífuga en el -- cual se preforma el gradiente. El gradiente lineal es obtenido operando la segunda bomba al doble de velocidad que la

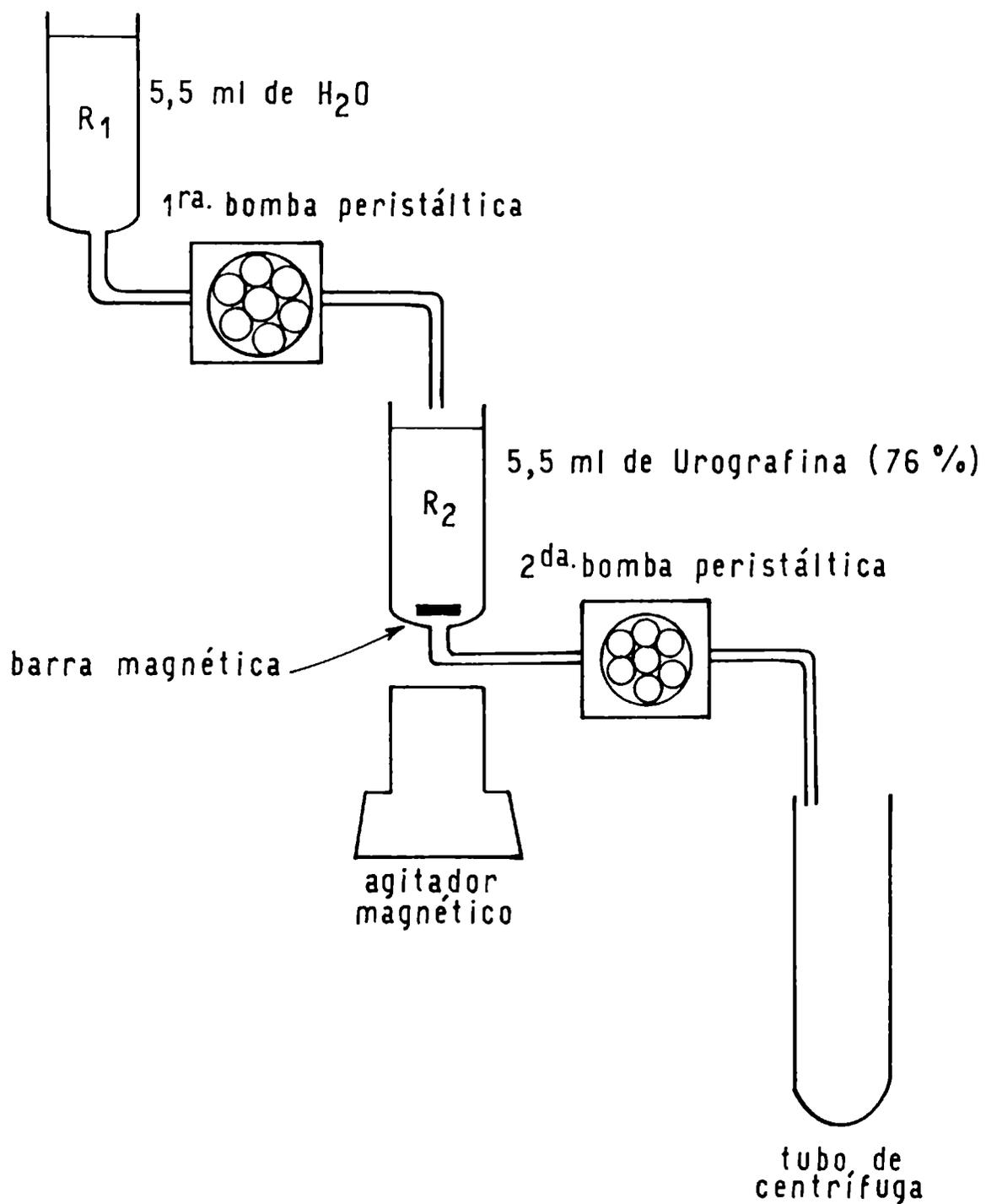


Figura N°3. Esquema del dispositivo utilizado en la preparación de gradientes para la separación y purificación de los cristales.

primera. Bajo estas condiciones, los reservorios R_1 y R_2 -- disminuyen su volumen en forma tal que en todo momento el volumen contenido en R_1 es igual al de R_2 . Cuando el contenido de ambos reservorios se ha agotado, se da por finalizada la formación del gradiente.

Concluida esta operación, el tubo de centrífuga (se utilizó un tubo Corex de 18 x 103 mm) contiene 11 ml de una solución con un gradiente lineal con densidades que van desde 1 g/ml hasta 1,46 g/ml. Este tubo es mantenido en heladera a 4°C durante 15 a 30 minutos antes de proceder a la siembra del mismo ^(114,115).

Para verificar la linealidad del gradiente se procede a tomar alícuotas a distintos niveles del mismo. A estas alícuotas se les determina por un lado la densidad (pesando un volumen conocido de las mismas) y por otro lado efectuándose lecturas de D.O. en el ultravioleta a 238 nm (previa dilución de las alícuotas 1 en 10.000).

La linealidad es finalmente verificada construyendo un gráfico de D.O. en función de la densidad de las alícuotas ⁽¹¹⁵⁾.

1.14.3. Fraccionamiento del gradiente.

Se realizó mediante el empleo de una aguja hipodérmica. Esta fue introducida cuidadosamente en el tubo de centrífuga en el cual se procedió a efectuar la separación de esporos y cristales, aspirando con cuidado pequeñas alícuotas desde la superficie hasta el fondo, hasta llegar a la fracción que contiene a los cristales (zona de densidad -- 1,33 g/ml. Los esporos son bandeados en la zona de 1,38 -- g/ml). La fracción conteniendo a los cristales es diluida con agua destilada y centrifugada a 22.870 g durante 10 minutos en rotor SM-24. Esta operación es repetida en dos -- oportunidades más. Los cristales purificados (90-95% de pureza) son vueltos a bandear, repitiendo la siembra en gradiente, centrifugación y nuevo fraccionamiento, con el objeto de aumentar la pureza de la suspensión de cristales.

Los cristales purificados se solubilizaron en buffer NaHCO_3 0,05 M a 37°C durante 2 horas⁽¹¹⁶⁾ y se dializan durante toda la noche frente a buffer NaH_2PO_4 20 mM de pH 7,5. La solución es fraccionada en pequeñas alícuotas y mantenida a -20°C . A la misma se le efectúa determinación de proteínas por el método de Lowry⁽¹¹⁷⁾ utilizando como patrón albúmina de suero bovino.

1.14.4. Preparación del antisuero.

Con tal fin se utilizaron conejos blancos adultos machos de aproximadamente 3,5 kg de peso. Estos fueron inoculados en forma subcutánea en cuatro sitios (a ambos lados de la columna vertebral y en cara interna de los muslos traseros) con 0,5 ml de una suspensión compuesta por adyuvante de Freund: 1 ml más 1 ml de solución de toxina purificada de acuerdo a la técnica de Cooksey⁽¹¹⁸⁾, estandarizada a una concentración de 1 mg de proteína/ml.

La inoculación fue realizada de acuerdo al siguiente esquema:

Día	Inoculación
1	1 ^{ra} . : Adyuvante de Freund completo (1 ml) + 1 mg de proteína (1 ml).
21	2 ^{da} . : Adyuvante de Freund completo (1 ml) + 1 mg de proteína (1 ml).
28	3 ^{ra} . : Adyuvante de Freund incompleto (1 ml) + 1 mg de proteína (1 ml). Se realizó sangría de prueba positiva sacando sangre de venas de la oreja.
35	4 ^{ta} . : Adyuvante de Freund incompleto (1 ml) + 1 mg de proteína (1 ml). Nueva sangría de prueba positiva.
42	5 ^{ta} . : Adyuvante de Freund incompleto (1 ml) + 1 mg de proteína (1 ml). Nueva sangría de prueba positiva.

A las siete semanas los conejos fueron sangrados a blanco por yugular, previa anestesia de los mismos con éter etílico. La sangre extraída fue llevada a baño a 37°C duran

te 2,5 horas y luego por 2 horas a heladera. Posteriormente fue centrifugada durante 15 minutos a 3.659 g y el suero obtenido se dejó en desecador conectado a una bomba de vacío durante 2 horas. Luego fue fraccionado y guardado a -20°C .

1.14.5. Solubilización de las muestras.

Muestras de 10 ml fueron centrifugadas a 10.160 g durante 10 minutos y lavadas en dos oportunidades con agua destilada. Una vez centrifugadas, el paquete celular fue llevado al volumen original (10 ml) con solución de NaHO 0,04 N⁽⁹⁵⁾, manteniendo la suspensión a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas en las mismas condiciones antes mencionadas, ajustando el pH a aproximadamente 8,5 con buffer Tris 1 M de pH 8,5⁽¹¹⁹⁾.

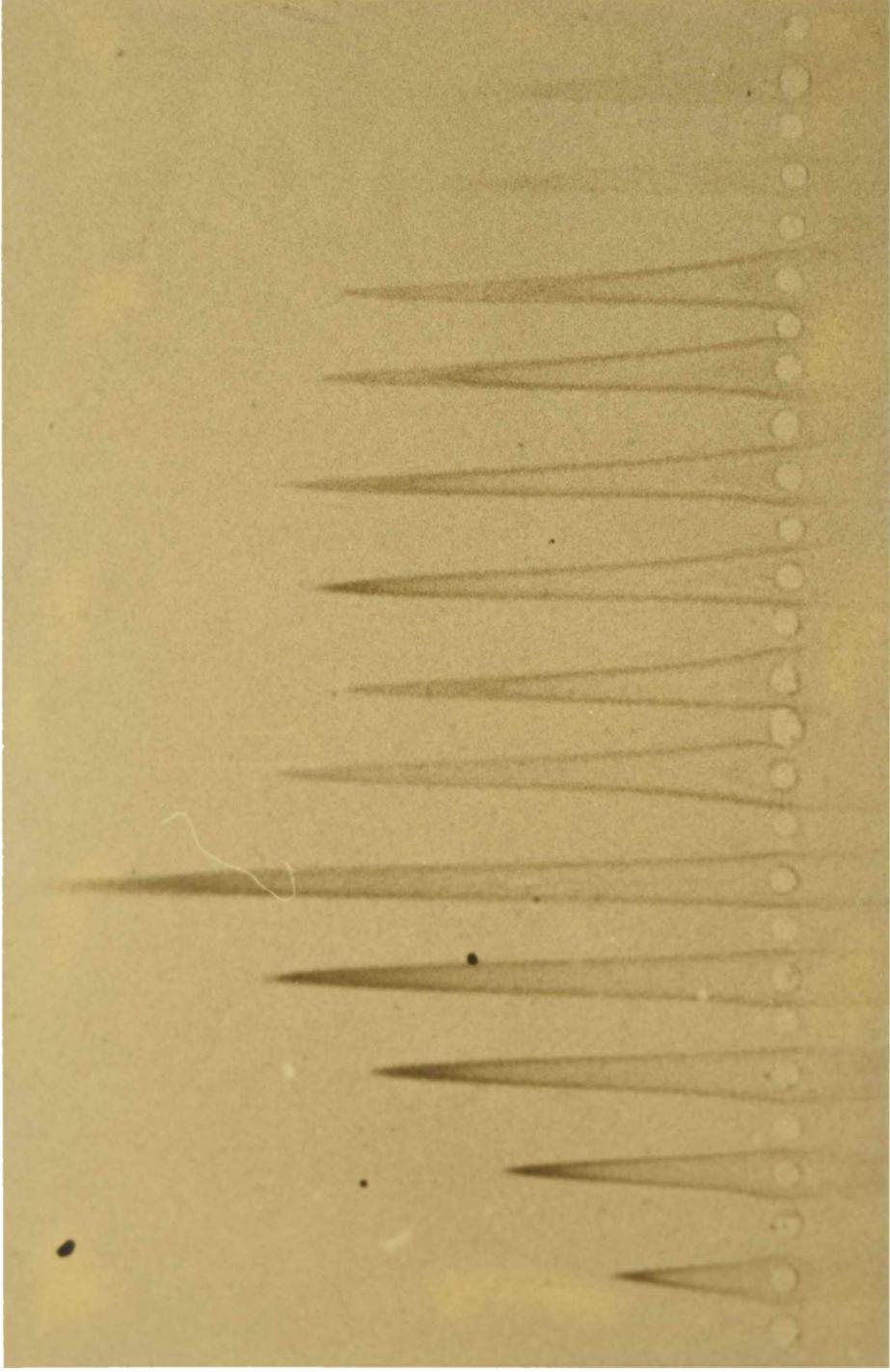
1.14.6. Electroinmunoensayo.

Se realizó sobre geles de agarosa (Pharmacia C, low-electroendosmosis) de concentración 1,2% (P/V) y 1,5 mm de espesor, implantados sobre una impronta de agar base (Difco) al 0,5%, en placas de vidrio de 10 x 10 cm. A estos geles se les incorporó antisuero en concentración del 1%. A 2 cm de la base del gel se realizaron orificios con sacabocado, sembrando en ellos 2 ul de antígeno (patrón o muestra a medir). La electroforesis se realizó trabajando a 250 V (5 mA por placa) durante 8,5 horas a 15°C , empleando como buffer de corrida una solución de BO_3H_3 0,089 M, Tris 0,089 M y EDTA ácido 0,001 M. La curva patrón barrió concentraciones desde 125 ug/ml hasta 1.000 ug/ml.

Los geles se lavaron en 4 oportunidades durante 20 minutos con solución de NaCl 0,1 M y 3 veces con agua destilada durante 15 minutos. Posteriormente fueron llevados a estufa a 37°C hasta sequedad y luego teñidos durante 5 minutos con solución colorante de Negro amido 10B al 0,5% (P/V) en metanol-acético-agua (45:10:45, en volumen). Los geles fueron posteriormente decolorados con solución de metanol--

acético-agua (45:10:45, en volumen).

Midiendo la altura de los picos obtenidos con la cur
va patrón, se construyó un gráfico de concentración de pro-
teínas en función de la altura del pico, determinando la -
concentración de las muestras por medida de la altura de -
los rockets^(119,120,121).



Determinación por rocket inmunoelectroforesis de la delta-endotoxina de Bacillus thuringiensis. Los primeros cinco picos de la izquierda corresponden a la curva patrón mientras que los restantes corresponden a determinaciones realizadas con distintas muestras.

2. RESULTADOS Y DISCUSION

Nomenclatura

UFC, unidades formadoras de colonias (N°/l)

x, biomasa producida en base seca (g/l)

x_m , máximo valor de biomasa producida en base seca (g/l)

x_f , valor final de biomasa producida en base seca (g/l)

s_0 , concentración inicial de glucosa (g/l)

s, concentración de glucosa (g/l)

L, período lag (h)

u, velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

UFC/x_f , $\frac{\text{unidades formadoras de colonias producidas}}{\text{valor final de biomasa producida en base seca}}$ (N°/g)

UFC/x_m , $\frac{\text{unidades formadoras de colonias producidas}}{\text{máximo valor de biomasa producida en base seca}}$ (N°/g)

UFC/s , $\frac{\text{unidades formadoras de colonias producidas}}{\text{g de glucosa consumida por litro}}$ (N°/g)

Y_{x_m/O_2} , $\frac{\text{máximo valor de biomasa producida en base seca}}{\text{g de } O_2 \text{ consumido por litro}}$

$Y_{x_m/s}$, $\frac{\text{máximo valor de biomasa producida en base seca}}{\text{g de glucosa consumida por litro}}$

C/N, relación Carbono/Nitrógeno

2.1. Influencia del grado de aireación.

Es sabido que, entre otros motivos, los microorganismos aerobios utilizan el Oxígeno para obtener energía, la cual es posteriormente empleada en todos aquellos procesos biosintéticos que realizan durante su ciclo vital.

Debido a que, como se mencionó en el punto 3.1.1., Bacillus thuringiensis es un microorganismo que requiere un elevado suministro de Oxígeno, se realizaron estudios con el objeto de determinar la influencia del grado de aireación sobre su desarrollo.

Con tal propósito se utilizó el medio de cultivo N°1 (ver composición en la Tabla N°2), el cual fue distribuido en volúmenes variables como puede observarse en la Tabla N°3.

Tabla N°3

Erlenmeyer	Volumen de medio.	Kla (h^{-1})	Porcentaje de esporulación.
A	50	220	100
B	100	107	98
C	150	79	90
D	200	61	85
E	300	38	70

Porcentaje de esporulación= (UFC/UFC del erlenmeyer A) x 100

En esta misma Tabla puede apreciarse, además, como afectan los distintos volúmenes de medio utilizados, al coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 (Kla).

En la figura N°4, se presentan las curvas de crecimiento obtenidas bajo las condiciones de ensayo empleadas.

Puede observarse que con los erlenmeyers A, B y C, -

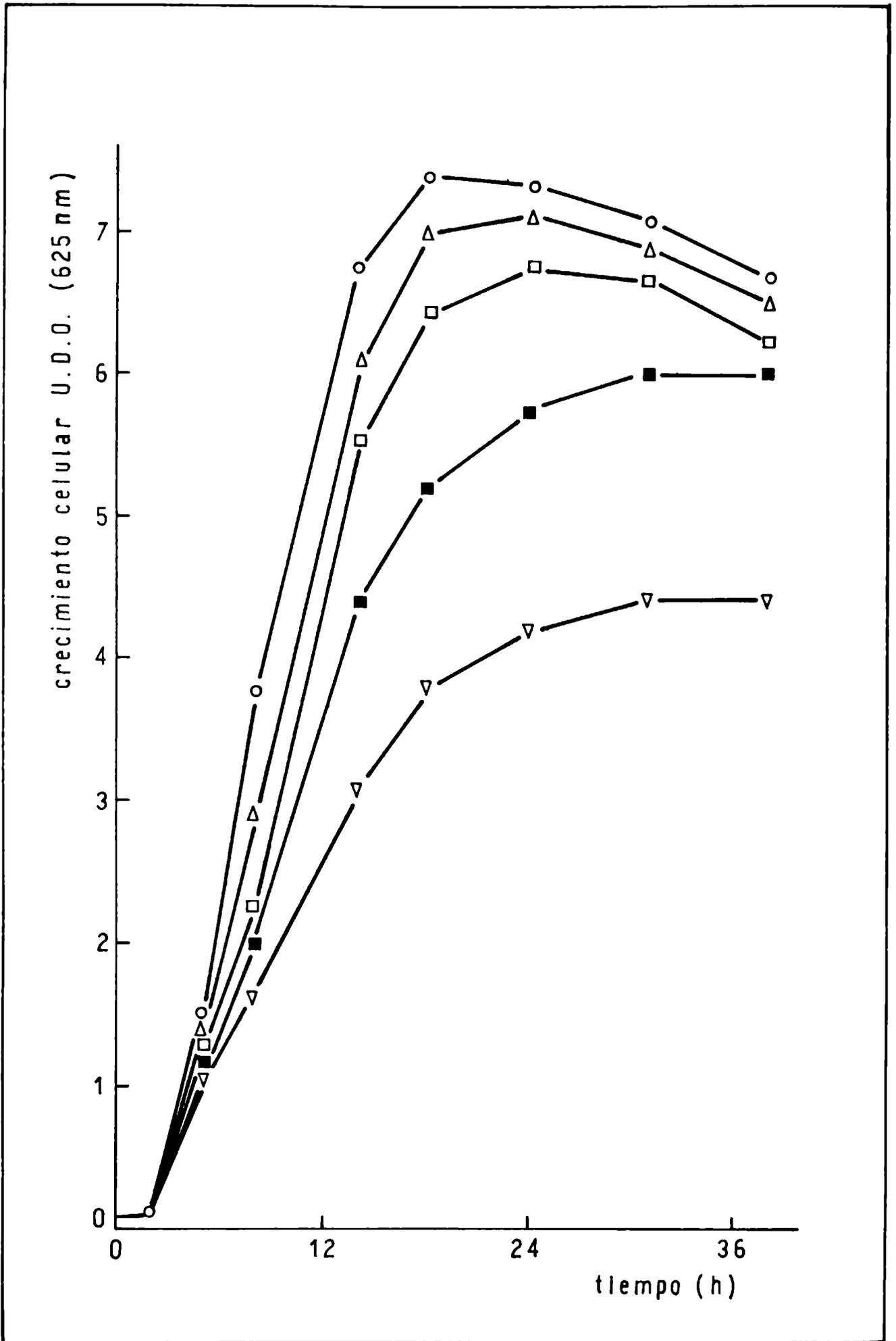


Figura N°4. Influencia del grado de aireación sobre el desarrollo de Bacillus thuringiensis var. kurstaki.

Erlenmeyers: A (O), B (Δ), C (□), D (■) y E (▽).-

el microorganismo desarrolla alcanzando un máximo de D.O., - luego de lo cual se produce una disminución en los valores de esta medida como consecuencia de la lisis celular producida en el cultivo.

Los desarrollos logrados en los erlenmeyers C y D, - sobre todo en este último, fueron menores. Así mismo, puede apreciarse un desplazamiento de los valores máximos de D.O. alcanzados en las horas de proceso en las cuales los cultivos de los erlenmeyers A, B y C estaban en la etapa de lisis. Se hace evidente que una deficiente aireación afecta el normal desarrollo del microorganismo.

Observaciones microscópicas efectuadas en preparados de muestras tomadas a distintas horas de proceso, de los erlenmeyers A, B, C, D y E, mostraron una relación esporo/cristal igual a uno.

Se puede concluir que, debido a que los distintos erlenmeyers contenían el mismo medio de cultivo, las diferencias logradas en el desarrollo celular, pueden ser atribuidas a la influencia del grado de aireación.

No habiéndose observado diferencias apreciables entre los erlenmeyers A y B, se decidió continuar los estudios con frascos conteniendo 100 ml de medio de cultivo, de modo tal de facilitar el muestreo durante el desarrollo del cultivo.

