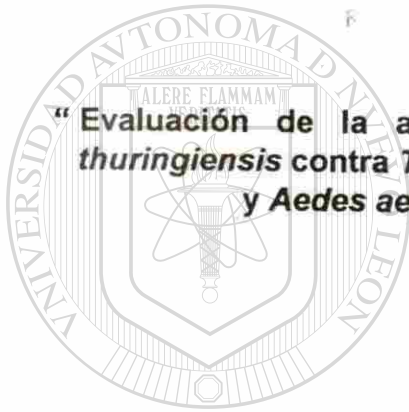


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“Evaluación de la actividad tóxica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni*, Hübner (Lepidoptera : Noctuidae) y *Aedes aegypti*, Linnaeus (Diptera: Culicidae)”

UANL

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Que como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en[®]
Ciencias con Especialidad en Microbiología

PRESENTA

Q.B.P. DIANA IVONNE MONSIVAIS LARA

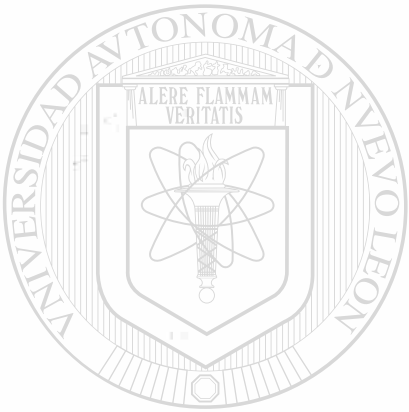
MONTERREY, N. L.

JUNIO DEL 2000

TM
QR8
.B3
M6
2000
c.1



1080124369



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



“Evaluación de la actividad tóxica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni*, Hübner (Lepidoptera : Noctuidae) y *Aedes aegypti*, Linnaeus (Diptera: Culicidae)”

UANL
TESIS

Que como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en
Ciencias con Especialidad en Microbiología

PRESENTA

Q.B.P. DIANA IVONNE MONSIVAIS LARA

MONTERREY, N. L.

JUNIO DEL 2000

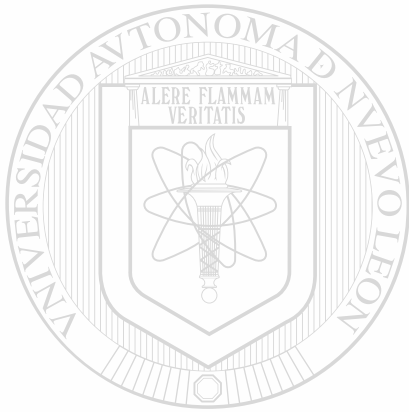
TM

R8

B3

M6

o o



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

“Evaluación de la actividad tóxica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni*, Hübner (Lepidóptera : Noctuidae) y *Aedes aegypti*, Linnaeus (Diptera: Culicidae)”

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

PRESENTA

Q.B.P. DIANA IVONNE MONSIVAIS LARA


COMISION DE TESIS



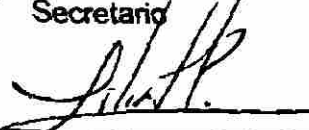
Dr. Luis Jesús Galán Wong
Director de tesis



M.C. María Guadalupe Maldonado Blanco
Co-Director



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Secretario



Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Vocal

DEDICATORIA

A DIOS

Porque siempre has estado conmigo

A PEDRO

**Porque gracias a su amor y apoyo
Incondicional logré terminar esta etapa**



A PEDRO ANTONIO

Por ser el motivo de mi vida para seguir adelante

A MIS PADRES

Marco Antonio e Ignacia

**Porque gracias a sus consejos seguí
adelante y porque siempre he contado con su apoyo**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A MIS HERMANOS

**Nancy, Marco y Yatzmin,
por todo lo que hemos compartido juntos**

A MIS SOBRINOS

Diego y Marco Antonio

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por la valiosa oportunidad y apoyo que me ha brindado para realizar el presente trabajo.

A la M.C. María Guadalupe Maldonado Blanco, por su asesoría para la realización del presente, por su apoyo incondicional y por su amistad.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño, Por las sugerencias y consejos propuestos

A la Dra. Lilia H. Morales Ramos, Por sus recomendaciones y asesoría.

Al M.C. Carlos Sandoval Coronado y a la M.C. Lucía Palacios, por sus consejos dados y por su amistad.

A Feliciano Molina, por su ayuda para la realización de los bioensayos y por su tiempo dedicado.

A Elodia Ruiz, a todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología Industrial y a todos aquellos que de alguna manera colaboraron con la ayuda del presente trabajo.

Al Dr. Idefonso Fernández Salas, por el material proporcionado para la realización de bioensayos.

A CONACYT y a la Universidad Autónoma de N.L. por la beca otorgada para la realización del presente trabajo.



LUGAR DE TRABAJO

**Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, "Dr. H. T. Dulmage"
Departamento de Microbiología e Inmunología**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTENIDO

APENDICE	I
INDICE DE TABLAS	II
INDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
IMPORTANCIA	6
ANTECEDENTES	7
<i>Trichoplusia ni</i> (Falso medidor)	7
<i>Aedes aegypti</i>	8
Control biológico	9
<i>Bacillus thuringiensis</i>	11
Historia	11
Morfología	12
Clasificación	12
Toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i>	15
α -exotoxina	16
β -exotoxina	16
δ -endotoxina	16
Modo de acción de la δ -endotoxina	17
Aislamientos de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	18
MATERIAL Y METODO	30
Obtención de las cepas bacterianas	30
Medio de cultivo utilizado	30
Activación de la cepa	30
Preparación del inóculo	30

Recuperación del complejo espora cristal	32
Pruebas de toxicidad para lepidópteros	32
Pruebas de toxicidad para dípteros	33
Análisis de bioensayos	35
RESULTADOS	37
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	47
LITERATURA CITADA	48



UANL

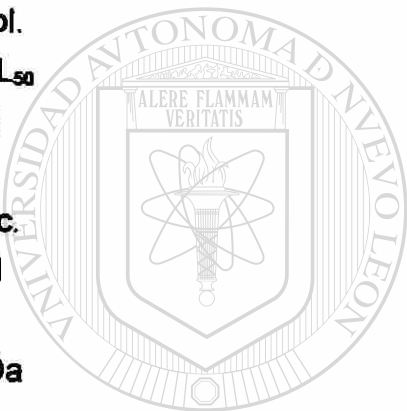
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE

A.	<i>aedes</i>
α	alfa
B.	<i>Bacillus</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	grado centigrado
cm	centímetro(s)
col.	colaboradores
CL ₅₀	Concentración letal media
C.	<i>Culex</i>
δ	delta
etc.	etcétera
g/l	gramos por litro
h	hora
kDa	kilodaltones
l	Litro(s)
mg/l	Miligramo(s) por litro
ml	mililitro
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
%	por ciento
rpm	revoluciones por minuto
sp.	especie
T.	<i>Trichoplusia</i>
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
UTI	Unidades Tóxicas Internacionales
μ	micra
$\mu\text{g/ml}$	Microgramo por mililitro
var.	variedad
x	por