2.2. Ensayos preliminares con medios de cultivo.

Con el objeto de proceder a la elección de un medio adecuado para el desarrollo de Bacillus thuringiensis, para realizar estudios de requerimientos nutricionales y de producción, se procedió a efectuar ensayos preliminares comparativos entre el medio N°1 y los medios N°2 y 3 (ver composición en la Tabla N°2). Estos últimos son modificaciones del medio de producción propuesto por Goldberg y colaboradores⁽¹²²⁾.

Las modificaciones introducidas fueron, en el caso del medio N°2, la no inclusión de agua de macerado de maíz y peptona de soja, con el objeto de utilizar un medio de composición menos compleja que permitiera simplificar el análisis de resultados en las experiencias de requerimientos nutricionales del microorganismo. Al excluir estas fuentes nitrogenadas, se decidió reducir la concentración de glucosa del medio original desde 30 g/l hasta 10 g/l, de modo tal de respetar la relación C/N de dicho medio.

En el caso del medio N°3, se efectuaron las modificaciones antes mencionadas además de reemplazar la fuente de Nitrógeno y factores de crecimiento (extracto de levadura) por bacto peptona.

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la figura N°5. Puede observarse que con los medios N°2 y 3, se produce un marcado incremento en el desarrollo celular, comparado con el medio N°1, como queda reflejado en los valores de D.O. y recuentos celulares alcanzados. Así, con el medio N°2 se obtuvieron 124×10^{10} UFC y en el caso del medio N°3, 112×10^{10} UFC, lo que representa un aumento de productividad de 3,6 y 3,2 veces respectivamente, comparado con los valores alcanzados con el testigo, con el cual se obtuvieron $34,5 \times 10^{10}$ UFC.

Teniendo en cuenta los resultados logrados con las modificaciones introducidas, se decidió continuar los estudios tomando como base para los mismos el medio N°2.

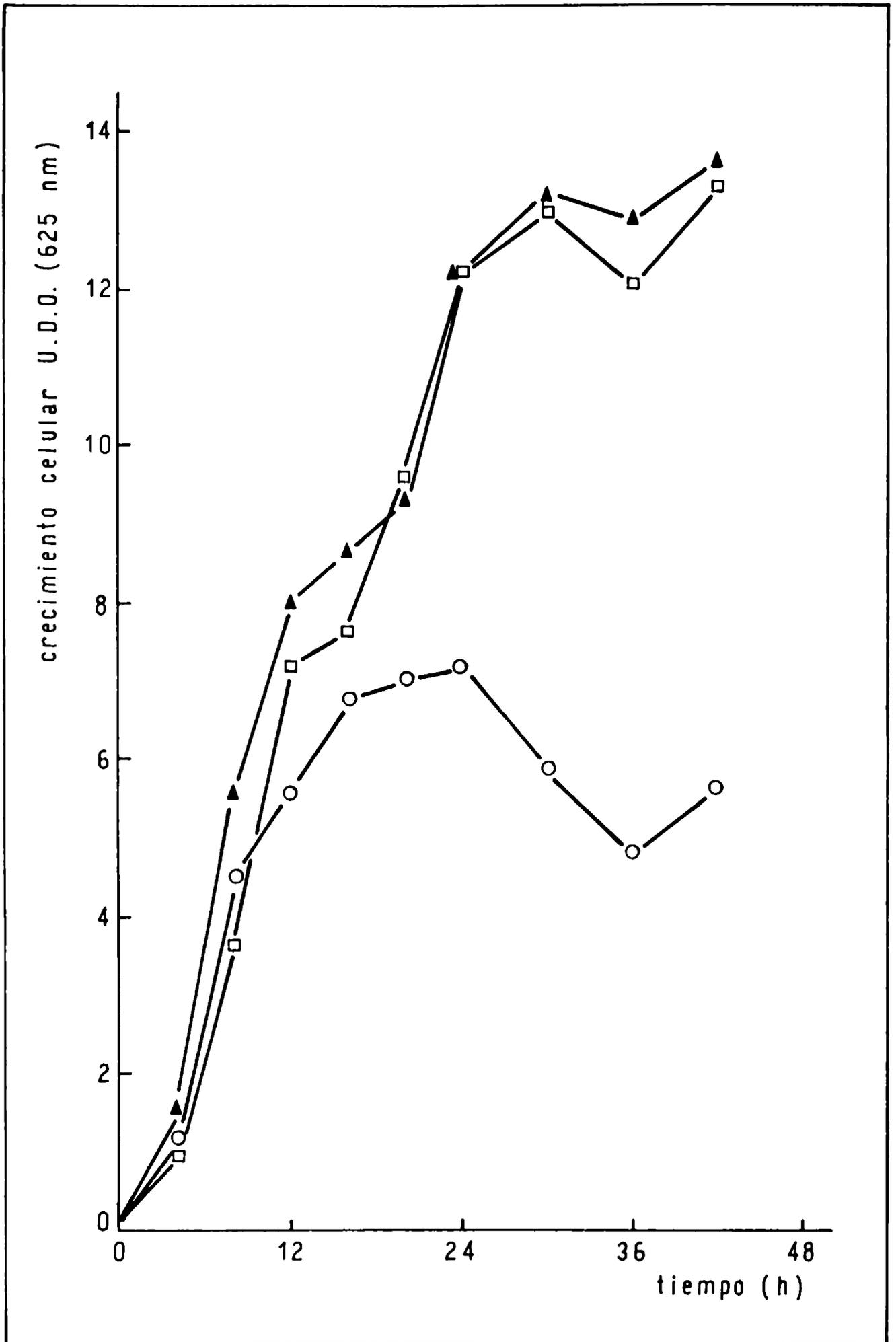


Figura N°5. Ensayos comparativos preliminares.
Medios N°1 (O), 2 (▲) y 3 (□)

2.3. Influencia del agregado de iones.

Tomando como base los resultados obtenidos en el trabajo de Goldberg y colaboradores⁽¹²²⁾ en la formulación de medios para el cultivo de Bacillus thuringiensis variedad Berliner, se realizaron experiencias en las que se estudió la influencia del agregado de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} sobre el desarrollo de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki. Con tal motivo, en una primera etapa se ensayaron medios de diferente composición, con y sin el agregado de dichos iones.

En una segunda etapa se realizaron estudios comparativos a fin de establecer si alguno de los iones estudiados podría ser omitido en la formulación y establecer si era necesario suplementar con alguno de ellos la cantidad aportada por el extracto de levadura en los medios de referencia.

Con respecto a la concentración óptima de los iones ensayados se estudió especialmente el caso del Mg^{+2} , quedando excluidos del objetivo de estas experiencias los restantes, que fueron considerados solamente desde el punto de vista de la necesidad de su incorporación a los medios.

En la figura N°6 se pueden apreciar las distintas curvas de crecimiento correspondientes a los medios N°2 y 3 en estudios comparativos efectuados con los medios N°4 y 5. Estos medios son modificaciones de los medios N°2 y 3 respectivamente, en los que los iones en estudio no fueron incorporados en su formulación. Puede observarse el efecto positivo que produce sobre el desarrollo celular la incorporación de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} con incrementos en los valores de D.O. que van desde 230 hasta 410%, lo que revela la importancia de su incorporación en la formulación de medios para el desarrollo del bacilo. Como el extracto de levadura contiene estos iones⁽¹²⁵⁾ es evidente que el aporte efectuado por el mismo no fue suficiente para obtener un adecuado crecimiento.

Debido a que varios autores prescinden de la utiliza

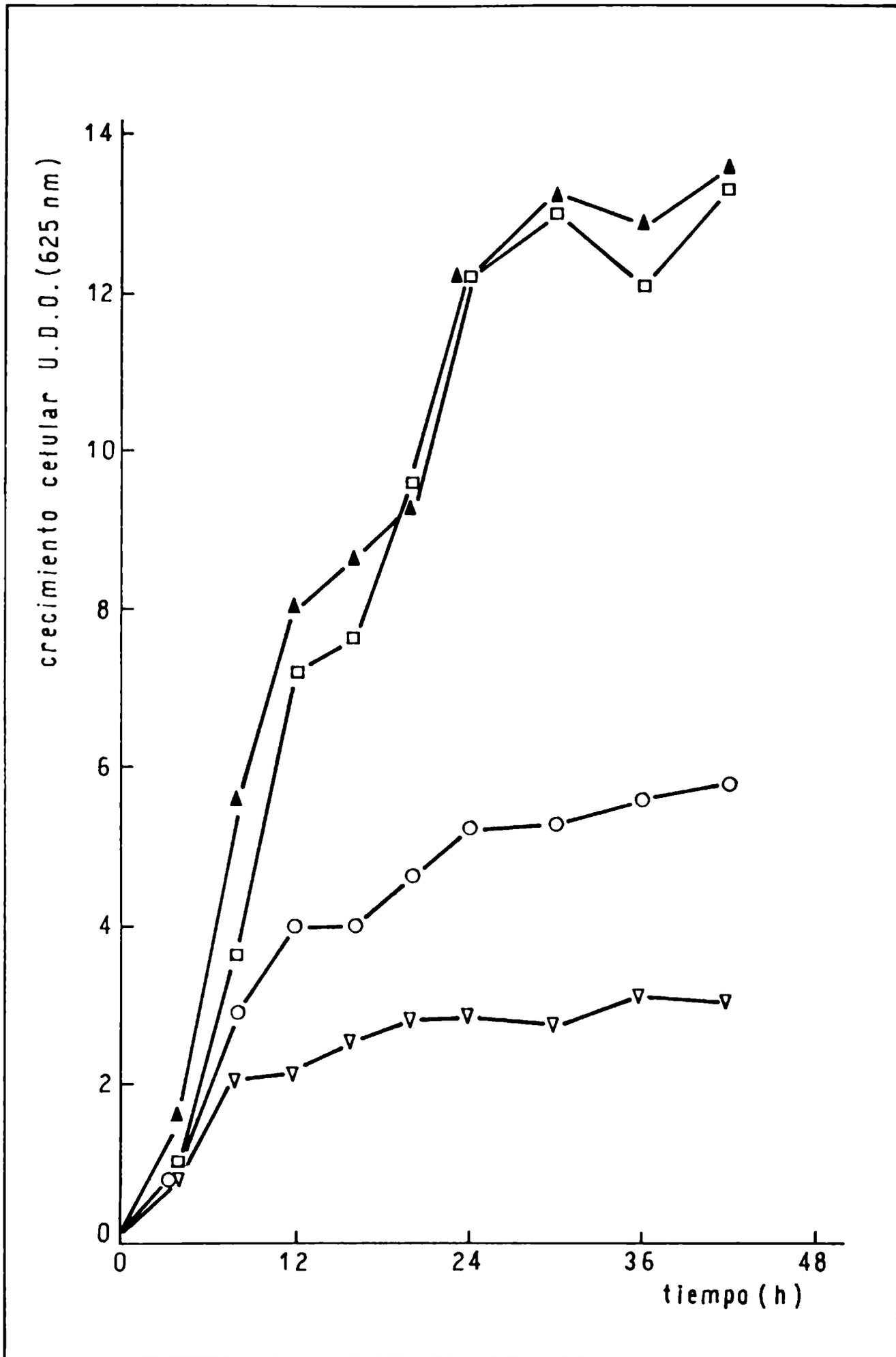


Figura N°6. Influencia del agregado de iones.
Medios N°2 (▲), 3 (□), 4 (○)-
y 5 (▽).

ción de los iones Cu^{+2} , Fe^{+2} y Zn^{+2} en los medios de cultivo que utilizan en sus estudios (74,123,124) se efectuaron ensayos comparativos entre el medio N°2 y el medio N°12, carente de los mismos (ver composición en la Tabla N°2).

En la figura N°7 se presentan las curvas de crecimiento obtenidas con estos medios. Los resultados alcanzados de peso seco finales 3,82 y 3,85 g/l y recuentos de 126×10^{10} y 129×10^{10} UFC, para los medios N°2 y 12 respectivamente, ponen de manifiesto que no fue necesario suplementar con los iones Cu^{+2} , Fe^{+2} y Zn^{+2} el medio de cultivo para el desarrollo de la cepa empleada, presumiblemente porque el aporte de estos iones efectuado por el extracto de levadura fue suficiente para alcanzar las concentraciones celulares antes mencionadas.

Habiéndose determinado que los medios de cultivo que contienen Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} dan buenos resultados se efectuaron estudios con medios en los cuales se incorporaron dichos iones de a pares y en forma individual. Con tal motivo se emplearon los medios N°13, 14, 15, 16, 17 y 18 que son modificaciones del medio N°12 y en los cuales la concentración de los iones incorporados es la misma que la correspondiente a dicho medio.

Las distintas combinaciones ensayadas, así como los resultados obtenidos se presentan en la Tabla N°4. Las curvas de crecimiento correspondientes se presentan en la figura N°8.

En la Tabla N°4 puede apreciarse una constancia en la relación proteína/UFC, lo que pondría en evidencia que la ausencia de algún ión o combinación de iones en los medios de cultivo, afecta por igual al fenómeno de esporulación y síntesis del cristal, de forma tal de mantener la relación proteína/UFC constante.

Puede verse que con el medio N°12 se obtuvieron los valores más altos en producción de delta-endotoxina.

La ausencia de Mn^{+2} en el medio N°13 produjo una sensible disminución en los recuentos, lo que pondría de manifiesto

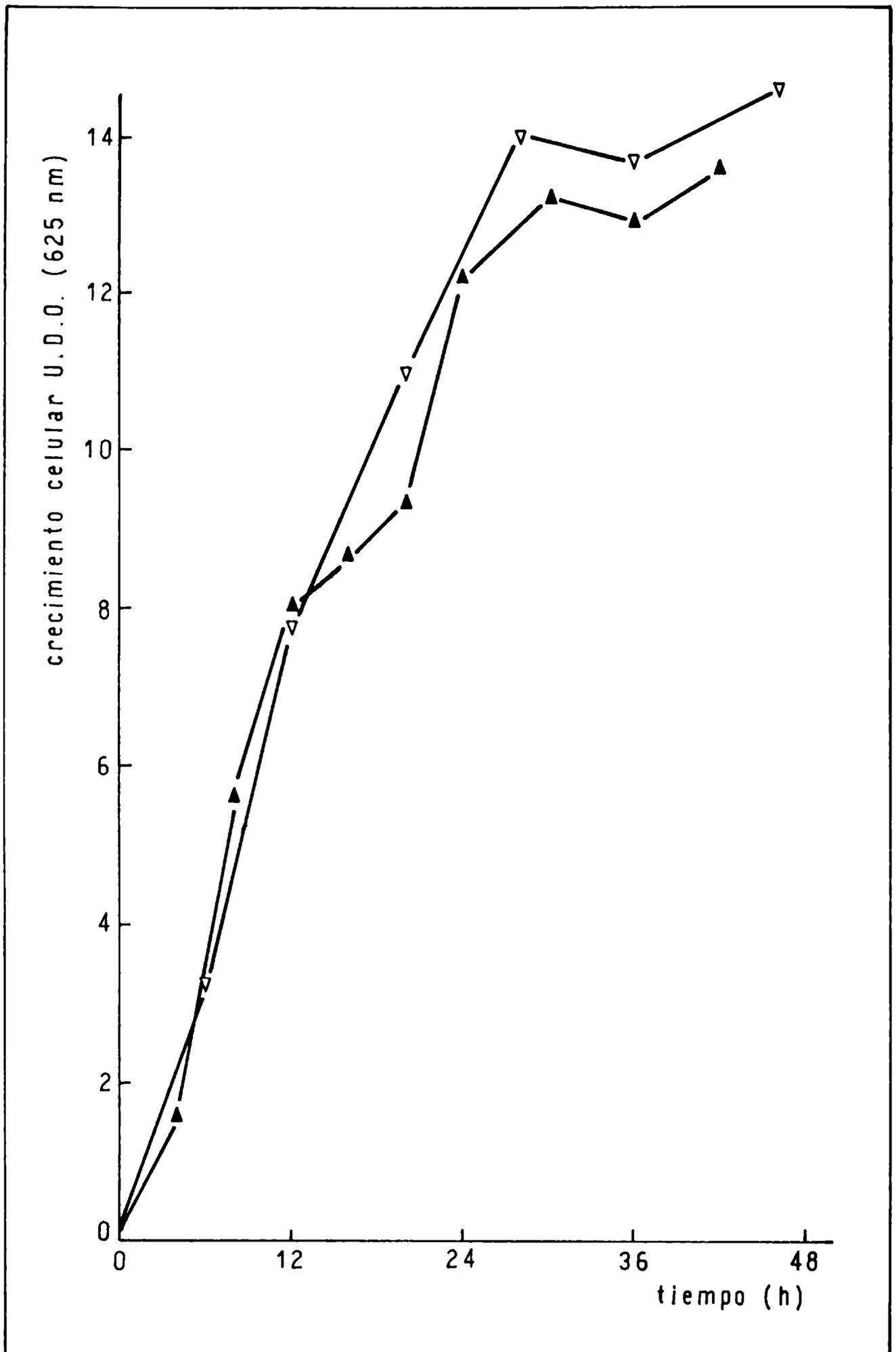


Figura N°7. Estudios comparativos entre los medios que contienen la totalidad o parte de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} . Medios N°2 (▲) y 12 (▽).

Tabla N° 4

Medio N°	UFC x 10 ¹⁰	proteína (g/l)	(g de proteína/UFC) x 10 ⁻¹²	Ca	Mg	Mn
12	131	1,403	1,092	*	*	*
13	58	0,558	0,962	*	*	
14	112	1,224	1,093		*	*
15	26	0,283	1,088	*		*
16	28,3	0,310	1,095	*		
17	56,5	0,576	1,019		*	
18	18	0,200	1,111			*

Los asteriscos en la Tabla indican la presencia de los distintos iones incorporados a los medios correspondientes.
 El término proteína hace referencia a la delta-endotoxina cuantificada por el método-inmunolectroforético.

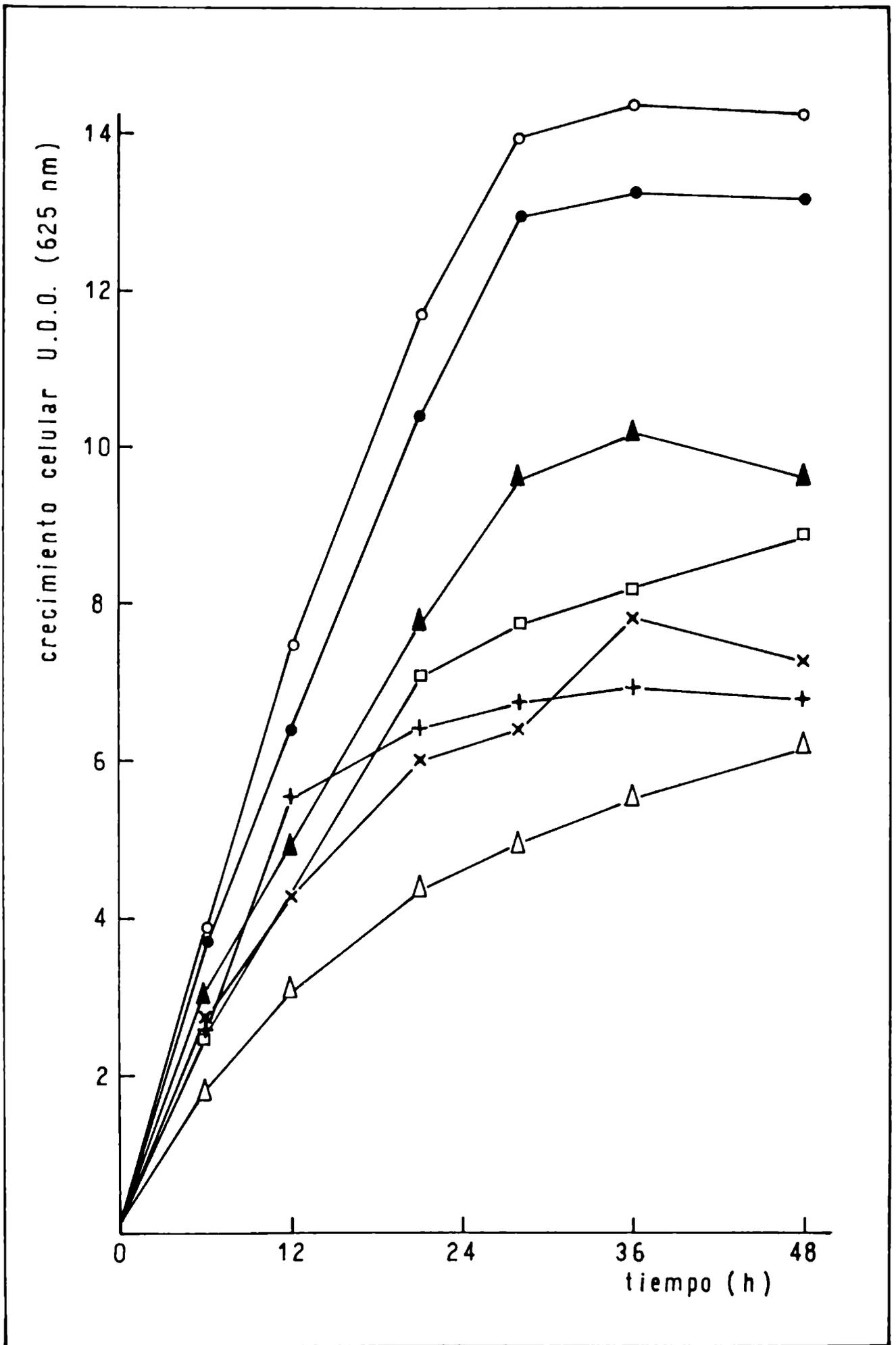


Figura N°8. Curvas de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* desarrollado en medios con distintas combinaciones de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} .
Medios N°12 (O), 13 (▲), 14 (●), 15 (+), 16 (x), 17 (□) y 18 (Δ).

fiesto su importancia en el mecanismo de esporulación. Al verse afectada la formación de esporos, también se vió afectada la síntesis del cristal como puede apreciarse en la baja producción de proteínas.

Con el medio N°14 se obtuvieron valores en concentración de delta-endotoxina cercanos a los del medio N°12, lo que indicaría que la presencia conjunta de Mg^{+2} y Mn^{+2} en el medio de cultivo es vital para lograr una buena producción de cristales.

La ausencia de Mg^{+2} en los medios N°15, 16 y 18 afectó desfavorablemente la síntesis del cristal y la esporulación.

Con los medios N°13 y 17 se obtuvieron similares valores en UFC y proteínas, lo cual indicaría que la presencia del ión Ca^{+2} no juega un papel importante en la formación de la toxina. No obstante, si se observan los resultados presentados en la Tabla N°5, puede verse que la ausencia del ión Ca^{+2} en el medio N°14 aumentó considerablemente la sensibilidad térmica de los esporos.

Tabla N°5

Medio N°	UFC x 10^{10}			
	12	13	14	15
Temperatura y tiempo.				
60°C x 10 min.	131	58	121	26
70°C x 10 min.	129	57	41	23
70°C x 20 min.	130	59	9	29

En los medios N°13 y 15, si bien se obtuvieron valores de recuento bajos, la presencia de Ca^{+2} hizo que los esporos no perdieran resistencia al calor, como puede verse -

de la constancia en los recuentos. Esto es de suma importancia si se tienen presentes los tratamientos térmicos a que se suelen someter en algunos casos las pastas celulares durante el proceso de elaboración de bioinsecticidas a nivel industrial.

En la figura N°9 se presentan las curvas de consumo de glucosa correspondientes a los medios N°12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18. Puede apreciarse que en aquellos medios en los que no se incorporaron los iones Mg^{+2} o Mn^{+2} o combinaciones de ellos, se produjo un marcado descenso en las velocidades de consumo de la fuente de Carbono. Este efecto se hizo más evidente en aquellos medios deficitarios en Mn^{+2} . En este sentido, la deficiencia de este ión en cultivos de Bacillus subtilis, Bacillus cereus y Bacillus megaterium, produce una inhibición de la enzima fosfoglicerato-fosfomutasa, la cual tiene un requerimiento estricto de Mn^{+2} . Esta inhibición se traduce en una acumulación de 3-fosfoglicerato que frena el desarrollo celular y la esporulación⁽¹²⁶⁾.

Si bien en el presente estudio las diferencias obtenidas no son muy pronunciadas, esto podría ser atribuido a que los requerimientos de Mn^{+2} por parte de la enzima, hayan sido satisfechos, en parte, por el aporte de este ión efectuado por el extracto de levadura.

En la figura N°10 se puede apreciar que el reemplazo del buffer PO_4H_2K/PO_4HK_2 del medio N°12 por buffer PO_4HNa_2/PO_4H_2Na (medio N°27) produjo una disminución en el desarrollo celular superior al 60%. Observaciones microscópicas -- efectuadas sobre muestras tomadas a distintas horas de proceso revelaron la presencia de células deformadas con gran número de gránulos intracelulares, coincidiendo con las observaciones realizadas por otros autores⁽⁷³⁾ quienes demuestran que cultivos de distintas cepas de Bacillus thuringiensis desarrolladas en medios deficientes en el ión K^+ , presentan numerosas inclusiones de poli-beta-hidroxibutirato, recalcando el papel esencial del K^+ en el desarrollo y esporulación de las cepas estudiadas.

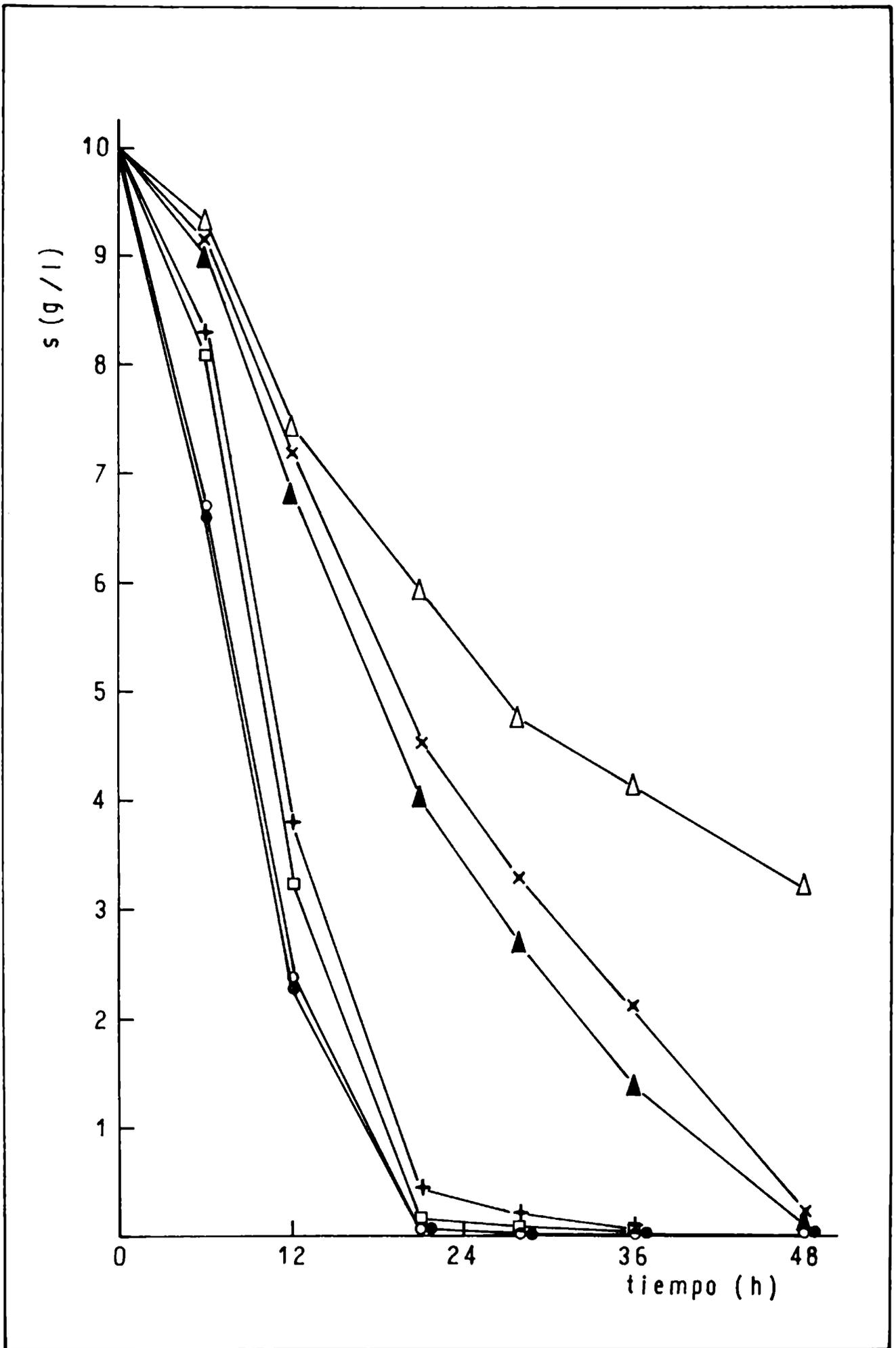


Figura N°9. Consumo de glucosa en medios con distintas combinaciones de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} .
Medios N°12 (O), 13 (+), 14 (●), 15 (□), 16 (Δ), 17 (x) y 18 (▲).

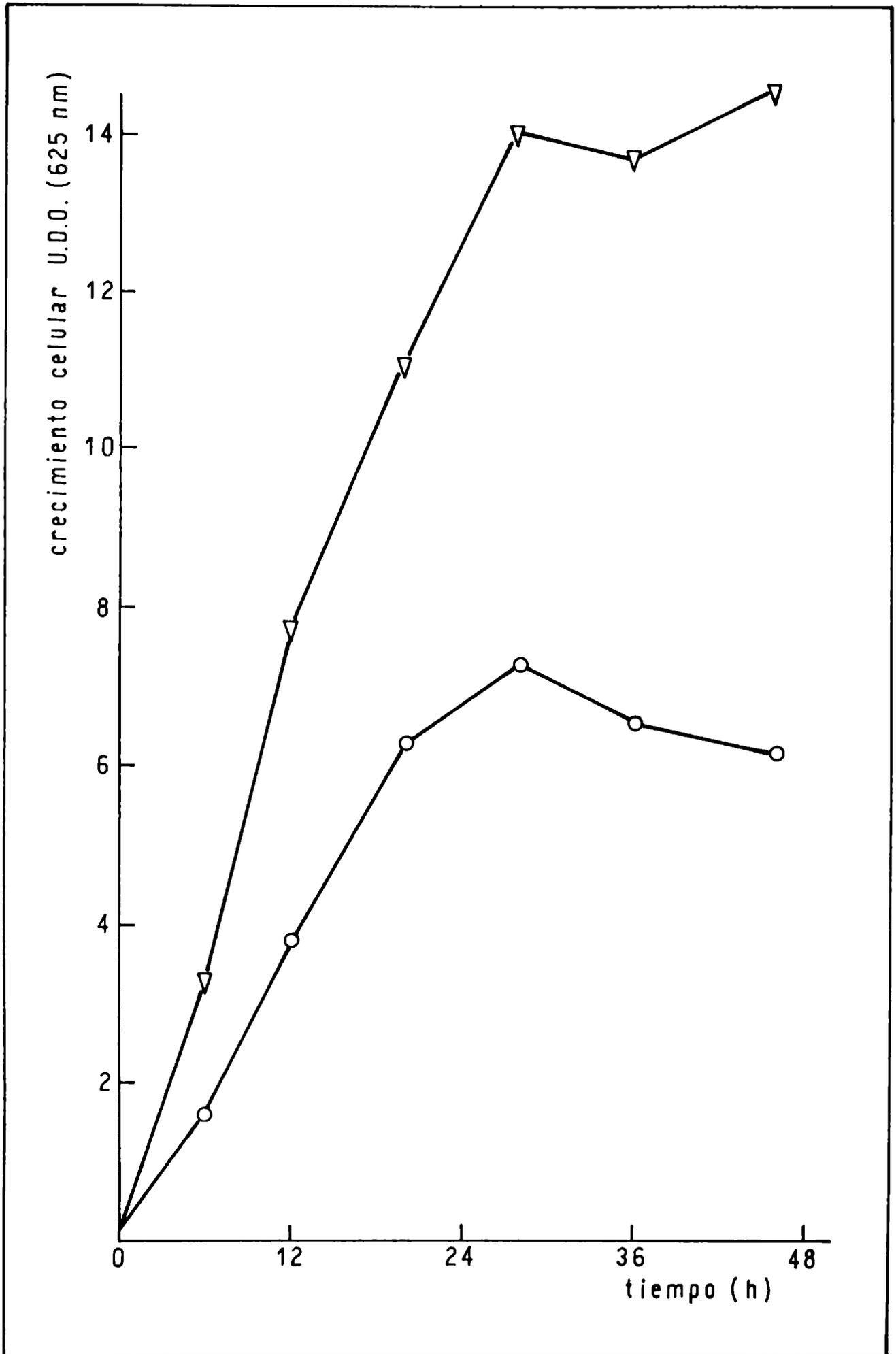


Figura N°10. Efecto de los iones K^+ y Na^+ sobre el desarrollo de Bacillus thuringiensis variedad kurstaki.
Medios N°12 (∇) y 27 (O).

Teniendo en cuenta que la relación Mg:K en bacterias Gram positivas, en las que el fosfato no limita el crecimiento, es de 1:13⁽¹²⁷⁾ se consideró excesiva la concentración de Mg^{+2} empleada, motivo por el cual se estudió el efecto de concentraciones inferiores sobre el desarrollo del microorganismo. A tal fin la concentración inicial de 4 g/l de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ del medio N°12 fue llevada en los medios N°23, 24, 25 y 13 a 3, 2, 1 y 0 g/l respectivamente.

En la figura N°11 se muestran las curvas de crecimiento correspondientes a los medios N°12, 25 y 13.

Los resultados obtenidos indican que la concentración inicial de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ puede ser reducida hasta 1 g/l sin afectar la productividad final.

Las determinaciones cuantitativas del contenido de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y K^+ del extracto de levadura indican que el aporte de estos iones efectuado por esta fuente nitrogenada fue de 0,29; 2,65; 9×10^{-3} y 257 mg/l respectivamente.

El contenido de Mn^{+2} en los medios en que se incorporó este ión, fue más de 1.000 veces superior comparado con aquellos medios que no fueron suplementados. Los resultados presentados en la Tabla N°4 ponen de manifiesto que el aporte de este ión realizado por el extracto de levadura fue insuficiente para obtener buenos resultados, lo que justificaría las diferencias observadas con los medios que fueron suplementados.

Con respecto a los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} , si se comparan los desarrollos obtenidos con los medios N°4 y 12, se hace evidente un aporte igualmente insuficiente de estos iones por parte de la fuente nitrogenada compleja.

El aporte de K^+ realizado por el extracto de levadura, si bien fue importante comparado con los otros iones, su influencia escapa a todo análisis ya que se debe recordar que todos los medios ensayados, a excepción del medio N°27, contenían buffer PO_4H_2K/PO_4HK_2 en concentración tal que realizó un aporte de K^+ 8,6 veces superior al del extracto de levadura.

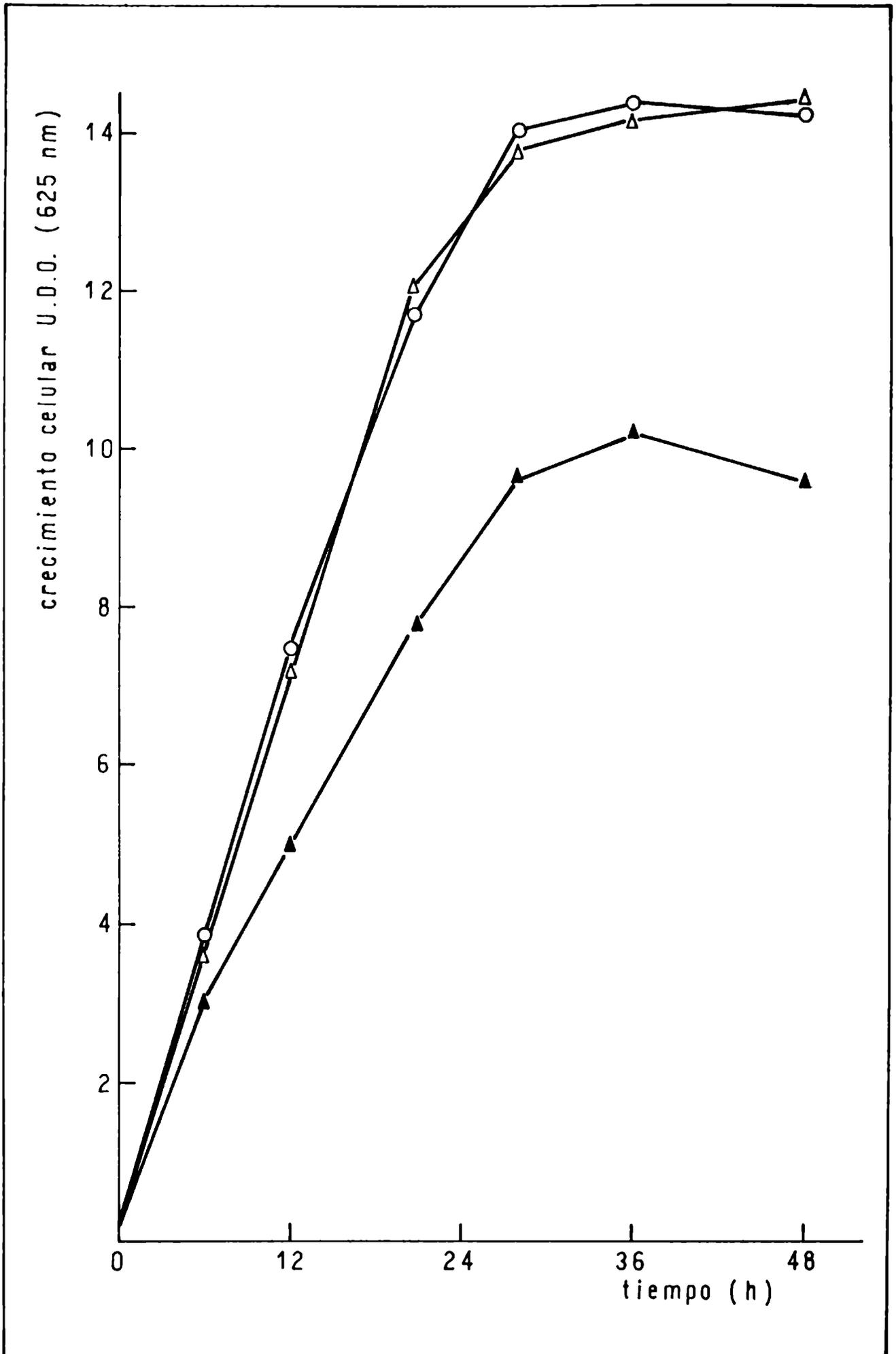


Figura N°11. Influencia de la concentración de Mg^{+2} sobre el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki. Medios N°12 (Δ), 25 (O) y 13 (\blacktriangle).

De los estudios realizados sobre la influencia del -
agregado de iones sobre el desarrollo de Bacillus thuringi-
ensis variedad kurstaki, se puede destacar la importancia
del ión K^+ en el desarrollo y esporulación y la necesidad -
de suplementar los medios con Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} ya que el -
aporte de estos iones realizado por el extracto de levadura
es insuficiente para obtener altas productividades en forma-
ción de esporos y delta-endotoxina.

2.4. Influencia de la naturaleza y concentración de la fuente de Nitrógeno.

2.4.1. Naturaleza de la fuente nitrogenada.

Se realizaron estudios tomando como base para los mismos el medio N°25 (ver composición en la Tabla N°2). El extracto de levadura de este medio fue reemplazado por bacto peptona (medio N°30), peptona MC-12 de hidrólisis ácida de caseína (medio N°31), peptona de caseína de digestión triptica (medio N°32), agua de macerado de maíz (medio N°33) y peptona de carne de digestión péptica (medio N°34) con el objeto de determinar la influencia de fuentes nitrogenadas de diferente naturaleza sobre el desarrollo y esporulación de Bacillus thuringiensis.

En la figura N°12 se presentan las curvas de crecimiento correspondientes a estos medios y en la Tabla N°6 los resultados obtenidos con los mismos.

En esta Tabla puede apreciarse que el máximo desarrollo celular fue alcanzado con extracto de levadura, obteniéndose también buenos resultados con bacto peptona y peptona de caseína.

Tabla N°6

Medio N°	x_f	UFC x 10^{10}	UFC/ x_f x 10^{11}
25	3,78	129	3,413
30	2,34	80	3,419
31	1,47	50	3,401
32	2,49	85	3,414
33	2,01	68	3,389
34	2,09	71	3,397

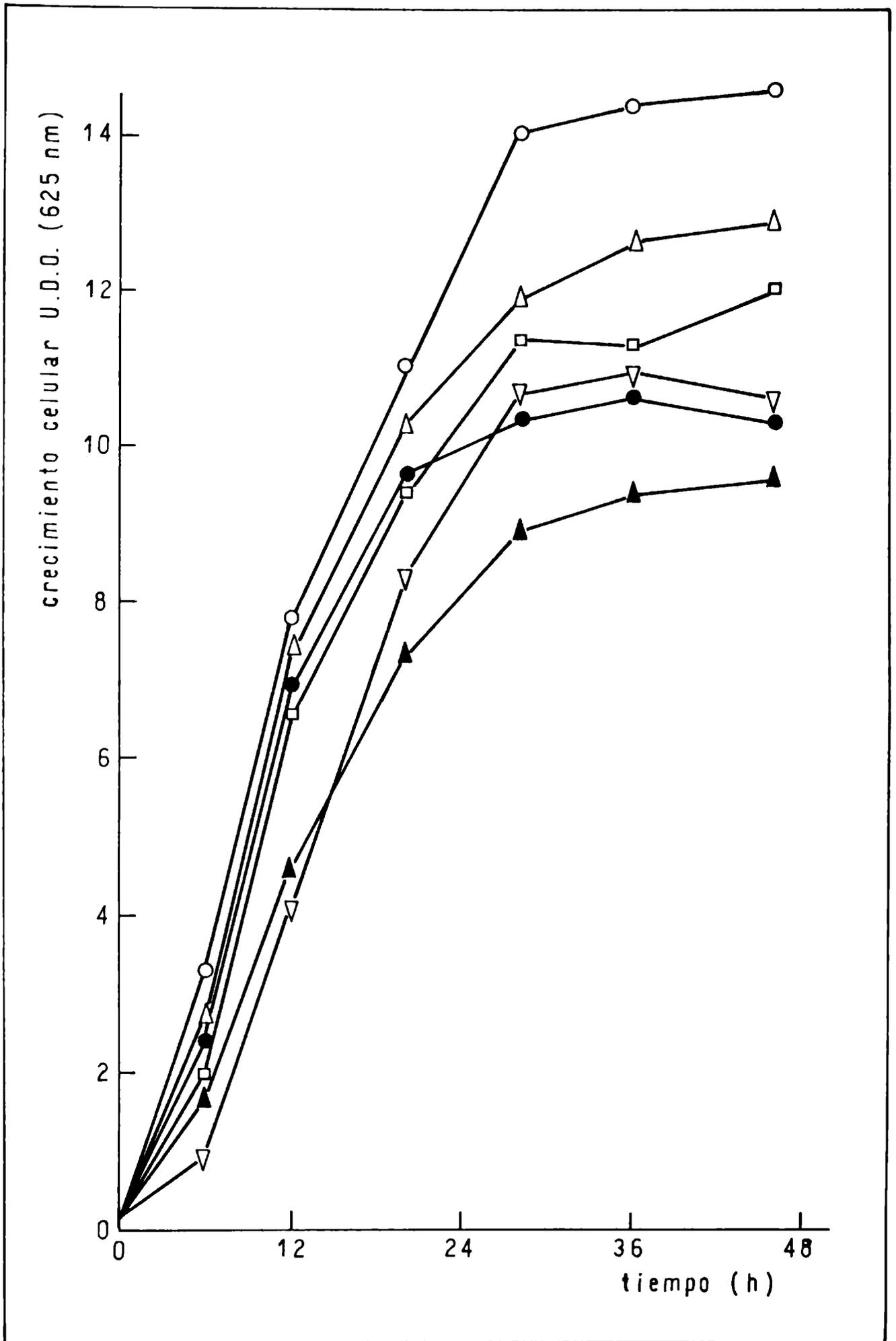


Figura N°12. Influencia de la naturaleza de la fuente de Nitrógeno sobre el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki.
Medios N°25 (○), 30 (□), 31 (▲), 32 (△), 33 (●)
y 34 (▽).