U.A.N.L.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

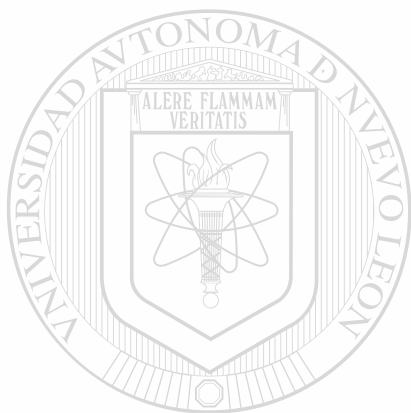


INDICE DE TABLAS

Número de tabla	Título	Página
1	Insecticidas microbianos disponibles en el mercado mundial.	25
2	Productos comerciales a base de <i>B. thuringiensis</i> disponibles en México.	26
3	Clasificación de <i>B. thuringiensis</i> de acuerdo al serotipo H.	27
4	Toxinas producidas por cepas diferentes de <i>B. thuringiensis</i> .	28
5	Características y estrategias para seleccionar cepas de <i>B. thuringiensis</i> .	29
6	Ingredientes de la dieta de Shorei.	36
7	Comparación de medias de mortalidad de cepas de <i>B. thuringiensis</i> bioensayadas contra <i>T. ni</i> a concentración de 50µg/ml de dieta.	39
<hr/>		
8	Cepas de <i>B. thuringiensis</i> mas tóxicas encontradas contra <i>T. ni</i> probadas a concentración de 50µg/ml y tipo de cristal presentado.	40
9	Toxicidad comparativa de cepas de <i>B. thuringiensis</i> bioensayadas contra <i>T. ni</i> que resultaron altamente tóxicas y la mostrada por la cepa GM-10.	40
10	Cepas de <i>B. thuringiensis</i> bioensayadas que presentaron toxicidad hacia larvas de <i>A. aegypti</i> y su forma de cristal.	41
11	Cepas de <i>B. thuringiensis</i> que presentaron actividad dual hacia lepidópteros y dípteros, y su forma de cristal.	42
12	Cepas de <i>B. thuringiensis</i> bioensayadas contra <i>A. aegypti</i> a dilución 10 ⁻⁴ de cultivo total.	43

INDICE DE FIGURAS

Número de Figura	Titulo	Página
1	Distribución de frecuencias de mortalidad mostradas por cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> probadas contra <i>Trichoplusia ni</i> a concentración de 50µg/ml de dieta.	44



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESUMEN

Actualmente se buscan alternativas biológicas para el control de plagas que puedan restringir el uso de plaguicidas químicos. Dentro de estos agentes microbianos se encuentra *Bacillus thuringiensis*, quien tiene un espectro amplio de acción sobre lepidópteros, himenópteros, dípteros, coleópteros y además otras clases de invertebrados como nemátodos, protozoarios, tremátodos y ácaros. En el presente trabajo se analizaron 96 cepas nativas de *B. thuringiensis*, las cuales se cultivaron a nivel de matraz Erlenmeyer, en un medio preparado a base de melaza, harina de soya y líquido de remojo de maíz, posteriormente el extracto insecticida se recuperó mediante el método de coprecipitación lactosa-acetona; a continuación se realizaron bioensayos preliminares para evaluar la actividad insecticida hacia *Trichoplusia ni*, empleándose dosis de 50µg/ml de dieta Shorei mediante bioensayos contra larvas del primer estadio, y posteriormente se determinó la concentración letal media (CL₅₀) de las cepas más tóxicas. Para evaluar la actividad contra dípteros se realizaron bioensayos preliminares con cultivo total contra *Aedes aegypti*, y posteriormente se determinó la CL₅₀ al extracto seco de las cepas más tóxicas. Entre los resultados obtenidos podemos mencionar que casi el 100% de las cepas probadas mostraron actividad contra *T. ni* en los bioensayos preliminares. Se realizó un análisis de varianza que distinguió 45 grupos estadísticos, dentro de los cuales encontramos que el 2.8% de las cepas presentó un 100% de mortalidad, dentro de estas se encontraron la RV-1-7 y la RV-4-34 que presentaron CL₅₀ de 7.9 y 9.6µg/ml respectivamente, y fueron significativamente iguales en toxicidad; 4 cepas presentaron el 98% de mortalidad y 2 el 97%. En lo que respecta a dípteros, aproximadamente el 23% mostró toxicidad contra *A. aegypti* a la dilución de 10⁻⁴ de cultivo total. En los resultados de los bioensayos preliminares, solamente las cepas RV-4-8 y la RV-1-8 presentaron una mortalidad del 63 y 66% respectivamente, ya que el resto de las cepas probadas presentó mortalidad entre el 0 y el 33%. El análisis probit realizado determinó CL₅₀ de 2.6 y 4.5mg/l, y una potencia de 52.88 y 30.09 UTI/mg para las cepas RV-4-8 y RV-1-8 respectivamente, contra *A. aegypti*. Estas cepas fueron mucho menos potentes que el estándar que mostró una CL₅₀ de 0.0093mg/l y potencia 15000 UTI/mg. Con los datos obtenidos podemos establecer que fue posible el aislamiento de 2 cepas altamente tóxicas para lepidópteros, sin embargo para dípteros las cepas probadas presentaron baja toxicidad.