En la Tabla N°6 puede observarse además una constancia en la relación UFC/x_f la cual pondría en evidencia una relación directa entre la biomasa formada y los recuentos alcanzados.

Se realizaron además estudios con medios sintéticos (modificaciones del medio N°25) con el fin de establecer si la cepa empleada puede desarrollarse adecuadamente en esta clase de medios o requiere el aporte de factores de crecimiento incorporados por las fuentes nitrogenadas complejas, evaluándose los resultados por medidas de D.O..

Con tal propósito se realizaron estudios empleando $(NH_4)_2SO_4$ en concentración de 3 g/l (medio N°37) como única fuente de Nitrógeno. Así mismo se ensayó este medio suplementado con ácido aspártico y glutámico en concentración de 2 g/l cada uno (medio N°39) y por otra parte con un "pool" de aminoácidos integrado por: lisina, triptofano, metionina, histidina, tirosina, aspártico, glutámico, cisteína y cistina (medio N°40), todos en concentración de 0,5 g/l.

Se efectuaron también estudios con los medios N°25 y 31 que se compararon con sus modificaciones correspondientes (medios N°52 y 53), en los cuales el extracto de levadura y peptona MC-12, respectivamente, fueron sometidos a tratamiento con H_2O_2 (128), el cual destruye a la metionina, cistina, triptofano y tirosina.

Las curvas de crecimiento correspondientes a estos medios se presentan en la figura N°13.

Los resultados obtenidos con el medio N°37 ponen de manifiesto que el empleo de $(NH_4)_2SO_4$ como única fuente de Nitrógeno resultó totalmente inadecuada para el desarrollo del microorganismo, como puede apreciarse en la figura N°13. Esto pondría en evidencia que la cepa empleada no puede alcanzar buenos desarrollos sin la adición de fuentes nitrogenadas orgánicas. En tal sentido, la incorporación de ácido aspártico y glutámico a este medio (medio N°39) si bien no produjo diferencias significativas con el medio N°37, los valores de D.O. alcanzados son concordantes con los obteni-

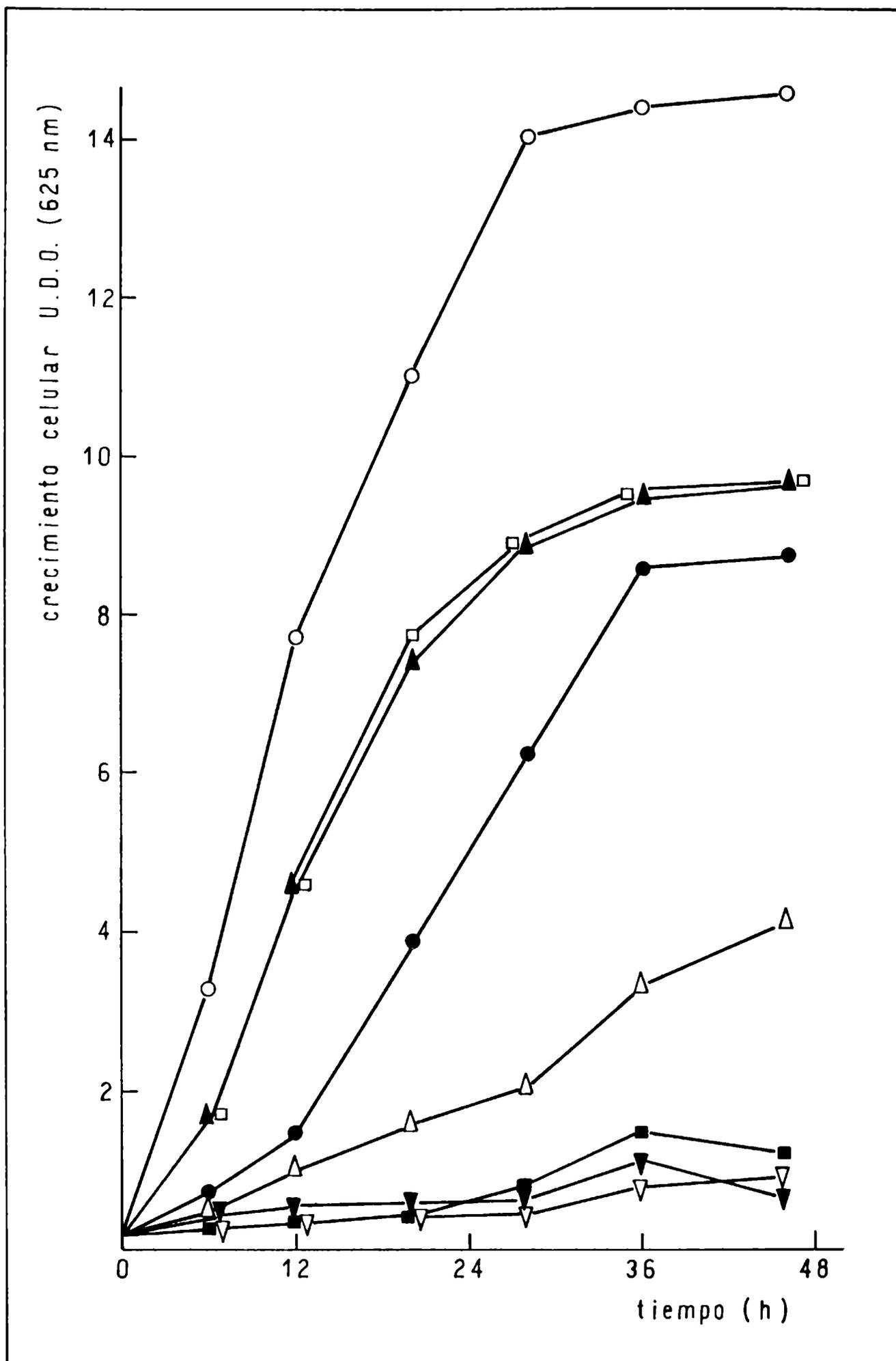


Figura N°13. Desarrollo de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki en - medios sintéticos y en medios con y sin tratamiento con H_2O_2 . Medios N°25 (O), 31 (▲), 37 (▼), 38 (□), 39 (■), 40 (▽), 52 (●) y 53 (△).

dos por Nickerson y Bulla Jr⁽⁸³⁾ en estudios similares llevados a cabo con 18 cepas de Bacillus thuringiensis.

En la figura N°13 puede apreciarse que con el medio N°40 se obtuvieron resultados similares a los logrados con los medios N°37 y 39. Al respecto, Singer y Rogoff⁽¹²⁹⁾ demostraron que la presencia de ciertos aminoácidos no requeridos para el desarrollo de Bacillus thuringiensis variedad thuringiensis, agregados a los medios de cultivo en forma individual o combinados, pueden llegar a afectar el desarrollo del microorganismo e incluso inhibirlo, dependiendo de la concentración.

Con el medio N°31, el empleo de peptona MC-12 obtenida por hidrólisis ácida de caseína, motivo por el cual cuenta en su composición con aminoácidos libres a excepción de triptofano, el cual es destruido en el tratamiento, se logró como puede verse en la Tabla N°6, un recuento final de 50×10^{10} UFC. Esto pone de manifiesto que la utilización de aminoácidos libres en proporciones adecuadas, puede contribuir al desarrollo de la cepa empleada en los ensayos. Los resultados obtenidos con el medio N°40 revelan que ciertos aminoácidos presentes en la peptona MC-12 serían indispensables para el desarrollo del microorganismo, o bien que la concentración de uno o más aminoácidos empleada en el medio N°40 produjo un efecto inhibitorio como ya se mencionó.

La adición de triptofano al medio N°31 en concentración de 0,5 g/l (medio N°38), no produjo diferencias apreciables sobre el desarrollo del microorganismo como puede apreciarse en la figura N°13.

Debido a que la cepa empleada no tiene requerimientos vitamínicos⁽⁸³⁾, los resultados obtenidos con extracto de levadura podrían ser atribuidos a la presencia, en esta fuente nitrogenada compleja, de ciertos polipéptidos que serían indispensables para alcanzar elevados desarrollos celulares.

En la figura N°13 puede observarse que con los me---

dios N°25 y 31 tratados con H_2O_2 (medios N°52 y 53 respectivamente) se obtuvieron resultados desfavorables en ambos casos, lo cual haría pensar que la presencia de alguno de los aminoácidos destruidos durante el tratamiento, o combinaciones de ellos, en concentraciones adecuadas, sería de importancia para obtener buenos rendimientos celulares.

Los resultados presentados en la Tabla N°6 muestran diferencias claras entre las distintas peptonas ensayadas.- La de hidrólisis ácida produjo los recuentos más bajos mientras que aquellas obtenidas por hidrólisis enzimática mostraron incrementos en los recuentos de hasta un 70%, lo que confirmaría la hipótesis anterior sobre la importancia de la presencia de ciertos polipéptidos para alcanzar buenos desarrollos celulares. Las diferencias logradas entre las distintas peptonas estudiadas podrían ser atribuidas a la diferente naturaleza de las mismas y al tipo de hidrólisis a que fueron sometidas para su obtención.

2.4.2. Concentración de la fuente nitrogenada.

Teniendo en cuenta que los mejores resultados se obtuvieron con la combinación extracto de levadura- $(NH_4)_2SO_4$ en relación 4:1, respectivamente, se decidió ensayar distintas combinaciones de estas fuentes nitrogenadas con la idea de incrementar los rendimientos celulares. Con tal objeto, la relación mencionada anteriormente, fue modificada como se muestra en la Tabla N°7, en la cual se presentan además los resultados finales alcanzados.

En la figura N°14 pueden observarse las curvas de crecimiento obtenidas con los distintos medios ensayados.

En la Tabla N°7 puede apreciarse que en el medio N°44, la utilización del doble de concentración de extracto de levadura, comparada con la del medio N°25, no produjo resultados positivos como puede apreciarse en los valores de recuento y peso seco final, lo que podría atribuirse a un desbalance nutricional producido en las condiciones de ensayo, al llevar la relación C/N del medio N°25 de 6,35 a 3,81.

Tabla N°7

Medio N°	R	x_f	UFC x 10^{10}	UFC/ x_f x 10^{11}
25	4:1	3,85	131	3,403
43	4:3	3,48	84	2,414
44	8:1	3,58	122	3,407
45	6:0	3,83	130	3,394
46	3:1	3,00	102	3,400

R = relación extracto de levadura- $(NH_4)_2SO_4$ en g/l.

Esto pondría en evidencia la importancia de contar con medios de cultivo adecuadamente balanceados para obtener buenos desarrollos celulares.

Con el medio N°45, que presentó el mismo contenido inicial de Nitrógeno que el medio N°25, se obtuvieron resultados comparables a los de este último, lo que pone en evidencia que el extracto de levadura puede suplantar al (NH₄)₂SO₄ sin alterar los resultados.

El empleo de concentraciones de extracto de levadura inferiores a la del medio N°25, hizo que en el medio N°46, los valores de peso seco final y recuento disminuyeran en forma proporcional, como puede apreciarse en la constancia de la relación UFC/ x_f .

Teniendo en cuenta que con los cambios introducidos en la concentración inicial de extracto de levadura no se logró mejorar los resultados, se decidió aumentar la concentración de (NH₄)₂SO₄ con la idea de incrementarlos, pero como puede apreciarse en la Tabla N°7, con el medio N°43 se alcanzaron los valores más bajos de recuento. Si bien el microorganismo pudo crecer alcanzando un valor de peso seco final 10% inferior al del medio N°25, la relación UFC/ x_f obtenida (30% inferior al valor medio del resto de los medios ensayados) pone en evidencia la presencia de un efecto inhi

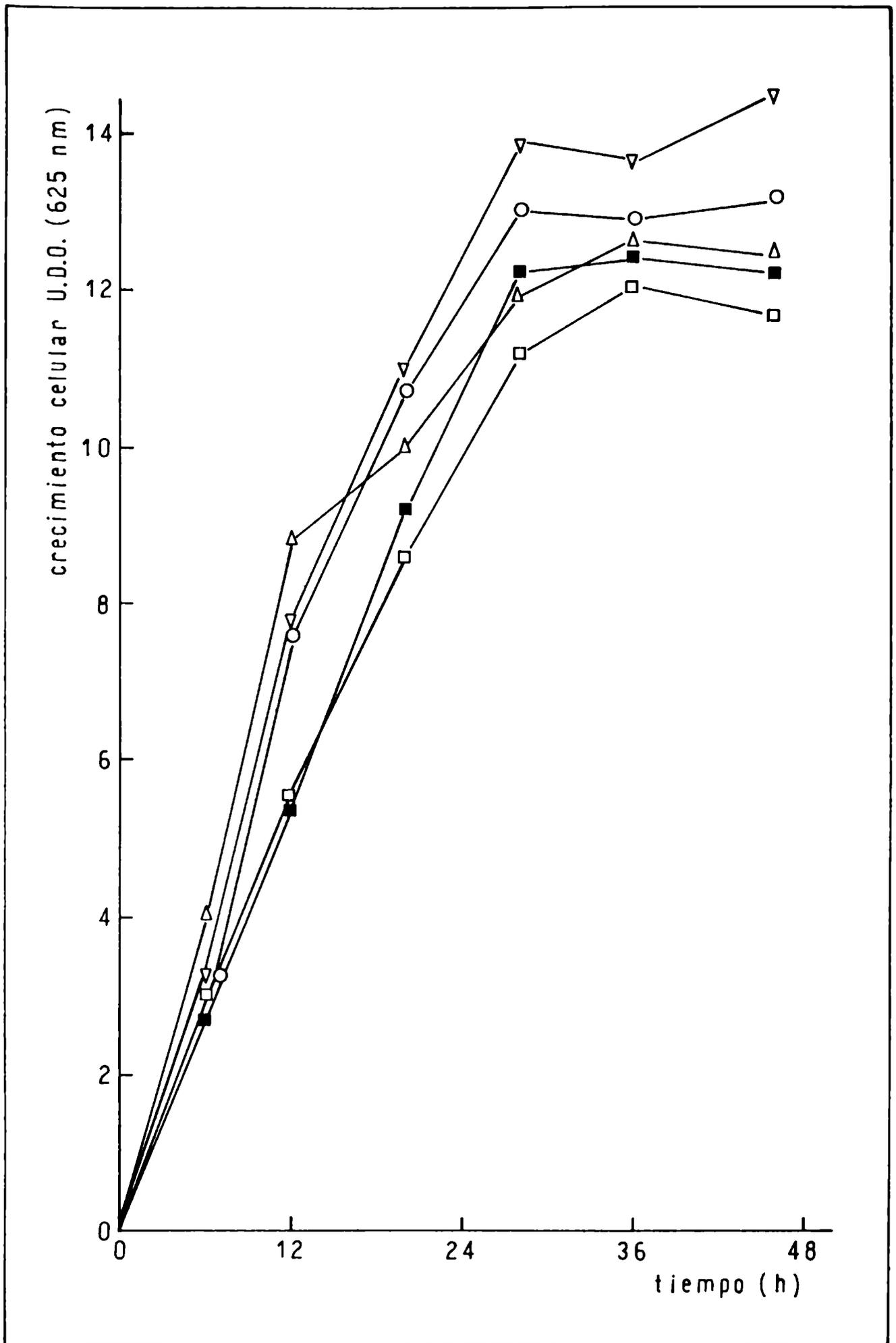


Figura N°14. Efecto de la concentración de las fuentes nitrogenadas sobre el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*. Medios N°25 (▽), 43 (□), 44 (Δ), 45 (○) y 46 (■).

bidor de la esporulación, que podría ser atribuido a los bajos valores de pH alcanzados durante el cultivo, que descendieron desde 7,00 a la hora de siembra hasta 4,85 a las 28 horas de proceso.

Los resultados obtenidos en estos estudios, ponen de manifiesto que la cepa empleada en los mismos requiere, para alcanzar altas productividades, la utilización de fuentes nitrogenadas de composición compleja en la formulación de los medios de cultivo.

Teniendo en cuenta que con los medios N°25 y 45 se obtuvieron los mejores resultados y al no presentar los mismos diferencias apreciables, se decidió continuar los estudios con el primero de ellos, por ser el de menor costo.

2.5. Empleo de extracto de raíz de malta como fuente alternativa de Nitrógeno y factores de crecimiento.

Teniendo en cuenta que el extracto de levadura es un componente costoso de los medios de cultivo es de fundamental importancia contar con fuentes alternativas más económicas, que lo puedan suplantar adecuadamente en la formulación de medios de producción.

La raíz o brote de malta, es un subproducto de la producción de malta, cuyo contenido en proteínas, carbohidratos y factores de crecimiento⁽¹³⁰⁾ hacen que el mismo presente un marcado interés, en vías de su utilización como componente de medios de cultivo.

Ha sido utilizado con éxito en la obtención de ácido láctico⁽¹³¹⁾, en el desarrollo de levaduras en condiciones anaerobias⁽¹³²⁾, en la obtención de ácido acético⁽¹³³⁾ y en la producción de proteínas unicelulares⁽¹³⁴⁾.

Con el objeto de determinar si este subproducto industrial podría ser utilizado como sustituto del extracto de levadura en el desarrollo de Bacillus thuringiensis, se realizaron ensayos en los que la fuente nitrogenada compleja del medio N°25 fue reemplazada por distintos volúmenes de extracto de raíz de malta (ERM), preparado como se indicó en el punto 1.3.. Estos volúmenes correspondieron a un equivalente de 17 g de sólidos de ERM, en los medios N°60 y 61 y a 27 g de sólidos de ERM, en los medios N°62 y 63. Los medios N°60 y 62 presentan, como se indicara, la misma composición que el medio N°25 salvo la modificación introducida, mientras que los medios N°61 y 63 son modificaciones de los medios N°60 y 62 respectivamente, en los cuales los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} no fueron incorporados en su formulación.

En la Tabla N°8 se presentan los resultados obtenidos en este estudio comparativo.

Puede apreciarse que los medios conteniendo ERM producen altos rendimientos en biomasa y formación de esporos.

Si bien estos resultados parecen indicar que el empleo de este subproducto es más apropiado para el desarrollo de Bacillus thuringiensis que el extracto de levadura, se debe tener en cuenta que el contenido total de Nitrógeno de los medios N°60 y 61 (1,126 g de Nitrógeno/l de medio) fue 1,8 veces superior al del testigo (0,630 g de Nitrógeno/l de medio) y de 2,6 veces (1,665 g de Nitrógeno/l de medio) en el caso de los medios N°62 y 63. De igual forma se vió incrementado el contenido inicial de carbohidratos, debido al aporte efectuado por el ERM. Estas diferencias en la composición de los medios modificados, comparada con la del medio N°25 hacen comprensibles los altos rendimientos alcanzados.

La presencia de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} en el medio N°60 produjo un marcado incremento en los valores de recuento y peso seco final, comparado con el medio N°61. El mismo efecto se pudo apreciar con los medios N°62 y 63, coincidiendo estos resultados con las observaciones anteriormente efectuadas al respecto.

Tabla N°8

Medio N°	x_f	UFC x 10^{10}	UFC/ x_f x 10^{11}
25	3,84	129	3,359
60	5,85	192	3,282
61	4,69	154	3,284
62	7,27	239	3,287
63	6,62	217	3,278

En la Tabla N°9 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la CL_{50} para las preparaciones esporo-cristal de Bacillus thuringiensis obtenidas con el

medio N°62.

En base a la correlación obtenida entre el logaritmo de la concentración de esporos y probit, se obtuvo una CL_{50} para los preparados ensayados de $2,18 \times 10^8$ esporos/g de alimento, la cual concuerda con la obtenida en un ensayo comparativo con el medio N°25, lo que pone en evidencia que la toxicidad de los preparados no se ve afectada al sustituir la fuente nitrogenada compleja del testigo por ERM.

Tabla N°9

N°de esporos por g de alimento	N° total de larvas Total	Muertas	Mortalidad porcentual	Probit
$1,48 \times 10^8$	42	18	43	4,82
$2,08 \times 10^8$	42	20	48	4,95
$3,00 \times 10^8$	42	24	57	5,18
$4,17 \times 10^8$	42	27	64	5,36
$6,00 \times 10^8$	42	35	83	5,95

Observaciones microscópicas realizadas en preparados de muestras tomadas de la última hora de proceso, revelaron la presencia de un escaso porcentaje de células sin lisar, como puede verse de la constancia de la relación UFC/x_f , tan sólo un 2,2 a 2,5% inferior a la observada con el medio N°25 que presentó una lisis total del cultivo.

El empleo de altas concentraciones de ERM resultaron adecuadas para obtener niveles elevados de desarrollo microbiano como puede verse de los resultados obtenidos con el medio N°62.

Es interesante destacar los resultados obtenidos con el medio N°63 que carece de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} no obstante lo cual se obtuvieron valores de UFC elevados lo que podría ser explicado por el aporte de dichos iones rea-

lizado por el ERM. Este aspecto podría tener importancia -- ya que de esta forma se simplificaría la formulación del me dio.

Los resultados obtenidos demuestran que el ERM puede sustituir con éxito al extracto de levadura, como fuente de Nitrógeno y factores de crecimiento, en los medios de cultivo para el desarrollo de la cepa empleada.