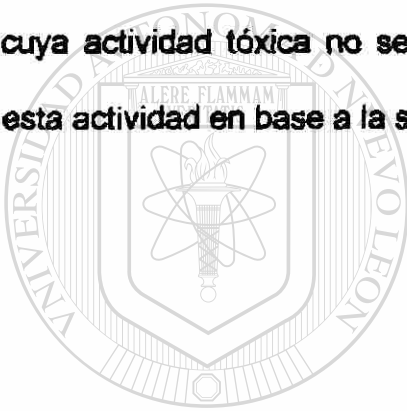
ABSTRACT

Nowadays in the world are sought biological alternatives for control of plagues that could reduce the use of chemical pesticides. Within these microbial agents is *Bacillus thuringiensis*, which has wide spectrum of action on lepidopteran, hymenopteran, dipteran, coleopteran, besides other classes of invertebrates as nematodes, protozoan, trematode, and acarus. In the present work were analyzed 96 native strains of *B. thuringiensis*, which were cultivated in Erlenmeyer flask, in a medium prepared with molasses, soybean flour and corn steep liquor, after that the insecticidal extract was recovered through the coprecipitation lactose-acetone method; then, were achieved preliminary bioassays for evaluating the insecticidal activity against *Trichoplusia ni*, using doses of 50 µg/ml Shorei diet, against 1st instar larvae and after that were determined the mean lethal concentrations from the most toxic strains. The obtained results showed that almost 100% of the strains presented activity against *T. ni* in the preliminary bioassays. An anova analysis differentiated 45 statistical groups, within of these were found that the 2.8% strains showed a 100% mortality, were found the RV-1-7 and RV-4-34 strains which presented LC₅₀ of 7.9 and 9.6 µg/ml respectively, and were significantly equals in toxicity similar to the most toxic strain GM-10 of our collection, which showed 8.4 µg/ml; four strains showed 98% mortality and two strains presented 97% mortality. Relative to dipteran, approximately 23% strains showed toxicity against *Aedes aegypti* to 10⁻⁴ final whole culture, and the results of preliminary bioassays, only the strain RV-4-8 and RV-1-8 presented 63 and 66% mortality respectively, so, the rest of tested strains presented mortality between 0-30%.

INTRODUCCION

En la actualidad uno de los principales problemas de contaminación en el ambiente es el uso indiscriminado de plaguicidas químicos sintéticos, debido principalmente a ventajas que estos ofrecen como son: un rango amplio de acción sobre casi todas las situaciones de plagas, la acción curativa rápida para prevenir daños y el efecto residual que tienen. Sin embargo, estos plaguicidas han provocado un grave desequilibrio ecológico, alta residualidad en los suelos, rápida resistencia de las plagas a los productos químicos, destrucción de enemigos naturales, contaminación ambiental, etc. En base a esto es necesario establecer alternativas, como lo es el control biológico, basado en la utilización de microorganismos entomopatógenos potenciales (Ignoffo, 1971). Dentro de estos agentes microbianos se encuentra *Bacillus thuringiensis*, una bacteria exitosa producida y distribuida ampliamente en el mundo, empleándose como insecticida de alta especificidad (Dulmage, 1971). Esta bacteria y sus variedades sintetizan 7 diferentes tipos de toxinas, de las cuales las más importantes son la α -exotoxina, β -exotoxina y la δ -endotoxina, esta última es liberada durante el proceso de esporulación en forma de un cuerpo paraesporal cristalino, de naturaleza proteica, con actividad insecticida y específica para lepidópteros, dípteros, coleópteros, toxicidad dual contra lepidópteros y dípteros, protozoarios, tremátodos, ácaros, himenópteros,

homópteros y nemátodos (Feitelson, 1993; L. Quiñones, 1996). Algunos de los trabajos reportados recientemente se han basado en el descubrimiento de nuevos aislados que presentan alta toxicidad contra nuevos insectos blanco, así como la determinación del modo de acción de las toxinas (Aizawa, 1974; Hofte, 1989). En el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se encuentra la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos, donde existe una serie de cepas nativas de *B. thuringiensis* recientemente aisladas cuya actividad tóxica no se conoce, por lo tanto nos proponemos determinar esta actividad en base a la siguiente hipótesis y objetivos:



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HIPOTESIS

Es posible que cepas nativas de *B. thuringiensis* oriundas de San Luis Potosí muestren alta toxicidad hacia lepidópteros y/o dípteros, comparables a los usados comercialmente.