2.6. Influencia de la naturaleza y concentración de la fuente de Carbono.

Se realizaron experiencias en las que se tomó como base para los estudios el medio N°25. La fuente hidrocarbonada del mismo (glucosa en concentración de 10 g/l), fue reemplazada en los medios N°65, 66, 67 y 68, por almidón, sacarosa, glicerol y melaza, respectivamente, todas en la misma concentración inicial en la que se hallaba la glucosa en el medio N°25.

En la figura N°15 pueden observarse las curvas de crecimiento para Bacillus thuringiensis correspondientes a los distintos medios ensayados.

Los valores de D.O. alcanzados con el medio conteniendo glucosa, indican que esta fuente hidrocarbonada es la más apropiada para el desarrollo del bacilo. Estas observaciones se corresponden con los más altos recuentos celulares y valores de peso seco final alcanzados, como puede verse en la Tabla N°10.

Tabla N°10

Medio N°	x_f	UFC x 10^{10}	UFC/ x_f x 10^{11}
25	3,82	130	3,403
65	3,24	110	3,395
66	0,82	28	3,414
67	2,29	78	3,406
68	1,20	41	3,416

De modo análogo a lo observado en los estudios realizados sobre la influencia de la naturaleza y concentración de la fuente de Nitrógeno, puede apreciarse una constancia-

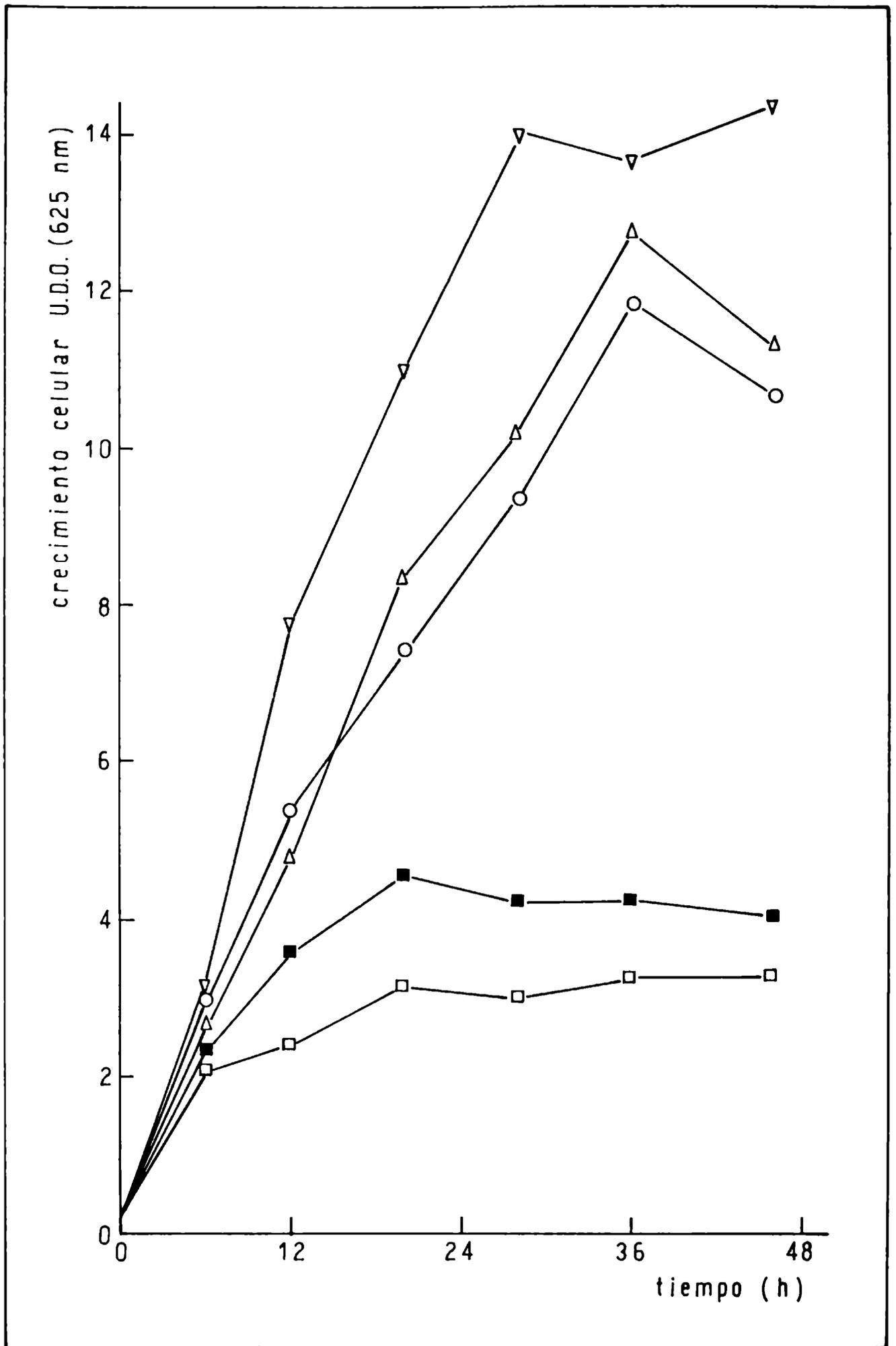


Figura N°15. Efecto de la naturaleza de la fuente de Carbono sobre el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki. Medios N°25 (∇), 65 (Δ), 66 (□), 67 (○) y 68 (■).

en los valores de UFC/x_f.

Si bien con almidón se lograron recuentos del orden del 15% inferiores a los obtenidos con glucosa, los rendimientos alcanzados, hacen comprensible la utilización de esta fuente carbonada, a nivel industrial, para la producción de Bacillus thuringiensis.

En base a los resultados logrados, se decidió continuar los estudios utilizando medios a base de glucosa como fuente de Carbono.

Con el objeto de estudiar el efecto de la concentración de glucosa sobre el desarrollo celular, se realizaron experiencias en las que se tomó como base de las mismas al medio N°25. La única modificación introducida a este medio a tal fin, fue variar la concentración inicial de la fuente hidrocarbonada desde 4 g/l hasta 30 g/l como puede verse en la Tabla N°11.

En la figura N°16 se presentan las curvas de crecimiento de Bacillus thuringiensis con los distintos medios ensayados.

En la Tabla N°11, puede apreciarse que los recuentos más altos se alcanzaron con el medio N°73. Sin embargo, la conversión de la fuente carbonada en esporos fue ineficiente, comparada con medios de menor concentración de glucosa, como puede verse en la relación UFC/s. Esto podría ser atribuido a que la concentración de la fuente carbonada empleada en ese medio produjo una desviación del metabolismo del microorganismo orientándolo hacia la formación de ácidos, como lo ponen de manifiesto los bajos valores de pH alcanzados durante el cultivo, que llegaron a 5,20 a las 20 horas de proceso. Esto se hizo más evidente en el medio N°74, donde el pH alcanzado (4,70 a la misma hora de proceso que en el caso anterior) afectó seriamente la esporulación como puede apreciarse en los bajos recuentos alcanzados.

Observaciones microscópicas efectuadas sobre preparados del medio N°74 de muestras tomadas a diferentes horas de proceso, revelaron la presencia de células conteniendo -

numerosos gránulos y un cristal amorfo.

Tabla N°11

Medio N°	s _o	UFC x 10 ¹⁰	UFC/s x 10 ¹¹
70	4	53	1,325
71	8	107	1,338
25	10	131	1,310
72	15	157	1,276
73	20	175	1,080
74	30	65	0,481

Los resultados alcanzados con el medio N°73, sugie--
ren la posibilidad de utilizar mayores concentraciones de -
glucosa con la idea de incrementar los rendimientos, pero -
en base a los recuentos logrados con el medio N°74, esto só-
lo podría ser posible con un adecuado control de pH durante
el desarrollo del cultivo.

Trabajando con concentraciones menores de 20 g/l de-
glucosa, se alcanzaron inferiores valores en los recuentos,
pero la productividad en base a sustrato consumido se vio -
incrementada como puede verse en los resultados presentados
en la Tabla N°11.

Teniendo en cuenta que los medios N°70 y 71 mostra--
ron un comportamiento proporcional a la concentración de -
fuente de carbono utilizada, se adoptó este último para con-
tinuar los estudios por obtenerse con el mismo una mayor --
productividad.

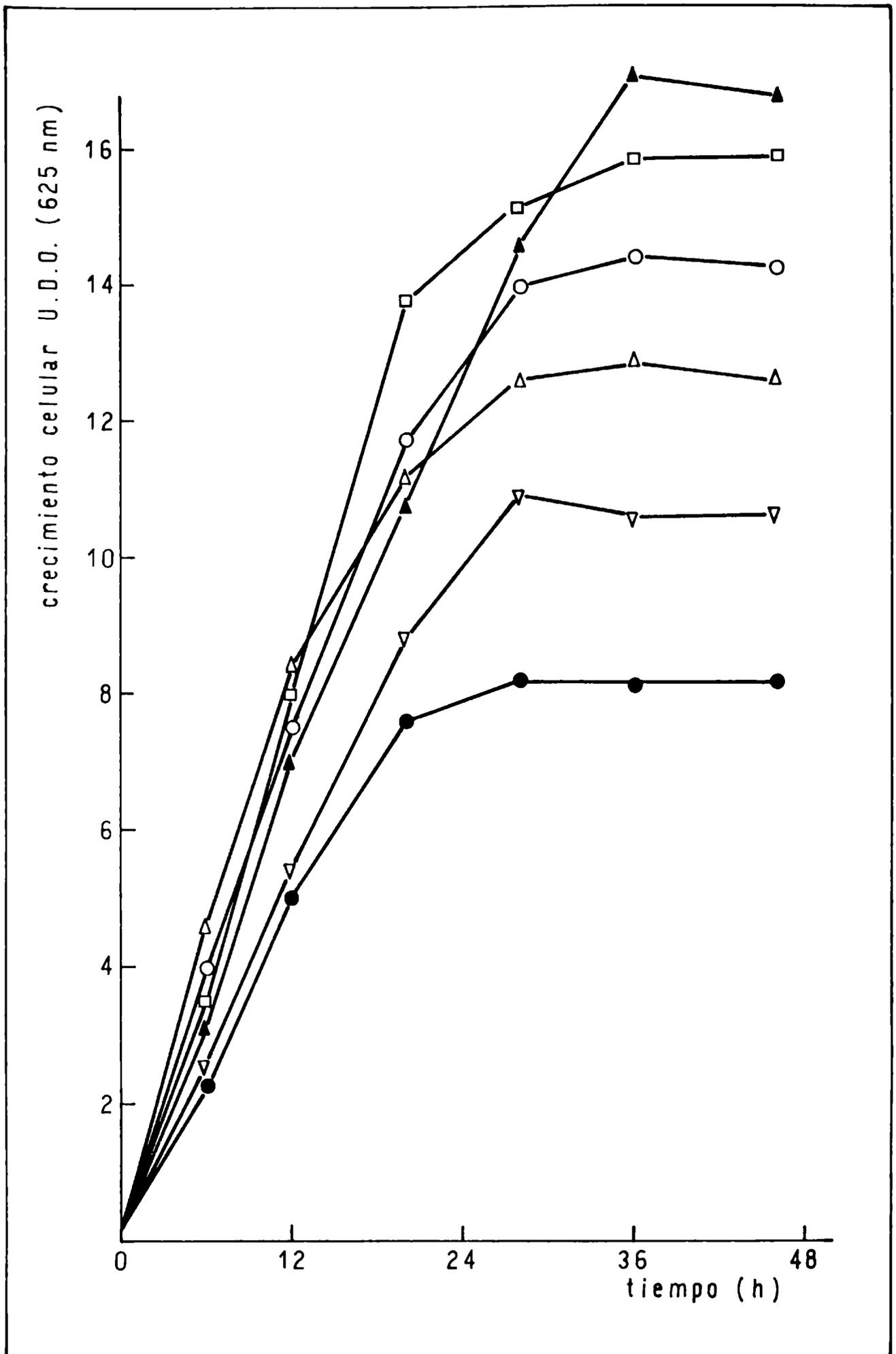


Figura N°16. Efecto de la concentración de glucosa sobre el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki.
Medios N°25 (O), 70 (●), 71 (Δ), 72 (□), 73 (▲) y 74 (▽).

2.7. Efecto de la concentración de los componentes del medio de cultivo sobre parámetros de crecimiento y productividad de preparados de Bacillus thuringiensis.

Previa realización de estos ensayos se procedió a estudiar el efecto de concentraciones inferiores de buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ sobre el desarrollo de la cepa empleada, con la idea de emplear en los estudios posteriores, un medio de menor costo.

Con tal propósito la relación inicial del buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ del medio N° 71 de 3:3 g/l, fue modificada como se muestra en la Tabla N°12. En esta misma Tabla se presentan los resultados obtenidos en este ensayo preliminar.

Tabla N°12

Medio N°	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$	D.O. final	pH final
79	0,5:0,5	9,00	4,35
80	1,0:1,0	14,60	6,80
81	1,5:1,5	14,70	6,85
82	2,0:2,0	14,35	6,80
83	2,5:2,5	14,50	6,85
71	3,0:3,0	14,70	6,90

En esta Tabla puede apreciarse que la concentración del buffer puede ser reducida hasta una relación (g/l) 1:1, sin que se detecten diferencias apreciables en los valores de D.O. y pH finales. El descenso de pH observado en el medio N°79 produjo un efecto inhibitorio, oportunamente discutido en el punto 2.6., como queda reflejado en el valor de D.O. final.

En base a los resultados obtenidos se decidió emple-

ar el medio N°80 como medio base de los estudios en sistema de cultivo discontinuo.

Con el objeto de arribar a un medio de cultivo que asegurara altas concentraciones de esporos y cristales, se procedió a incrementar 3, 5, 7, 9 y 11 veces la concentración de los componentes del medio N°80, como puede observarse en la Tabla N°13.

En las figuras N°17, 18, 19, 20, 21 y 22, se presentan las curvas de crecimiento obtenidas con los medios empleados en los estudios.

Se hace evidente que la cepa utilizada puede desarrollarse en medios con elevada concentración de nutrientes.

A medida que se incrementa la concentración de los componentes de los medios, el tiempo requerido para alcanzar el máximo valor de biomasa aumenta desde 12 horas con el medio N°80 hasta 30 horas con el medio N°111. Luego de alcanzado el máximo desarrollo se obtuvieron valores de peso seco inferiores debidos a la lisis celular producida.

En todos los casos el comienzo del consumo de glucosa coincidió con el inicio de la fase de crecimiento exponencial y prácticamente no se detectó glucosa remanente en los cultivos cuando se alcanzó el máximo desarrollo celular.

Los valores de biomasa y parámetros de crecimiento obtenidos con los medios utilizados se presentan en la Tabla N°14.

La concentración celular aumentó con el aumento de la concentración de nutrientes hasta el medio N°109 (nueve veces más concentrado que el medio N°80). La utilización de concentraciones superiores de nutrientes resultó ser perjudicial para el desarrollo del microorganismo, como queda reflejado en el valor de peso seco máximo alcanzado con el medio N°111. Así mismo se observó una disminución en los valores de $Y_{x_m/s}$ e Y_{x_m/O_2} con el incremento de concentración de los componentes del medio, lo cual podría ser atribuido a elevadas demandas de energía para mantenimiento celular. En el caso de los rendimientos en base a O_2 consumido, la ten-

Tabla N°13

Composición de los medios con altas concentraciones de componentes empleados en sistema discontinuo en escala de tanques agitados.

Componentes (g/l)	Medios N°						
	80	103	105	107	109	111	
Glucosa	8	24	40	56	72	88	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	3	5	7	9	11	
Extracto de levadura	4	12	20	28	36	44	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1	3	5	7	9	11	
KH_2PO_4	1	3	5	7	9	11	
K_2HPO_4	1	3	5	7	9	11	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,041	0,123	0,205	0,287	0,369	0,451	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,030	0,090	0,150	0,210	0,270	0,330	
*Osmolaridad	128	358	602	808	1.068	1.294	

*expresada en miliosmoles.

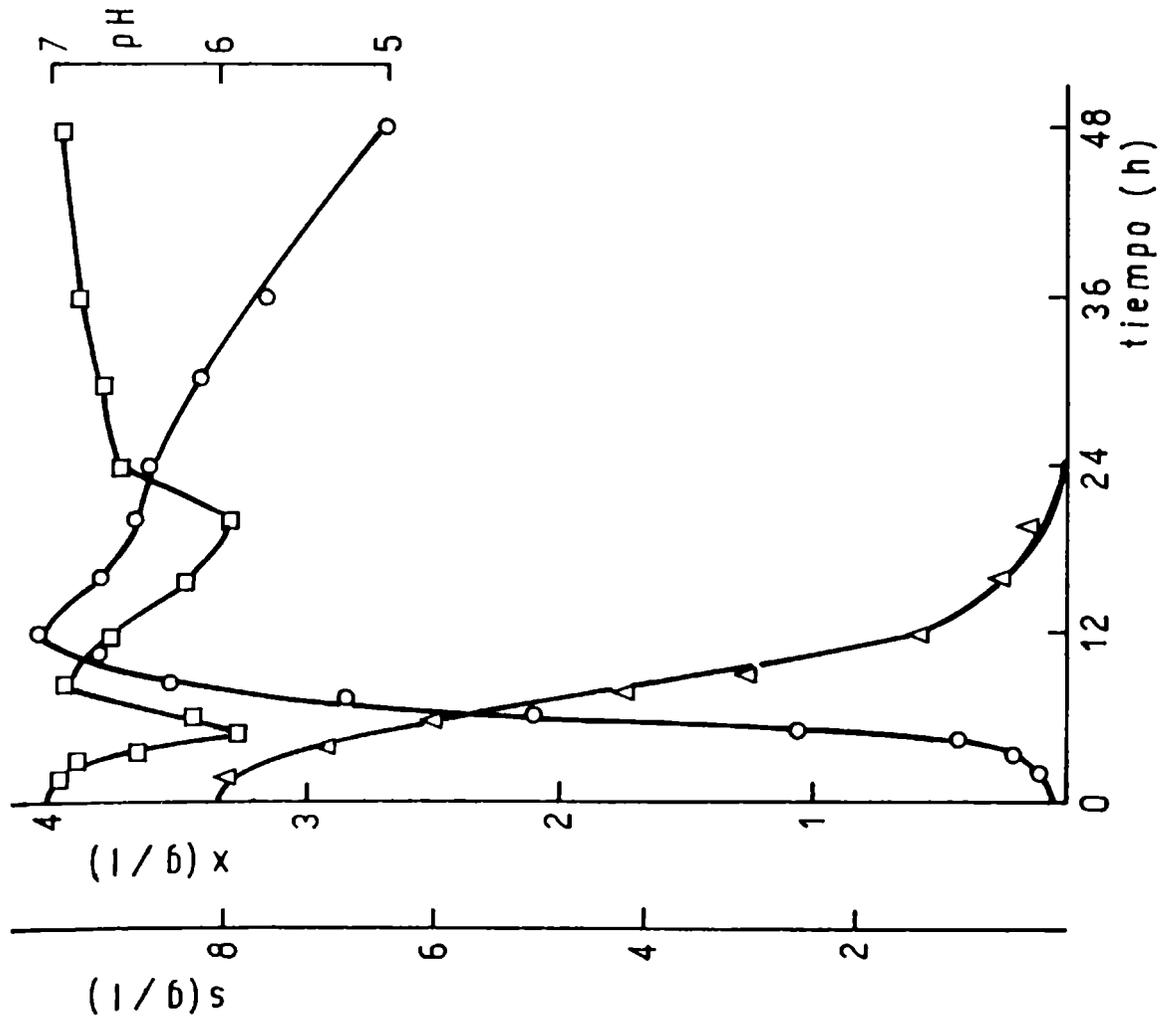


Figura N°17. Curvas de crecimiento (O), consumo - de glucosa (Δ) y evolución de pH (□) obtenidas con el Medio N°80.

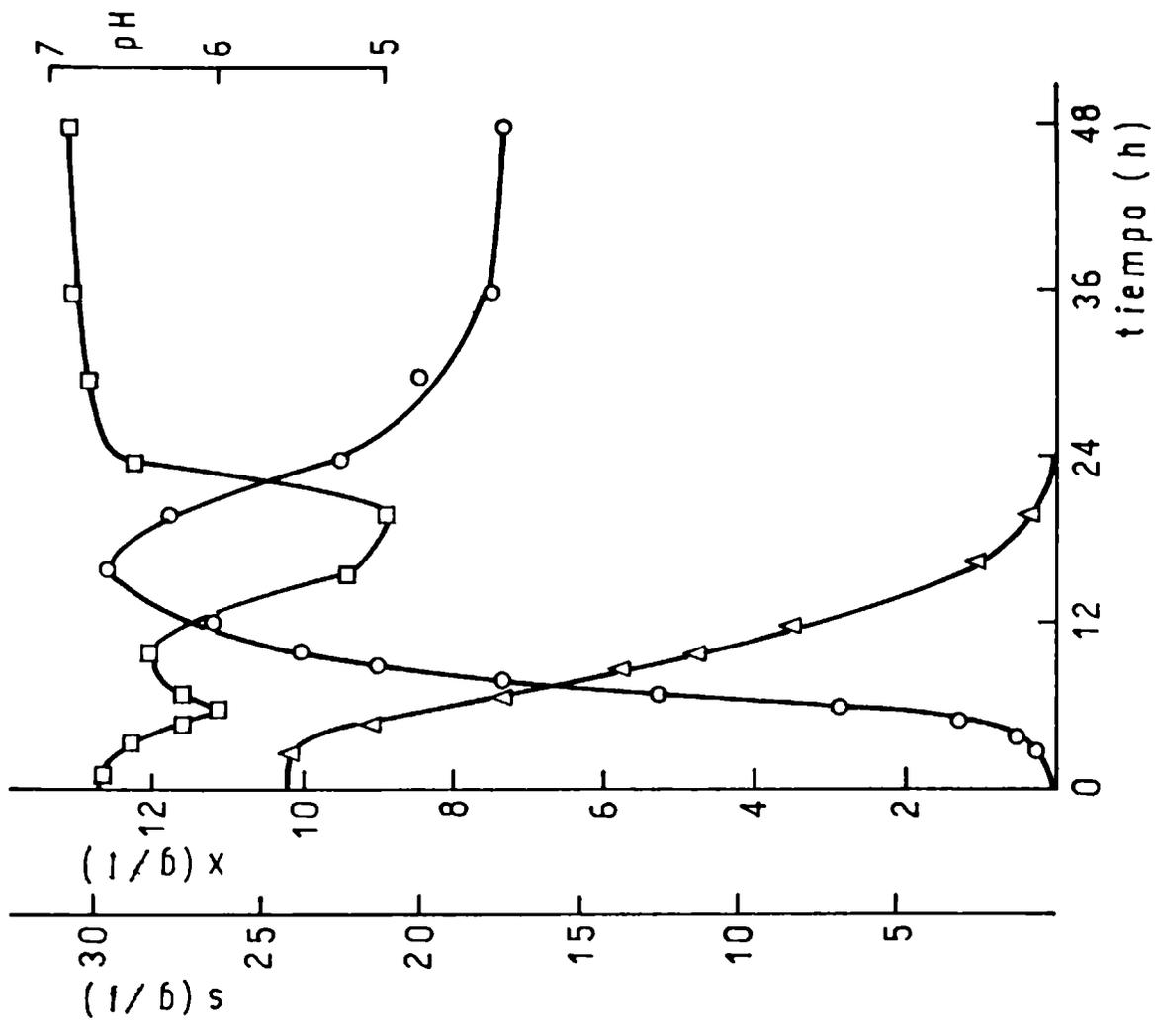


Figura N°18. Curvas de crecimiento (O), consumo - de glucosa (Δ) y evolución de pH (□) obtenidas con el Medio N°103.