OBJETIVO GENERAL

Selección de cepas de *B. thuringiensis* obtenidas de muestras de suelo nativas de Río Verde, San Luis Potosí, con alta toxicidad hacia insectos lepidópteros y/o dípteros.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Propagación y obtención de 96 cultivos totales y extractos insecticidas de las cepas de *B. thuringiensis* bajo estudio.
- 2) Evaluación de la toxicidad hacia lepidópteros (*Trichoplusia ni*) y dípteros (*Aedes aegypti*) de 96 cepas de *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio.
- 3) Determinar la Concentración Letal Media (CL₅₀) de los extractos insecticidas producidos por las cepas de *B. thuringiensis* más tóxicas encontradas contra *T. ni*.
- 4) Determinar la CL₅₀ de los extractos insecticidas obtenidos de cepas más tóxicas encontradas contra *A. aegypti*.

IMPORTANCIA

Debido a que en la actualidad existe un gran número de insectos plaga que atacan la agricultura, así como algunos dípteros que actúan como vectores de enfermedades afectando la salud humana, además de la resistencia que se ha presentado con el uso frecuente del control químico, la importancia de este trabajo está basada en la evaluación de cepas entomopatógenas de *Bacillus thuringiensis* nativas, que no han sido estudiadas y que puedan ser utilizadas como agentes de control biológico como una alternativa al control químico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

Actualmente se conocen más de 100,000 especies de microorganismos destacándose como entomopatógenos alrededor de 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y cerca de 100 especies de bacterias. Estos microorganismos se usan en el control microbiano de poblaciones de insectos plaga de importancia agrícola, forestal, ornamental y en salud pública. La mayoría son poco conocidos, mientras que algunas variedades de *Bacillus* y virus han sido estudiadas con más detalle (Galán, 1993). Dentro de los *Bacillus*, encontramos a *B. thuringiensis*, cuya actividad biológica abarca distintas órdenes de insectos, entre los que se encuentran lepidópteros, hymenópteros, dípteros, homópteros coleópteros, además invertebrados de otras clases como nemátodos y protozoarios, ácaros y tremátodos, (Bonne y col. 1985; Thompson, 1992; Lorence y col. 1996).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Entre las plagas más importantes encontramos a *T.ni*, quien ataca todas las hortalizas de la familia de la col, también la lechuga, espinaca, betabel, chicharo, apio, perejil, papa, jitomate, etc. Estas plantas son generalmente acribilladas con agujeros grandes de forma y tamaños regulares, tanto el tejido de la hoja es devorado, que el crecimiento de la planta se interfiere seriamente, (Sifuentes, 1978; Metcalf, 1982). Se distribuye en Estados Unidos, desde el Canadá hasta México, en la zonas aldoneras de los estados de Baja California, Chihuahua,

Sonora, Coahuila, Durango, Tamaulipas, Morelos y Chiapas.

Dentro de las medidas de combate se utiliza la aspersión con toxina de *B. thuringiensis*, esto resulta un combate efectivo y selectivo para los gusanos de la col. Pueden requerirse tratamientos semanales de estos productos y se deben hacer todos los esfuerzos posibles para destruir los gusanos aún cuando son pequeños. Después de que el cultivo es cosechado, los tallos viejos deben ser destruidos y el campo barbechado (Metcalf, 1982).

En lo que respecta a *A. aegypti*, es un insecto doméstico de importancia médica debido a que es un vector de enfermedades virales tales como la fiebre amarilla urbana y los cuatro serotipos del dengue (Carrada, 1984). Originalmente se criaba en depósitos temporales de agua, en los habitats silvestres, pero debido a la urbanización, ha cambiado sus patrones de conducta, encontrándose en sus estadios juveniles en recipientes que almacenan agua, tales como jarrones de cementerios, llantas abandonadas, etc. Estos depósitos se encuentran en áreas sombreadas, húmedas y con temperaturas templadas, cercanas a hogares y a veces en el interior de ellos (Sánchez, 1983). El mosquito adulto es de vida libre alimentándose del néctar de las flores u otro líquido dulce de alguna fuente accesible para adquirir energía, y las hembras además necesitan sangre para obtener las proteínas requeridas en la producción de huevos. Además de transmitir enfermedades virales también ocasiona reacciones secundarias como inflamación, irritación y sensibilidad del área picada y otras molestias que

repercuten en las actividades diarias del hombre (Carrada, 1984). Como medidas de control se han utilizado diversos insecticidas químicos además de formulaciones con *B. thuringiensis var. israelensis*, quien resulta altamente efectiva y específica contra larvas de mosquitos y moscas negras; entre las ventajas que presenta esta bacteria se encuentran su velocidad de acción, su ausencia de efectos sobre otros organismos no blanco, esto ha propiciado el fortalecimiento del control microbiano de insectos vectores de enfermedades humanas, en los últimos años (De Barjac, 1989).



CONTROL BIOLÓGICO

El empleo de insecticidas químicos sintéticos ha generado problemas de gran magnitud, entre estos se encuentran la contaminación en agua, suelos y aire, el desarrollo de resistencia a los plaguicidas químicos en insectos (Heitefus, 1989) y los efectos negativos de los insecticidas químicos en la salud humana (Ortega y col., 1994). A finales de los 80's, se reportó que cuando menos 400 especies diferentes de artrópodos se volvieron resistentes a plaguicidas (Heitefus, 1989); este número creció a más de 500 especies (entre ácaros e insectos) para 1992, con muchos casos de resistencia cruzada (Lambert, 1992). Los productos biológicos no están exentos de desarrollar resistencia, pero esto ha sido en mucho menor proporción ya que en 30 años una sola especie de *Plutella xylostella* se ha reportado como especie resistente a *B. thuringiensis*, (Kidd, 1994). Ante esta panorámica, es imperante la necesidad de desarrollar

estrategias alternas para el control de plagas. Durante la última década, los productores agrícolas han tomado conciencia de la importancia de las estrategias relacionadas con el control biológico de insectos plaga en la agricultura, en los bosques y a nivel doméstico (Krieg, 1984; Cate, 1990). Falcon en 1971 definió el control biológico de plagas como el uso de microorganismos empleados para control, que suceden naturalmente, agentes introducidos y la aplicación de microorganismos y/o sus productos como insecticidas microbianos. Actualmente se define como el uso de organismos vivos (nativos o modificados genéticamente), o de sus partes o productos proteicos con actividad insecticida, para reducir el efecto de las poblaciones de un organismo problema a un nivel tolerable desde el punto de vista económico y sanitario (Cate 1990; Lorence, 1996). La mayoría de las estrategias de control biológico constituyen alternativas interesantes a los métodos convencionales de control químico de insectos plaga, debido a que este tipo de estrategias naturales están orientadas hacia el empleo de productos compatibles con el ambiente y con la salud humana (Feitelson, 1990). Actualmente se conocen más de 1500 microorganismos entomopatógenos, como son las bacterias, virus, hongos, protozoarios y nemátodos. En la actualidad se emplean productos comerciales elaborados a base de estos microorganismos que son disponibles en el mercado mundial (tabla 1). Entre los más estudiados se encuentra *B. thuringiensis*, cuyas preparaciones comerciales han probado ser insecticidas ideales, debido a que carecen de toxicidad para el hombre y animales domésticos, no fitotóxicos, de efecto no residual, etc. Como se mencionó ya anteriormente la actividad biológica de esta bacteria abarca distintas

órdenes de insectos, entre los que se encuentran lepidópteros, himenópteros, dípteros, homópteros, coleópteros, además invertebrados de otras clases como nemátodos, protozoarios, ácaros y tremátodos, (Bonne y col, 1985; Thompson, 1992; Lorence y col. 1996;). En la tabla 2 se muestran algunos productos comerciales a base de *B. thuringiensis* disponibles en México.