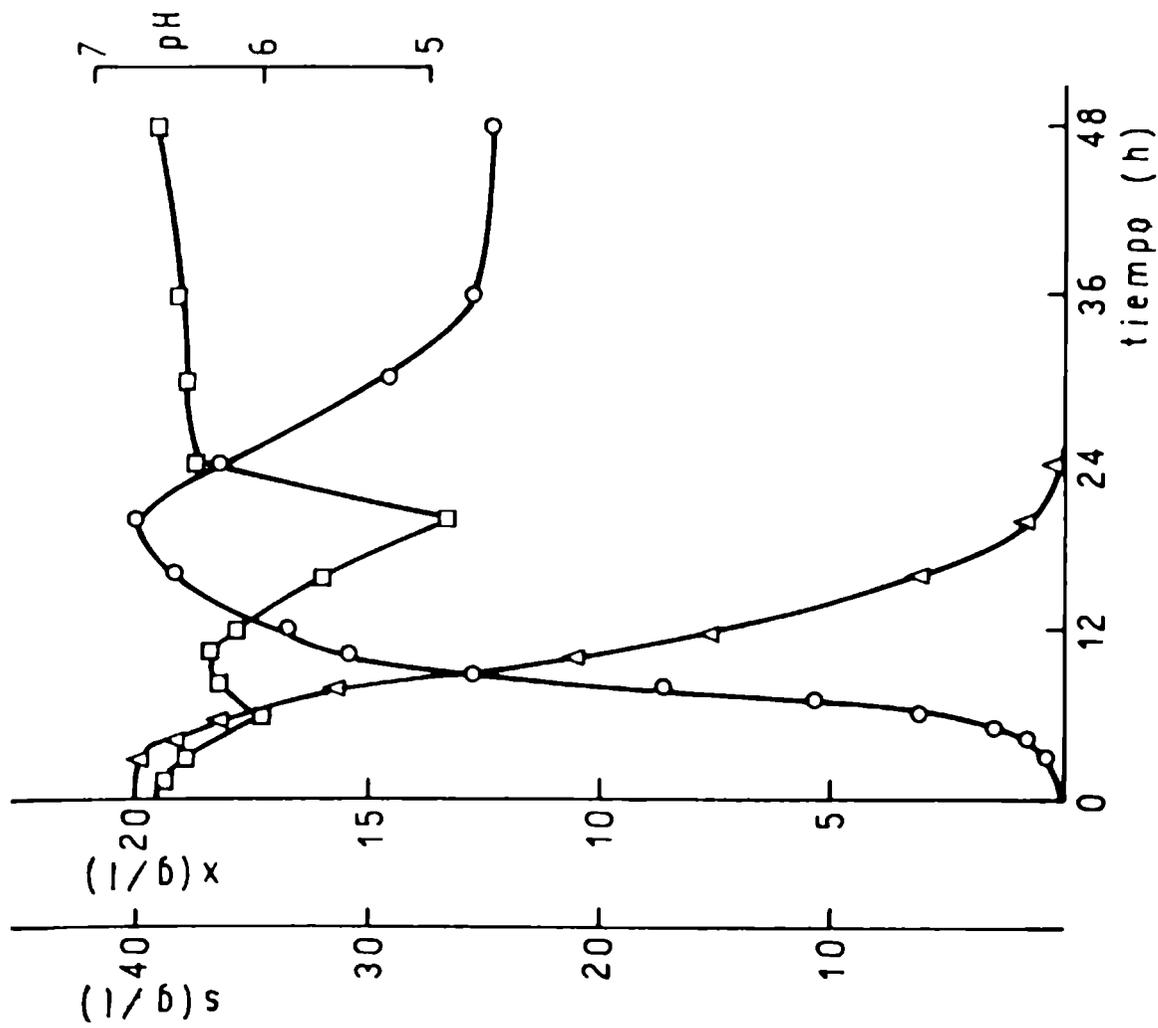


Figura N°19. Curvas de crecimiento (O), consumo - de glucosa (Δ) y evolución de pH (\square) obtenidas con el Medio N°105.

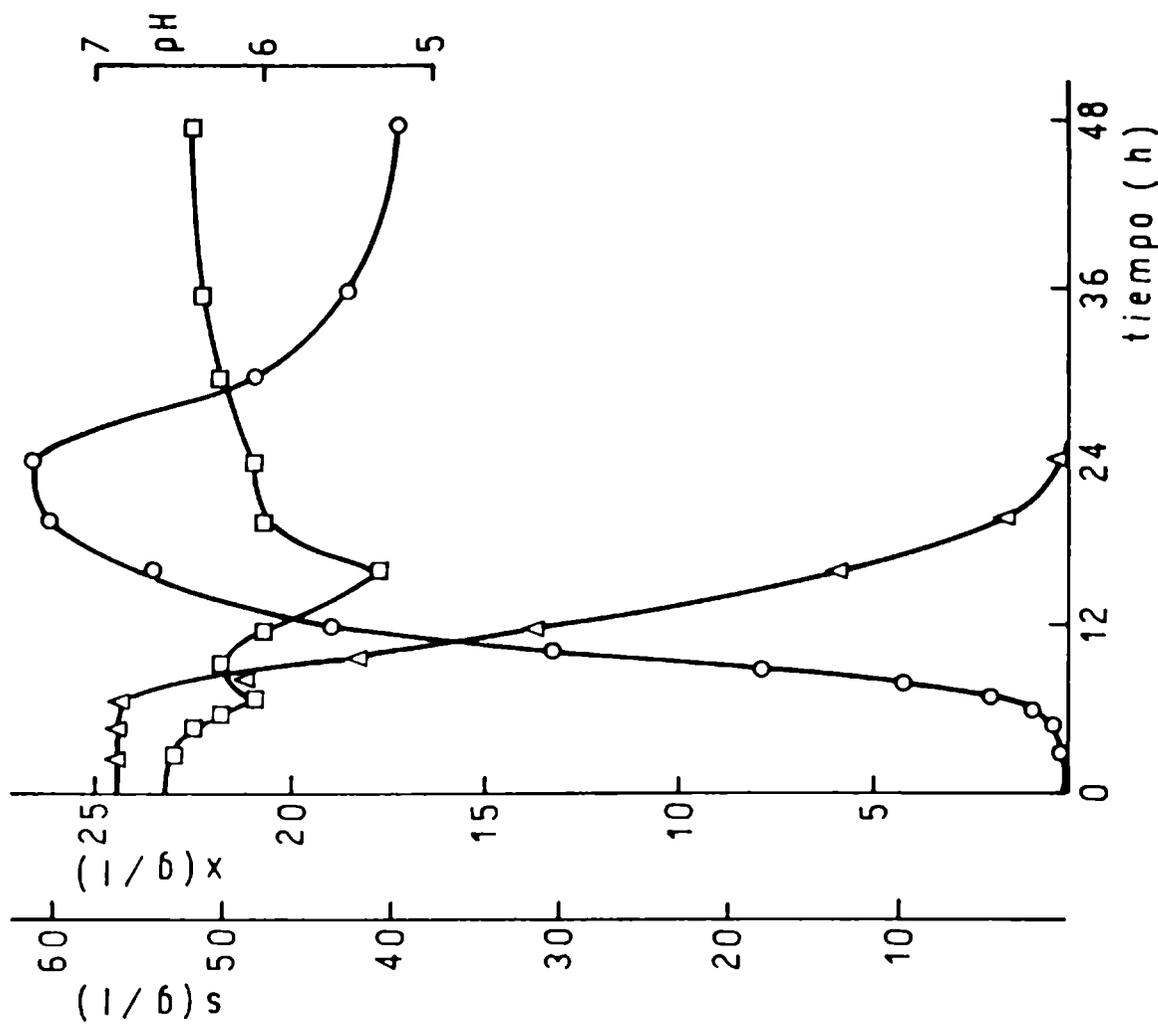


Figura N°20. Curvas de crecimiento (O), consumo - de glucosa (Δ) y evolución de pH (\square) obtenidas con el Medio N°107.

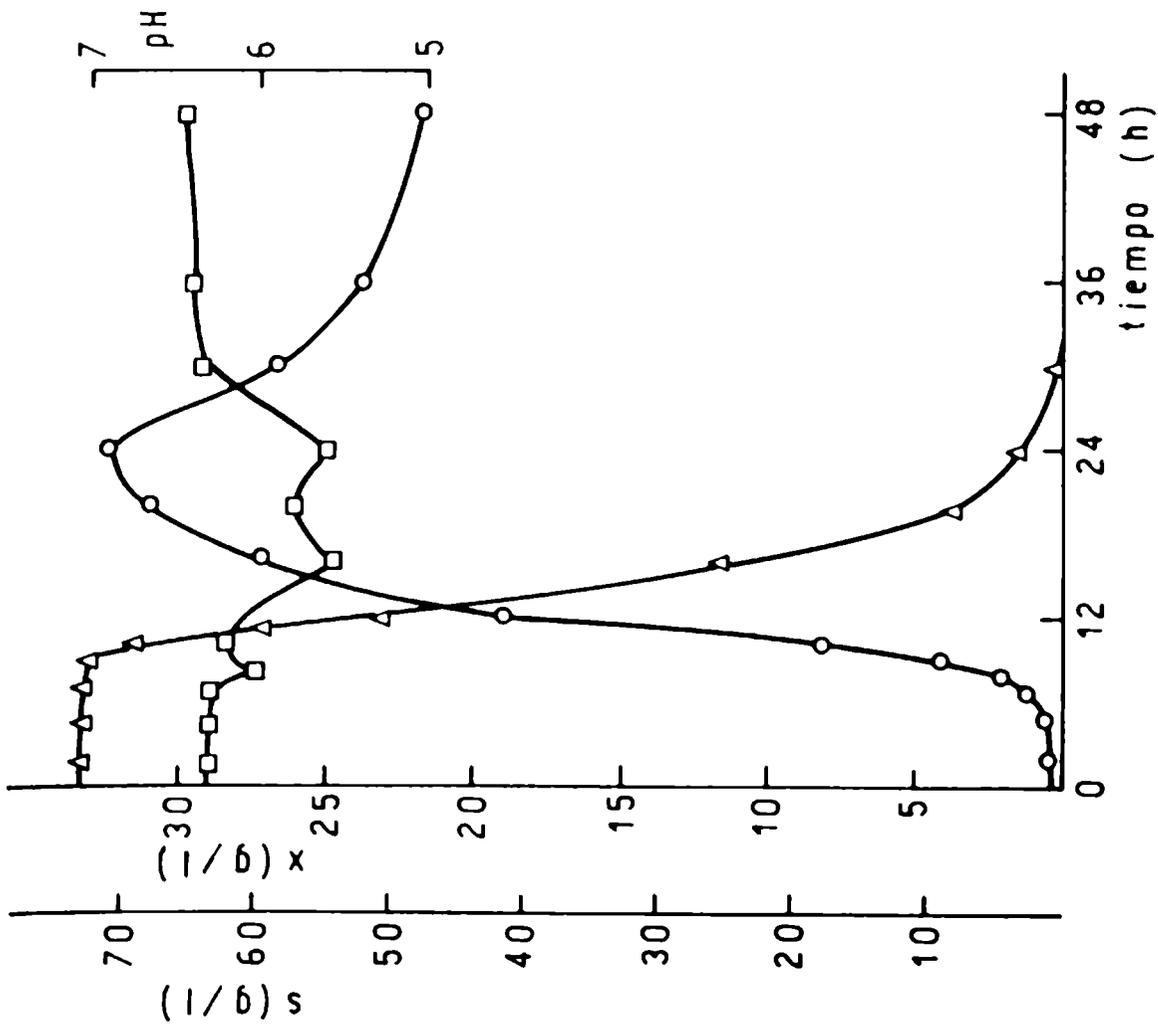


Figura N°21. Curvas de crecimiento (O), consumo - de glucosa (Δ) y evolución de pH (□) obtenidas con el Medio N°109.

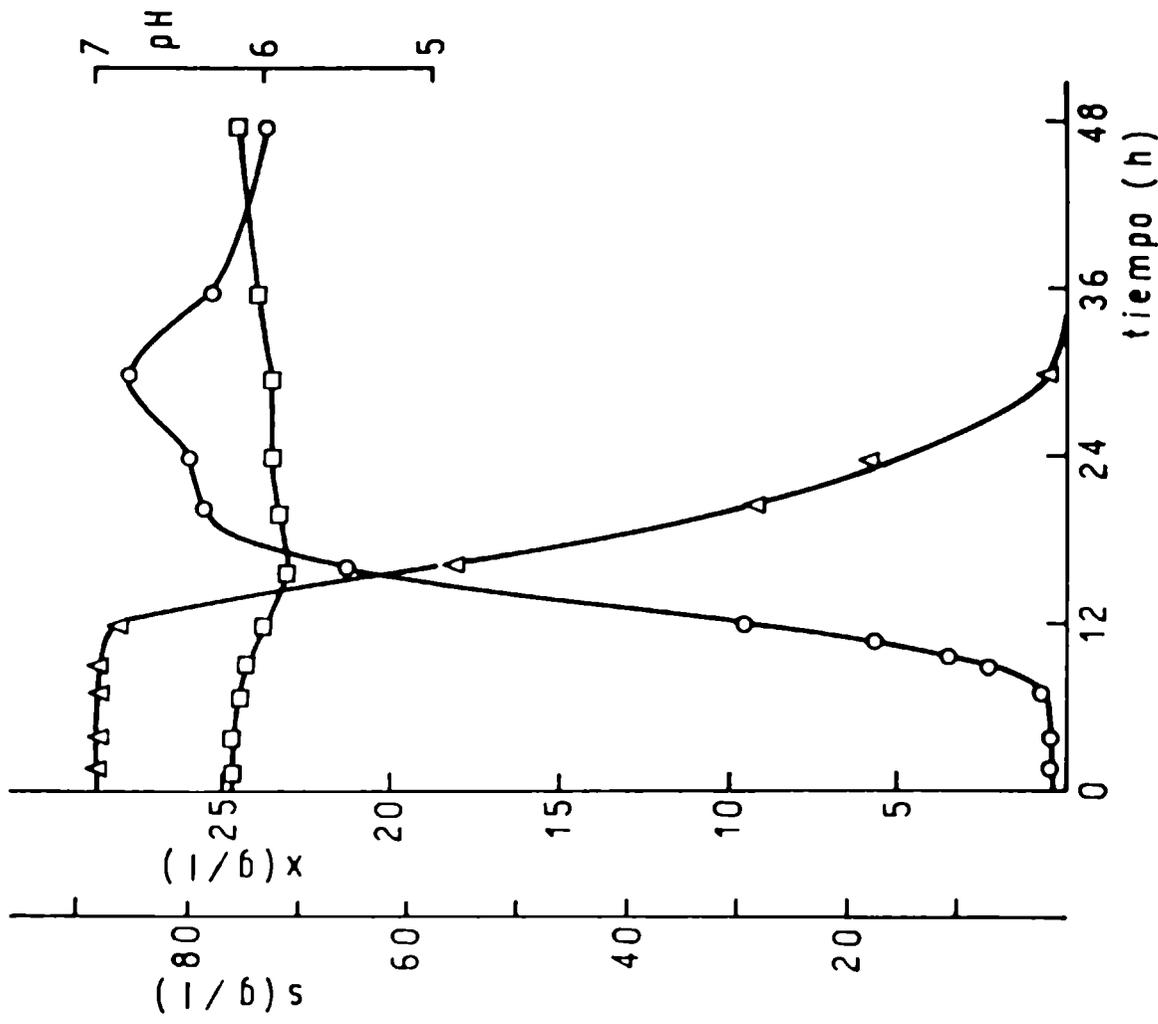


Figura N°22. Curvas de crecimiento (O), consumo - de glucosa (Δ) y evolución de pH (□) obtenidas con el Medio N°111.

Tabla N°14

Parámetros de crecimiento de Bacillus thuringiensis

Medio N°	L	x_m	u	$Y_{x_m/S}$	Y_{x_m/O_2}
80	1,7	4,02	0,77	0,62	1,50
103	1,7	12,53	0,74	0,58	1,17
105	3,5	20,07	0,72	0,52	1,01
107	3,9	26,60	0,71	0,48	0,80
109	5,7	32,46	0,64	0,45	0,74
111	7,2	27,96	0,47	0,32	0,56

dencia a disminuir con el aumento de la osmolaridad de los medios empleados está en total concordancia con las observaciones realizadas por Watson⁽¹³⁵⁾.

La velocidad específica de crecimiento del microorganismo fue ligeramente afectada por la concentración de nutrientes hasta el medio 7 veces concentrado (medio N°107).- El tiempo de generación medio calculado a partir de los datos obtenidos con los medios N°80, 103, 105 y 107 fue de 57 minutos, el cual coincide con los valores mencionados por otros autores empleando medios más diluidos^(84,122).

Con los medios N°109 y 111 se observó una disminución en los valores de velocidad específica de crecimiento con el aumento de la osmolaridad, lo cual concuerda con las observaciones efectuadas por Pirt⁽¹³⁶⁾ en experiencias realizadas con Salmonella newport, Staphylococcus aureus y Aspergillus amstelodani y las realizadas con Saccharomyces cerevisiae⁽¹³⁵⁾.

En la Tabla N°14 se puede observar que la duración del período lag aumentó con el incremento de concentración de nutrientes desde el medio N°103 hasta el medio N°111. Este fenómeno podría ser atribuido a cambios ocurridos en el entorno físico principalmente relacionados con la tonicidad de los medios y elevadas concentraciones de nutrientes.

En la Tabla N°15 se muestran los valores de UFC y productividad en base a sustrato consumido y máxima concentración de biomasa alcanzada.

Puede observarse un incremento prácticamente lineal en los valores de UFC hasta el medio N°107. La utilización de medios más concentrados afectó negativamente este valor, lo cual concuerda con las observaciones realizadas por Holmber y colaboradores⁽¹³⁷⁾ quienes observaron el mismo efecto en la producción de exotoxinas con cepas de Bacillus thuringiensis. Este efecto podría ser el resultado de las elevadas concentraciones de nutrientes orgánicos utilizadas, lo cual es sabido, reduce el porcentaje de esporulación en células con capacidad para esporular⁽¹³⁸⁾. Otra posibilidad -

podría estar relacionada con la alta osmolaridad de los me-dios N°109 y 111 o al aumento de concentración de algún in-hibidor de la esporulación.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el empleo de concentraciones de nutrientes hasta 7 veces supe-rior a las del medio N°80, no afectan las rutas metabólicas correspondientes a la formación del esporo y síntesis de la delta-endotoxina. Es importante puntualizar que en estos en-says no se observaron diferencias en el tamaño de los cris-tales obtenidos empleando altas concentraciones de glucosa, en contraste con los resultados obtenidos por Scherrer y co-laboradores⁽⁹⁵⁾ quienes observaron una disminución en el ta-maño del cristal utilizando concentraciones de glucosa supe-riores a 8 g/l. A pesar de ello, los resultados presentados no pueden ser estrictamente comparados porque en el presen-te trabajo se incrementó la concentración de la totalidad de los componentes del medio, mientras que Scherrer y co-laboradores⁽⁹⁵⁾ incrementaron únicamente la concentración de glucosa.

Los valores de UFC/s obtenidos, comprendidos entre $1,314$ y $1,350 \times 10^{11}$, son similares a los obtenidos por -- Goldberg y colaboradores⁽¹²²⁾ y superiores a los reportados por Dubois⁽¹³⁹⁾ ($1,002 \times 10^{11}$).

Los resultados presentados en la Tabla N°16 indican que la misma actividad bioinsectida fue obtenida con los di-ferentes medios ensayados cuando las larvas fueron alimen-tadas con una dieta artificial conteniendo el mismo número de UFC/g de alimento, lo que indica una directa asociación en-tre la formación del esporo y síntesis de la delta-endotoxina.

A partir de los valores de UFC y la constancia de -- las relaciones UFC/s y UFC/x_m obtenida con los medios N°80, 103, 105 y 107 está claro que no es conveniente emplear me-dios con concentraciones de nutrientes superiores a las del medio N°107. En otras palabras, este medio es el más adecu-do para ser utilizado con fines de producción. El valor de-

UFC obtenido con este medio ($7,36 \times 10^{12}$) es el más alto --
mencionado hasta la fecha para la cepa utilizada.

Si bien el costo del medio N°107 puede ser considerado
elevado, es importante remarcar que incrementando 7 veces--
la concentración de nutrientes del medio N°80, se obtuvo--
un incremento proporcional en UFC sin que se vea afectada--
la actividad bioinsecticida de los preparados.

Considerando el rendimiento de UFC en base al O_2 consumido,
se hace evidente que el medio N°107 requiere un elevado
suministro de O_2 , lo que podría ser considerado una --
desventaja para su utilización. Esto da lugar a la posibilidad--
de utilizar técnicas de cultivo alternativas con la --
idea de lograr un mejor control del consumo de O_2 . Por tal-
motivo se realizaron ensayos en cultivo discontinuo alimentado.

Tabla N°15

UFC y productividad en UFC de Bacillus thuringiensis

Medio N°	UFC x 10 ¹²	UFC/s x 10 ¹¹	UFC/x _m x 10 ¹²
80	1,08	1,350	2,687
103	3,22	1,342	2,570
105	5,31	1,328	2,646
107	7,36	1,314	2,766
109	6,92	0,961	2,132
111	4,92	0,559	1,760

Tabla N°16

Bioensayo realizado con preparados de Bacillus thuringiensis obtenidos en diferentes medios.

Medio N°	% de Mortalidad					
	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	
Testigo	0	0	10	10	10	
80	20	50	70	100	100	
103	25	55	65	90	100	
105	25	45	65	90	100	
107	20	50	75	100	100	
109	25	40	65	90	100	
111	20	40	60	90	100	

Testigo= sin agregado de suspensión esporo cristal

Las preparaciones esporo-cristal de los medios 80 a 111 fueron diluidas con agua destilada para obtener las mismas UFC por g de alimento.

2.8. Desarrollo de Bacillus thuringiensis en cultivo discontinuo alimentado (CDA).

Este sistema resulta particularmente apropiado para cultivar microorganismos que no toleran altas concentraciones de nutrientes, sea por efecto inhibitorio de alguno de los mismos⁽¹⁴⁰⁾ o por la elevada presión osmótica, ya que es posible alimentar el cultivo de manera tal que la oferta de nutrientes, con respecto a la demanda, no supere el nivel crítico por encima del cual hay inhibición. De modo análogo es posible controlar, mediante una alimentación adecuada, la demanda de O₂ de un cultivo tal que ésta no sobrepase la máxima capacidad de transferencia de O₂ que posee el fermentador⁽¹⁴¹⁾.

Para la realización de los estudios se utilizó la unidad de fermentación equipada como se muestra en la figura N°2, en la que además se describen las condiciones de cultivo.

En la figura N°23 se comparan las curvas de crecimiento correspondientes a un CDA y a un cultivo discontinuo conteniendo en medio N°111 (ver composición en la Tabla N°13), equivalente al empleado en el CDA. La característica distintiva en la composición del medio utilizado en ambos casos, es la forma en que los nutrientes fueron incorporados al sistema de cultivo.

En la figura N°23 puede observarse que debido a que el CDA se inició a partir de un cultivo discontinuo de iguales características que el mostrado en la figura N°17, no presentó diferencias en la duración del período lag comparado con éste.

A las 6 horas de cultivo, cuando los microorganismos se hallaban en fase de crecimiento exponencial, se inició la alimentación.

Debido a las características de diseño de la alimentación, puede verse que en ningún momento la concentración de glucosa alcanzó valores que puedan ser considerados inhi

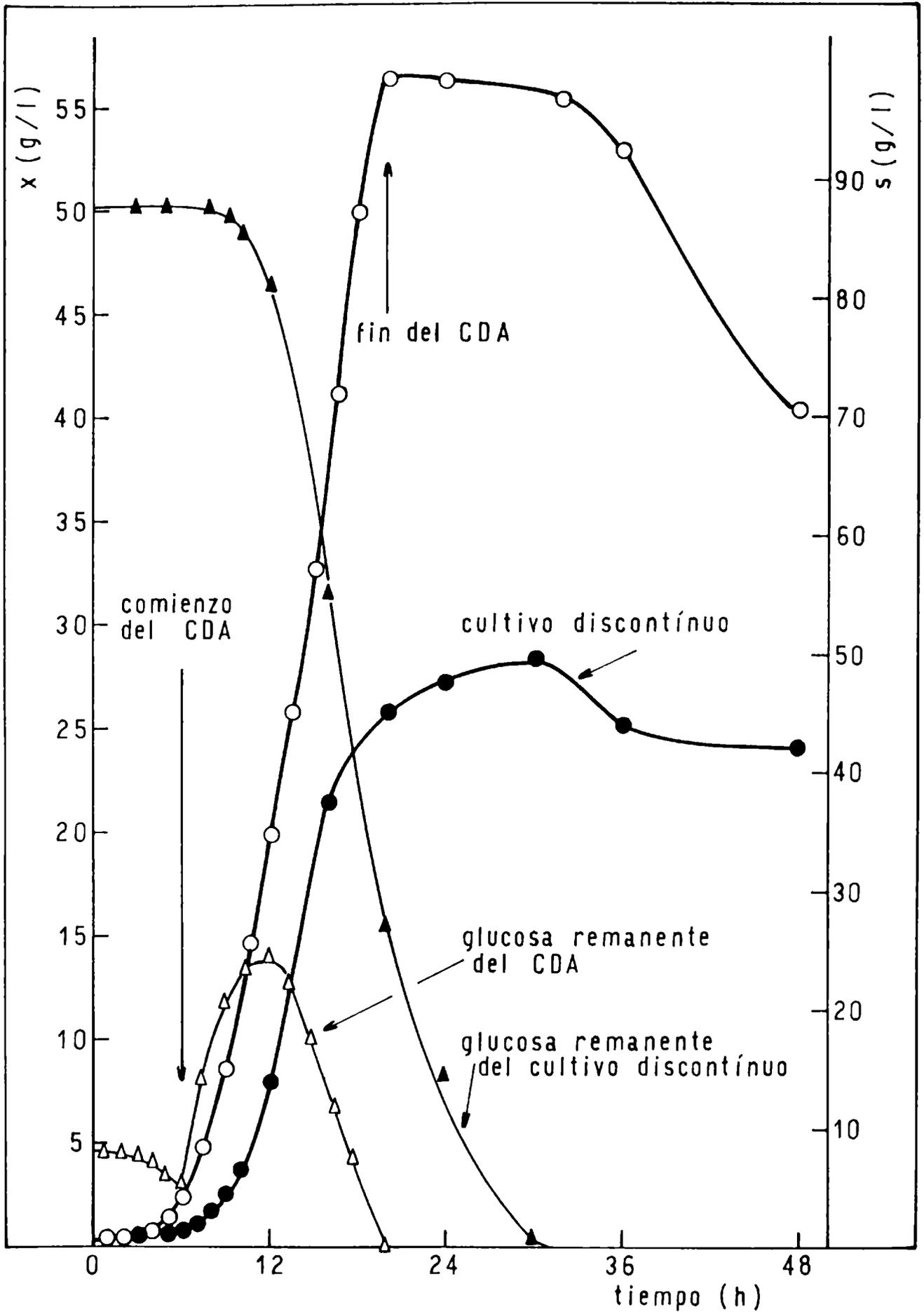


Figura N°23. Curvas de consumo de glucosa y crecimiento de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* en sistema de cultivo discontinuo y cultivo discontinuo alimentado (CDA).

bidores del crecimiento de la bacteria. En el caso más desfavorable, a las 6 horas de iniciado el CDA, se detectó una concentración de glucosa remanente de 24,2 g/l, similar al valor inicial del medio N°103 (ver composición en la Tabla N°13), que como se recuerda no afectó el normal desarrollo del bacilo.

El perfil de la curva de consumo de glucosa (en el caso del CDA) pone de manifiesto que en un primer momento, desde el inicio del CDA hasta la hora 6 de alimentación, el suministro de nutrientes fue superior a la demanda. Este comportamiento se aparta del esperado de acuerdo al modelo matemático empleado para el diseño del CDA, lo cual es comprensible debido a que la alimentación se inició en un instante en que la concentración de biomasa era inferior al valor empleado en los cálculos de diseño. Luego de las 6 horas de alimentación, los altos requerimientos de nutrientes originados por las concentraciones celulares alcanzadas, hicieron descender los niveles de glucosa de forma tal que en el preciso instante en que se dio por finalizada la alimentación no se detectara glucosa remanente en el fermentador. El fin del CDA coincidió también con el máximo valor de biomasa alcanzada.

En la Tabla N°17 se presentan los resultados obtenidos con el CDA y el cultivo discontinuo con el que fue comparado.

Puede observarse en la misma una notable diferencia a favor del CDA en todos los resultados obtenidos. En la discusión del punto 2.7. se hizo mención a la posibilidad de utilizar técnicas de cultivo distintas de sistema discontinuo con la idea de lograr un mejor control en el consumo de O_2 . Si los valores de x_m de la Tabla N°17 son divididos por los correspondientes valores de Y_{x_m/O_2} , se obtiene el total de O_2 consumido (hasta alcanzar el máximo valor de biomasa), que fue de 46,68 y 43,74 g de O_2 para el sistema discontinuo y el CDA respectivamente.

Si se tiene en cuenta que el sistema discontinuo pro

Tabla N°17

Sistema de cultivo	x_m	$UFC \times 10^{12}$	$UFC/s \times 10^{11}$	$UFC/x_m \times 10^{11}$	Y_{x_m}/s	$Y_{x_m} O_2$
discontinuo	27,82	4,89	0,555	1,758	0,32	0,56
CDA	56,43	12,00	1,363	2,126	0,64	1,29

dujo un consumo de O_2 6,7% superior al CDA y que con este último se logró incrementar un 203% el máximo de biomasa y un 245% el valor de UFC, resulta claro que el empleo de este sistema de cultivo es sumamente adecuado para lograr un mejor y más eficiente control del consumo de O_2 .

Como se hiciera mención, la diferencia entre la composición de los medios utilizados en el cultivo discontinuo y CDA, se debió únicamente a la forma en que se incorporaron los componentes del medio de cultivo. La dosificación de nutrientes por medio de un diseño racional de la alimentación, hizo que no se observara en el CDA, efecto inhibitor de ninguna naturaleza. Así las observaciones microscópicas efectuadas sobre muestras de distintas horas de proceso revelaron una relación esporo/cristal igual a uno.

En la figura N°24 (representación gráfica de los valores de UFC de la Tabla N°15 en función del factor de concentración del medio N°80) puede verse que extrapolando los valores de UFC hasta el factor de concentración 11 (correspondiente al medio N°111 de la Tabla N°13), se debería haber alcanzado en el cultivo discontinuo, de no mediar efectos inhibitorios, un recuento de $11,6 \times 10^{12}$ UFC, valor que difiere tan sólo un 3,5% del obtenido con el CDA. En otras palabras, el CDA hizo las veces de un cultivo discontinuo con el medio N°111, en el que la dosificación de nutrientes controlada por la alimentación, hizo que se alcanzaran los valores finales esperados de acuerdo al modelo.

Se debe remarcar que si bien en la figura N°23 la representación gráfica de la curva de crecimiento correspondiente al CDA fue interrumpida a las 48 horas de proceso, el cultivo se debió prolongar durante 12 horas más con el objeto de lograr la maduración de los esporos y la lisis celular.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que el CDA es una importante herramienta tecnológica para lograr altas concentraciones de preparados esporo-cristal de Bacillus thuringiensis.

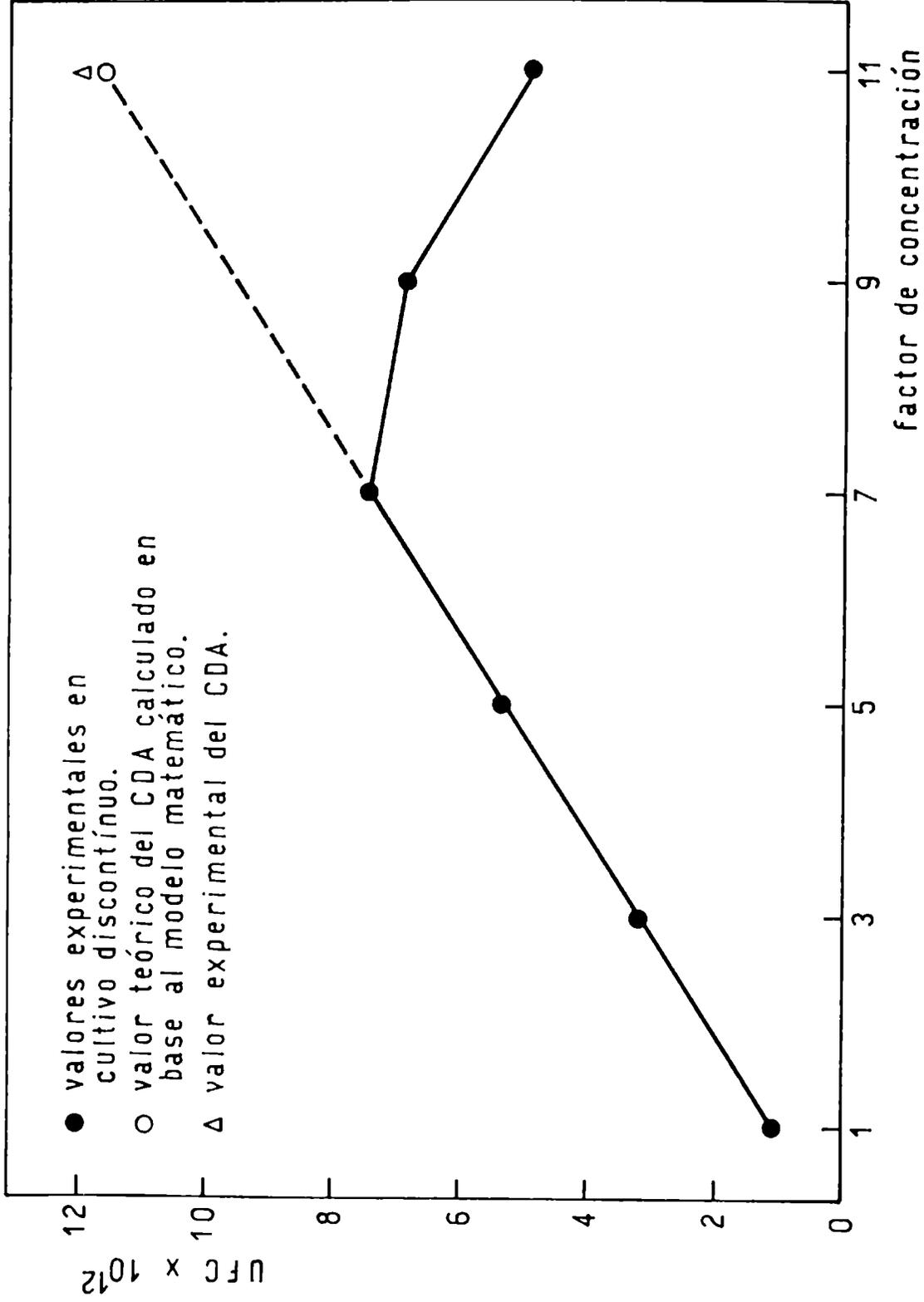


Figura N°24. Productividades en UFC de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*-
 en cultivo discontinuo y cultivo discontinuo alimentado (CDA).

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto que:

a) Bacillus thuringiensis es un microorganismo que requiere un adecuado suministro de O_2 a fin de lograr en los cultivos una alta frecuencia de esporulación y formación de cristales.

b) El contenido de los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} y Mn^{+2} del extracto de levadura es insuficiente para asegurar una buena producción en UFC y delta-endotoxina, motivo por el cual se hace necesario suplementar los medios de producción con dichos iones. El ión K^+ juega un papel importante en el desarrollo y esporulación del microorganismo, no pudiendo ser reemplazado por el ión Na^+ .

c) Los estudios realizados con fuentes nitrogenadas de diferente naturaleza indican que la cepa utilizada en los estudios no puede alcanzar buenos desarrollos en medios sintéticos, requiriendo la incorporación de fuentes nitrogenadas de naturaleza compleja con el fin de lograr altas productividades.

d) El extracto de levadura, como fuente de Nitrógeno y factores de crecimiento, puede ser reemplazado con éxito por extracto de raíz de malta sin afectar la toxicidad de los preparados, haciendo que este último presente un marcado interés en vías de su utilización en la formulación de medios con fines de producción.

e) La glucosa, como fuente hidrocarbonada, es la más apropiada para el desarrollo del microorganismo. Se alcanzan también buenos rendimientos empleando almidón, hecho este de suma importancia a los fines de su empleo en gran escala con la idea de trabajar con medios de cultivo de menor costo.

Los valores de UFC alcanzados utilizando glucosa en concentración de 20 g/l sugieren la posibilidad de emplear concentraciones aún más elevadas con el fin de aumentar los rendimientos, lo que podría ser posible mediante un adecuado control de pH durante el cultivo a fin de evitar que los

pronunciados descensos de pH observados inhiban el desarrollo y la esporulación del bacilo.

f) Bacillus thuringiensis es un microorganismo que presenta la habilidad de desarrollar en medios con elevada concentración de nutrientes. Esta bacteria muestra un aumento prácticamente lineal en los valores de UFC y x_m cuando la concentración de los componentes del medio tomado como base para los estudios (medio N°80) es aumentada hasta 7 veces. Este comportamiento es de gran importancia ya que permite el empleo, a nivel industrial, de medios altamente concentrados que permitan alcanzar elevadas productividades sin que se vea afectada la toxicidad de los preparados.

La utilización de medios aún más concentrados afecta el normal desarrollo del microorganismo y la esporulación, lo que podría ser atribuido al empleo de elevadas concentraciones de nutrientes orgánicos (lo cual es sabido reduce el porcentaje de esporulación), a la alta osmolaridad de los medios o al aumento de concentración de algún inhibidor.

Si bien el medio de referencia 7 veces concentrado (medio N°107) produjo elevados recuentos, el rendimiento en UFC en base a O_2 consumido pone en evidencia que este medio requiere un elevado suministro de O_2 lo cual podría ser considerado una desventaja para su utilización a nivel industrial.

g) El empleo del cultivo discontinuo alimentado resulta sumamente adecuado para alcanzar elevadas productividades. La dosificación del suministro de nutrientes controlado por la alimentación permite que no se alcancen valores de concentración de nutrientes que afecten el normal desarrollo del microorganismo además de lograr un adecuado control del consumo de O_2 .

Los valores de recuento alcanzados, productividades y rendimientos en base a sustrato y O_2 consumido presentados en la Tabla N°17 ponen en evidencia la importancia de este sistema de cultivo como herramienta tecnológica para lograr preparados espora-cristal de Bacillus thuringiensis de elevada concentración.

B I B L I O G R A F I A

1. Zerba, E.N., y Wood, E.J. (1983). Insecticidas y control de plagas. Curso Teórico-práctico. Asociación Química Argentina.
2. Garret, S.G. (1965). In "Ecology of soil-borne plant pathogens" (K.F. Baker and W.C. Snyder, eds.) p. 4-47. Univ. of California Press Berkeley.
3. Norris, J.R. (1971). In "Microbes and biological productivity" (D.H. Huges and A.H. Rose, eds.) p. 197-229. Cambridge Univ. Press, London and New York.
4. Burges, H.D., and Hussey, N.W. (1971). In "Microbial control of insects and mites" (H.D. Burges and N.W. Hussey, eds.) p. 1-11. Academic Press, London and New York.
5. Ignoffo, C.M., and Anderson, R.F. (1979). Bioinsecticides. In "Microbial Technology" 2nd ed. Vol. 1 (H.J. Peppler and D. Perlman, eds.) p. 1-28. Academic Press, London and New York.
6. Microbial insect control agents. (1979). In "Microbial processes" Promising technologies for developing countries. National Academy of Sciences. Washington D.C. Chap. 5 - p. 80-106.
7. Miller, L.K., and Bulla, L.A., Jr. (1983). Bacterial, viral and fungal insecticides. Science. 219: 715-721.
8. Angus, T.A. (1968). The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. World Rev. Pest Control. 7: 11-26.
9. Couch, T.L., and Ross, D.A. (1980). Production and utilization of Bacillus thuringiensis. Biotechnol. Bioeng. 12: 1297-1304.
10. Klowden, M.J., Held, G.A., and Bulla, L.A., Jr. (1983). Toxicity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis to adult Aedes aegypti mosquitoes. Appl. Environm. Microbiol. 46: 312-315.
11. Burges, H.D., and Hall, R.A. (1982). Bacteria and fungi as insecticides: Outlook on Agriculture. 11: 79-86.
12. Bulla, L.A., Jr, and Yousten, A.A. (1979). Bacterial insecticides. Economic Microbiology. Vol. 4. Microbial Biomass. Chap. 4 - p. 91-114.
13. Bassi, A. (1967). in Norris, J.R. The use of microorganism for the control of insect and pests. Chem. and Industry. 18: 1941-1945.
14. Ignoffo, C.M. (1967). In "Insect pathology and microbial control" (P.A. van der Laan, ed.) p. 91-117. North-Holland Publ., Amsterdam.
15. Watt, B.A., and LeBrun, R.A. (1984). Soil effects of Beauveria bassiana on pupal population of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Environm. Entomol. 13: 15-18.
16. Drozda, V.F., and Lappa, N.V. (1974). In "Pathologie des Arthropodes en Moyens Biologiques de Lutte" p. 64-67.

17. Roberts, D.W., and Yendol, W.G. (1971). Use of fungi for microbial control of insects. In "Microbial control of insects and mites" (H.D. Burges and N.W. Hussey, eds.) p. 125-149. Academic Press, London and New York.
18. Ferron, P. (1981). In "Microbial control of pests and plant diseases" (1970-1980, H.D. Burges, ed.) p. 465-482. Academic Press, New York.
19. McCoy, C.W. (1978). In "Microbial control of insect pests: Future strategies in pest management systems" (G.E. Allen, C.M. Ignoffo, R.P. Jaques, eds.)-NSF-USDA. University of Florida, Gainesville.
20. Hall, R.A. (1981). In "Microbial control of pests and plant diseases" (1970-1980, H.D. Burges, ed.) Academic Press, New York.
21. Shieh, T.R., and Bohmfalk, G.T. (1980). Production and efficacy of Baculoviruses. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 1357-1375.
22. Granados, R.R. (1980). Infectivity and mode of action of Baculovirus. *Biotechnol. Bioeng.* 12: 1377-1405.
23. W.H.O., Report of Joint FAO/WHO "Meeting of insect viruses", Geneva 1972. (World Health Organization, Geneva, 1973). Technical Report Series N°531.
24. Shapiro, M., Poh Agin, P., and Bell, R.A. (1983). Ultraviolet protecta of the gypsy moth. (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus *Environm. Entomol.* 12: 982-985.
25. Couch, T.L., and Ignoffo, C.M. (1981). In "Microbial control of pests and plant diseases". (1970-1980, H.D. Burges, ed.) Academic Press, New York.
26. Hughes, P.R., Wood, H.A., Burand, J.P., and Granados, R.R. (1984). Quantification of the dose-mortality response of Trichoplusia ni, Heliothis zea and Spodoptera frugiperda to nuclear polyhedrosis virus. Applicability of an exponential model. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 343-350.
27. Oegarrd, L. (1983). The possible use of insect viruses in the biologic control of insect pests. *Tidsskr. Planteavl.* 87: 407-415.
28. Bolet, B. (1983). Production of insect viruses for biological control. Development of a method for production of Agrotis segetum granulosis virus. *Tidsskr. Planteavl.* 87: 417-424.
29. Glen, D.M. and Payne, C.C. (1984). Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of Cydia pomonella in the United Kindom. *Ann. Appl. Biol.* 104: 87-98.
30. Podgwaite, J.D., Bruen, R.B., and Shapiro, M. (1983). Microorganisms associatec with production lots of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, Lymantria dispar (Lepidoptera: Lymantriidae). *Entomophaga.* 28: 9-16.

31. Anderson, R.F., Shieh, T.R., Huang, H.T., and Rogoff, M.H. "Production of a viral pesticide" in The Proceedings of the International Fermentation Symposium: Fermentation Technology Today (IIT, Tokyo, 1972) p. 623-628.
32. Lewis, F.B. (1971). Mass propagation of insecti viruses with specific reference to forest insect. In The Proceeding of the 2nd International Colloquium on Invertebrate Pathology. p. 320-326.
33. Elnagar, S., Tawfik, M.F.S., and Abdelrahman, T. (1983). The susceptibility to nuclear polyhedrosis virus among laboratory population of Spodoptera littoralis (Boisd.) Z. Angew. Entomol. 96: 459-463.
34. Pascheke, J.D., and Summers, M.D. (1975). Early events in the infection of the arthropod gut by pathogenic insecta viruses. In "Invertebrate Immunity" (K. Maramorosch and R.E. Shape, eds.) p. 75-112. Academic Press, New York.
35. Tinsley, T.W., and Harrap, K.A. (1978). Viruses of invertebrates. In "Comprehensive Virology" (H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, eds.) 12: 1-101. Plenum, New York.
36. St. Julian, G., and Bulla, L.A., Jr. (1973). In "Current topics in comparative pathobiology". (T.C. Cheng, ed.) p. 57 Academic Press, London and New York.
37. Bulla, L.A., Jr., Costillow, R.N., and Sharpe, E.S. (1978). Biology of Bacillus popilliae. In "Advences in Applied Microbiology". 23: 1-18.
38. Obeta, J.A., and Okafor, N. (1983). Production of Bacillus sphaericus strain 1593 primary powder on media made from locally obtainable Nigerian agricultural products. Can. J. Microbiol. 29: 704-709.
39. Singer, S. (1977). Isolation and development of bacterial pathogens of vectors. In "Microbial regulation of vectors, the saprophytic and aerobic bacteria and fungi". (J.D. Briggs, ed.) U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. N° (NIH) 77-1180, p. 3-18.
40. Davidson, E.W. (1984). Microbiology, pathology and genetics of Bacillus sphaericus: Biological aspects which are important to field use. Mosq. News. 44: 147-152.
41. Singer, S. (1980). Bacillus sphaericus for the control of mosquitoes. Biotechnol. Bioeng. 22: 1335-1355.
42. Myers, P., Yousten, A.A., and Davidson, E.W. (1979). Comparative studies of the mosquito-larval toxin of Bacillus sphaericus SS II-1 and 1593. Can. J. Microbiol. 25: 1227-1231.
43. Singer, S. (1979). Use of entomogenous bacteria against insects of public health importance. Dev. Ind. Microbiol. 20: 117-120.

44. Lacey, L.A. (1984). Production and formulation of Bacillus sphaericus. Mosq. News. 44: 153-159.
45. Rogoff, M.H. (1966). Crystal-forming bacteria as insect pathogens. In "Advances in Applied Microbiology". 8: 291-314.
46. Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
47. Smith, N.R., Gordon, R.E., and Clark, R.E. (1946). Aerobic spore-forming bacteria. U.S. Dep. Agric. Misc. Publ., N°559.
48. Heimpel, A.M., and Angus, T.A. (1958). The taxonomy of insect pathogens related to Bacillus cereus. Can. J. Microbiol. 4: 531-541.
49. Heimpel, A.M., and Angus, T.A. (1960). On the taxonomy of certain entomogenous crystalliferous bacteria. J. Insect. Pathol. 2: 311-319.
50. de Barjac, H., and Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de Bacillus de type Bacillus thuringiensis. Entomophaga. 7: 5-31.
51. de Barjac, H., and Bonnefoi, A. (1968). A classification of strains of Bacillus thuringiensis Berliner with a key of their differentiation. J. Invertebr. Pathol. 11: 335-347.
52. de Barjac, H., and Bonnefoi, A. (1973). Mise au point sur la classification des Bacillus thuringiensis. Entomophaga. 18: 5-17.
53. Norris, J.R. (1964). The classification of Bacillus thuringiensis. J. Appl. Bacteriol. 27: 439-447.
54. Sekijima, Y., and Ono, K. (1982). Grouping of Bacillus thuringiensis by heat-stable somatic antigens. Appl. Entomol. Zool. 17: 393-397.
55. De Lucca II, A.J. (1984). Lectin grouping of Bacillus thuringiensis serovars. Can. J. Microbiol. 30: 1100-1104.
56. Heimpel, A.M. (1967). A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol. 12: 287-322.
57. Nickerson, K.W., and Bulla, L.A., Jr. (1975). Lipid metabolism during bacterial growth, sporulation and germination: an obligate nutritional requirement in Bacillus thuringiensis for compounds that stimulate fatty acid synthesis. J. Bacteriol. 123: 598-603.
58. Rogoff, M.H., and Yousten, A.A. (1969). Bacillus thuringiensis: microbial considerations. Ann. Rev. Microbiol. 23: 357-386.
59. Lecadet, M.M., and Dedonder, R. (1964). Les protéases du chyle de Pieris brassicae. Purification. C.R. Acad. Sci. Sér. D 261: 3117-3120.

60. Lecadet, M.M., and Dedonder, R. (1966). Les protéases de Pieris brassicae. I. Purification et propriétés. Bull. Soc. Chim. Biol. 48: 631-660.
61. Lecadet, M.M., and Dedonder, R. (1966). Les protéases de Pieris brassicae. II. Spécificité. Bull. Soc. Chim. Biol. 48: 661-691.
62. Faust, R.M., Adams, J.R., and Heimpel, A.M. (1967). Dissolution of the toxic parasporal crystals from Bacillus thuringiensis var. pacificus by the gut secretions of the silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. 9: 488-499.
63. Tojo, A., and Aizawa, K. (1983). Dissolution and degradation of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm Bombyx mori. Appl. Environ. Microbiol. 45: 576-580.
64. Fast, P.G., and Donaghue, T.P. (1971). The delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis. II. On the mode of action. J. Invertebr. Pathol. 18: 135-138.
65. Fast, P.G., and Morrison, I.K. (1972). The delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis. IV. The effect of delta-endotoxin on ion regulation by midgut tissue of Bombyx mori larvae. J. Invertebr. Pathol. 20: 208-211.
66. Nishiitsutsuji-Uwo, J., and Endo, Y. (1979). Mode of action on Bacillus thuringiensis delta-endotoxin: Effect on TN-368 cells. J. Invertebr. Pathol. 34: 267-275.
67. Aronson, A.I., and Fitz-James, P. (1976). Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. Bacteriol. Rev. 40: 360-402.
68. Somerville, H.J. (1971). Formation of the parasporal inclusion of Bacillus thuringiensis. Eur. J. Biochem. 18: 226-237.
69. Lecadet, M.M., and Dedonder, R. (1971). Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Eur. J. Biochem. 23: 282-294.
70. Monro, R.E. (1961). Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of Bacillus thuringiensis. Biochem. J. 81: 225-232.
71. Luthy, P., Hayashi, Y., and Angus, T.A. (1970). Presence of endotoxin in vegetative cells of Bacillus thuringiensis var. sotto. Can. J. Microbiol. 16: 905-906.
72. Bechtel, D.B., and Bulla, L.A., Jr. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. 127: 1472-1481.
73. Wakisaka, Y., Masaki, E., and Nishimoto, Y. (1982). Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-beta-hydroxy butyric acid granules by asporogenous mutants of Bacillus thuringiensis. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1473-1480.

74. Nishimura, M.S., and Nishiitsutsuji-Uwo (1980). Sporeless mutants of Bacillus thuringiensis. III. The process of crystal formation. Tissue & Cell. 12: 233-242.
75. Yamamoto, T. (1983). Identification of entomocidal toxins of Bacillus thuringiensis by high performance liquid chromatography. J. Gen. Microbiol. 129: 2595-2603.
76. Kronstad, J.W., Schnepf, H.E., and Whiteley, H.R. (1983). Diversity of locations for Bacillus thuringiensis crystal protein genes. J. Bacteriol. 154: 419-428.
77. Wong, H.C., Schnepf, H.E., and Whiteley, H.R. (1983). Transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. Biol. Chem. 258: 1960-1967.
78. Held, G.A., Bulla, L.A., Jr., Ferrari, E., Hoch, J., Aronson, A.I., and Minnich, S.A. (1982). Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6065-6069.
79. Minnich, S.A., and Aronson, A.I. (1984). Regulation of protoxin synthesis in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. 158: 447-454.
80. Klier, A., Parsot, C., and Rapaport, G. (1983). In vitro transcription of the cloned chromosomal crystal gene from Bacillus thuringiensis. Nucleic Acids Research. 11: 3973-3987.
81. Sahly, D.P., Dingman, D.W., Bulla, L.A., Jr., and Aronson, A.I. (1978). Possible origin and function of the parasporal crystals in Bacillus thuringiensis. Bioch. Biophys. Res. Commun. 84: 581-588.
82. Bulla, L.A., Jr., Davidson, L.I., Kramer, K.J., and Jones, B.L. (1979). Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Bioch. Biophys. Res. Commun. 91: 1123-1130.
83. Nickerson, K.W., and Bulla, L.A., Jr. (1974). Physiology of spore-forming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol. 28: 124-128.
84. Tyrrel, D.J., Bulla, L.A., Jr., Andrews, R.E., Jr., Kramer, K.J., Davidson, L.I., and Nordin, P. (1981). Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystal of selected Bacillus thuringiensis strains. J. Bacteriol. 145: 1052-1062.
85. Bulla, L.A., Jr., Kramer, K.J., and Davidson, L.I. (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. 130: 375-383.
86. Huber, H.E., Luthy, P., Ebersold, H-R., and Cordier, J-L. (1981). The subunits of the parasporal crystal of Bacillus thuringiensis: Size, linkage and toxicity. Arche. Microbiol. p. 14-18.

87. Goldberg, L.J., and Margalit, J. (1977). A bacterial demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculatata, Culex inivitatus, Aedes aegypti, and Culex pipiens. Mosq. News. 37: 355-358.
88. Ignoffo, C.M., Couch, T.L., García, C., and Kroha, M.J. (1981). Relative activity of Bacillus thuringiensis var. kurstaki and Bacillus thuringiensis var. israelensis against larvae of Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus, Trichoplusia ni, Heliothis zea, and Heliothis virescens. J. Econ. Entomol. 74: 218-222.
89. Lacey, L.A., and Singer, S. (1982). Larvicidal activity of new isolates of Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis (H-14) against Anpheline and Culicine mosquitoes. Mosqu. News. 42: 537-543.
90. Lahkim-Tsor, L., Pascar-Gluzman, C., Margalit, J., and Barak, Z (1983). Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, serovar H-14 in Aedes aegypti: histopathological studies. J. Invertebr. Pathol. 41: 104-116.
91. Undeen, A.H., and Nagel, W.L. (1978). The effect of Bacillus thuringiensis ONR-60 A strain (Goldberg) on Simulim larvae in the Laboratory. Mosq. News. 38: 524-527.
92. Larget, P.I., and de Barjac, H. (1981). Spedificité et principe actif of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Bull. Soc. Pathol. Exotique. 74: 216-227.
93. Holmes, K.C., and Monro, R.E. (1965). Studies on the structure of parasporal inclusions from Bacillus thuringiensis. J. Mol. Biol. 14: 572-581.
94. Labaw, L.W. (1964). The structure of Bacillus thuringiensis Berliner crystals. J. Ultrastruct. Res. 10: 66-75.
95. Scherrer, P., Luthy, P., and Trumpli, B. (1973). Production of delta-endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose concentrations. Appl. Microbiol. 25: 644-646.
96. Dulmage, H.T. (1971). Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of Bacillus thuringiensis, serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 18: 353-358.
97. Dulmage, H.T. (1970). Production of spore-delta-endotoxin complex by variants of Bacillus thuringiensis in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 16: 385-389.
98. Pendleton, I.R. (1969). Insecticides of crystal-forming bacteria. Process. Biochem. 4: 29-32.
99. Zamola, B., Valles, P., Sarić, A., Kubović, M., Sidor, C., and Miccoli, P. (1983). Bacillus thuringiensis-an insecticial microorganism with perspective. Process. Biochem. 18: 5-9.

100. Bonnefoi, A. (1960). Biological insecticide. French patent N°1225179. Institut Pasteur.
101. Fanara, D.M., and Knepper, R.G. (1984). Field test of two granular Bacillus thuringiensis (H-14) formulation against snowpool Aedes spp. Mosq. News. 44: 236-239.
102. Coords, H., Fischer, R.A., and Briggs, J.D. (1965). Bacterial insecticide suspensions. French patent N°1393646. International Minerals & Chemical Corp.
103. Hartley, G.S., (1960). The role of surface-active substances in the application of pesticides. Chem. Ind. p. 448-452.
104. Angus, T.A., and Luthy, P. (1971). Formulation of microbial insecticides In "Microbial control of insects and mites". (H.D. Burges and N.W. Hussey, eds.) p. 623-638. Academic Press, London and New York.
105. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. 11th edition. 1970. Ed. Horwitz, H. AOAC Publish. Washington.
106. Srinivasen, V.R., Fleenor, M.B., and Summer, R.J. (1977). Gradient-feed method of growing high cell density cultures of Cellulomonas in a bench scale fermentor. Biotechnol. Bioeng. 19: 153-155.
107. Mignone, C.F. (1982). Transformación del suero de queso por procesos fermentativos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. p. 125.
108. Cooper, C.M., Fernston, G.S.E., Miller, S.A. (1944). Performance of agitated gas liquid contactor. Ind. Eng. Chem. 36: 504-509.
109. Hyvarinen, A., and Nikkila, E.A. (1962). Specific determination of blood glucose with O-toluidine. Clin. Chem. Acta. 7: 140-147.
110. Cooney, C.L., Wang, H., and Daniel, I.C. (1977). Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. Biotechnol. Bioeng. 19: 55-67.
111. Dutky, S.R., Thompson, J.V., and Cantwell, G.E. (1962). A technique for mass rearing the greater wax moth (Lepidoptera: Galleriadae). Proc. Ent. WASH. 64: 56-58.
112. Gomes, F.P. (1978). Curso de estadística experimental. Ed. Hemisferio Sur S.A. p. 324.
113. Dagnelie, P. (1975). Analyse statistique a plusieurs variables. Ed. Les Press Agronomiques de Genbeaux. A.S.L.B. p. 363.
114. Sharpe, E.S., Nickerson, K.W., Bulla, L.A., Jr., and Aronson, A.I. (1975). Separation of spores and parasporal crystal of Bacillus thuringiensis in gradients of certain X-Ray contrasting agents. Appl. Microbiol. 30: 1052-1053.
115. Tamir, H., and Gilvarg, C. (1965). Density gradient centrifugation for the separation of sporulating forms of bacteria. J. Biol. Chem. 241: 1085-1090.

116. González, J.M., Brown, B.J., and Carlton, B.C. (1982). Transfer of Bacillus thuringiensis plasmids coding for delta-entodoxin among strain of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus. Geneties. 79: 6951-6955.
117. Lowry, O.H., Rosebrouch, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
118. Cooksey, K.E. (1968). Purification of a protein from Bacillus thuringiensis toxic to larvae of lepidoptera. Biochem. J. 106: 445-454.
119. Andrews, R.E., Jr., Iandolo, J.J., Campbell, B.S., Davidson, L.I., and Bulla, L.A., Jr. (1980). Rocket immunoelectroforesis of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Appl. Environm. Microbiol. 40: 897-900.
120. Laurel, C-B. (1966). Quantitative estimation of proteins by electroforesis in agarose gel containing antibodies. Anal. Biochem. 15: 45-52.
121. Laurel, C-B. (1972). Electroimmuno assay. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29: 21-37.
122. Goldgerg, I., Sneh, B., Battat, E., Klein, D. (1980). Optimization of medium for a high yield production of spore-crystal preparation of Bacillus thuringiensis effective against the Egyptian cotton leaf worm Spodoptera littoralis boisd. Biotech. Letters. 2: 419-426.
123. Yousten, A.A., and Rogoff, M.H. (1969). Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation of spore and crystal formation. J. Bacteriol. 100: 1229-1236.
124. Bulla, L.A., Jr., St. Julian, G., Rhodes, R.A., and Hesseltine, C.W. (1969). Scanning electron and phase-contrast microscopy of bacterial spores. Appl. Microbiol. 18: 490-495.
125. Grant, C.I., and Pramer, D. (1962). Minor element composition of yeast extract. J. Bacteriol 84: 869-870.
126. Vasantha, N., and Freese, E. (1979). The role of manganese in growth and sporulation of Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 112: 329-336.
127. Tempest, D.W., Dicks, J.W., and Elwood, D.C. (1968). The influence of growth condition on the concentration of potassium in Bacillus subtilis var. niger and its possible relationship to cellular rebonucleic acid, teichoic acid, and teichuronic acid. Biochem. J. 106: 237-243.
128. Lyman, C.M., Moseley, O., Wood, S., and Hale, F. (1946). Note on the use of hydrogen peroxide - Treated peptone in media for the microbiological determination of aminoacids. Arch. Biochem. 10: 427-431.
129. Singer, S., and Rogoff, M.H. (1968). Inhibition of growth of Bacillus thuringiensis by aminoacids in defined media. J. Invertebr. Pathol. 12: 98-104.

130. Pomeranz, Y., and Robbins, G.S. (1971). Malt sprouts, their composition and use. *The brewers digest.* 46: 58-64.
131. Pan, S.C., Peterson, W., and Johnson, M. (1940). Acceleration of lactic acid fermentation by heat labile substances. *Ind. Eng. Chem.* 32: 709-714.
132. Calf, R.E., and Stier, T.J. (1951). Effect of commercial malt sprouts on the anaerobe growth of distillers' yeasts. *Trans. Kentucky Acad. Sci.* 13: 69-77.
133. Hijikata, Y., Okumura, H., and Teruci, G. (1971). Acceleration of acetic acid fermentation by malt sprouts. *J. Fem. Tech. Japan.* 149: 577
134. Cuevas, C.M., y Ertola, R.J. (1973). Utilización de raíz de malta en la producción de proteínas unicelulares. I. Influencia del extracto de raíz de malta sobre la velocidad de crecimiento y rendimientos celulares en medios de cultivo con suero de queso. *ION.* 33: 361-364.
135. Watson, T.G. (1970). The effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of Saccharomyces cerevisiae. *J. Gen. Microbiol.* 64: 91-99.
136. Pirt, S.J. (1975). Effects of water activity and medium tonicity. In "Principles of microbe and cell cultivation" p. 147-155. Blackwell Scientific Publications.
137. Holmberg, A., and Sievanen, R. (1980). Fermentation of Bacillus thuringiensis for exotoxin production: Process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 1707-1724.
138. Murrell, W.G. (1961). Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. In "Microbial reaction to environment". The 11th symposium of The Society for General Microbiology". (G.G. Meynell and H. Gooder, eds.) p. 100-150.
139. Dubois, N.R. (1968). Laboratory batch production of Bacillus thuringiensis spores and crystals. *Appl. Microbiol.* 16: 1098-1099.
140. Edwards, V.H. (1970). The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 12: 679-712.
141. Pirt, S.J. (1975). Batch cultures with substrates feeds. In "Principles of microbe and cell cultivation" p. 211 Blackwell Scientific Publications.

Acta N° 653

En el día de la fecha se reunió el Jurado para determinar sobre el trabajo de Tesis presentado por el ex-alumno de la carrera Doctorado en Ciencias Biopérmicas (Orientación ~~Biopérmica~~ ^{Industria Biopérmica} ~~Blanca~~) Lic. Jorge Alfredo Arca, titulado: "Producción de Bioinsecticidas", que oportunamente aprobó. -

Acto seguido se procedió a discutir la nota que el mismo merece, resolviéndose por unanimidad del Jurado aprobarlo y calificarlo con la nota de Satisficiente (10). -

Dese leerse: Industrias Biopérmicas
La Plata, 23 de Julio de 1975

María Elena Páncini

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]