B. thuringiensis

HISTORIA

B. thuringiensis fue descubierto en Japón en el año de 1901 por Ishiwata al aislarlo de larvas enfermas del gusano de seda *Bombix mori*, denominando a esta bacteria *B. sotto*. Con este descubrimiento se inicia el desarrollo del control biológico de insectos plaga. En 1914, Berliner aisló esta bacteria de larvas enfermas de la palomilla del Mediterráneo *Anagasta kuhniella* y en 1927, Mattés la denominó *B. thuringiensis*. En estudios posteriores se demostró que esta bacteria es altamente específica para plagas del orden lepidóptera y es inofensiva para insectos benéficos (Castro, 1982). Trabajos realizados por Hannay en 1953 sugieren que el cristal parasporal produce una sustancia tóxica que induce a una septicemia en larvas de insectos. En 1955, Hannay y Fitz-James, reportó que los cristales son proteicos y que al ser ingeridos pueden causar la muerte a larvas de insectos lepidópteros susceptibles. Steinhaus en Estados Unidos, entre 1951-1956, realizó pruebas con diversas cepas de *B. thuringiensis*, de las cuales 11 resultan ser tóxicas para el gusano de la alfalfa *Colia eurithemcen* (primer

reporte en América) y con los resultados obtenidos estimuló el uso comercial de *B. thuringiensis* para uso como agente de control biológico contra algunas plagas de lepidópteros (Aizawai, 1974; Dulmage, 1989).

MORFOLOGIA

B. thuringiensis, es una bacteria del suelo, gram positiva, aerobia, esporogénica, entomopatógena facultativa, su característica principal es la producción de un cuerpo parasporal, cuerpo de inclusión o cristal compuesto de proteínas insecticidas conocidas como δ -endotoxinas, que son altamente específicas contra insectos plaga (Goldberg y Margalit, 1977, Dulmage, 1981). Su tamaño promedio es de 2 a 5 μ x 1 μ , presenta flagelos peritricos y se reproduce por fisión binaria (Pelczar, 1981).

CLASIFICACION

B. thuringiensis es un miembro del grupo I del género *Bacillus*, el cual incluye *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. cereus*, distinguible de este por la presencia de un cuerpo parasporal y por antígenos flagelares específicos (Rowe y Margaritis, 1987).

La clasificación de *B. thuringiensis* está basada en el antígeno flagelar H, y es complementada con pruebas bioquímicas para determinar las variedades. (De Barjac y Frachon, 1990). La primera clasificación de la bacteria fue propuesta en 1919 por Smith y col., quienes basándose exclusivamente en las características

morfológicas de los aislados sugirieron que se consideraran como una variedad de *B. cereus*, lo cual fue aceptado por un tiempo, ya que en 1951 Toumanoff y Vago nombraron como *B. cereus* var. *alesti* un aislado que tenía las mismas características de las bacterias de Ishiwata y Berliner, y en 1952 plantearon que todos los cultivos encontrados hasta la fecha eran variedades de *B. cereus* (Rodríguez-Monroy, 1991). La primera clasificación válida nace con las observaciones de Heimpel y Angus en 1958 y 1959, al proponer una serie de pruebas bioquímicas para identificar las variedades de *B. thuringiensis*. En 1962, De Barjac y Bonnefoi publicaron un ensayo para la clasificación de 24 cepas de *B. thuringiensis*, mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y serológicas, esta última de acuerdo a las características antigénicas del flagelo. Posteriormente Höfte y Whiteley (1989) hicieron un esquema de clasificación serológica en base a las proteínas del cristal (Galán, 1993). Actualmente el sistema oficial de clasificación para *B. thuringiensis* es manejado por el Instituto Pasteur de París, Francia (Lecadet, 1994), en donde han clasificado hasta la fecha 55 grupos serológicos de diferentes aislados de todo el mundo (tabla 3). Además, Lorence y col. (1996), elaboraron una tabla de clasificación en base a las proteínas cry, que comprende hasta la fecha 15 tipos de proteína Cry encontradas. Las toxinas Cry1, son las más frecuentes, la mayor parte de estas proteínas se producen como protoxinas y generalmente forman cristales bipiramidales. Las proteínas Cry1 con diferente peso molecular son: Cry1a y Cry1b, sus fragmentos tóxicos pesan entre 60 y 70 kDa, y se puede decir que son activas contra lepidópteros, aunque existen excepciones. Las toxinas Cry1Ab y

Cry1Ca son tóxicas tanto para lepidópteros como para dípteros; mientras que Cry1a tiene actividad tóxica hacia coleópteros y lepidópteros. Para la toxina Cry1Ba, se ha reportado actividad contra lepidópteros, coleópteros y áfidos. Las toxinas Cry2, presentan cristales de forma cuboidal, y sus fragmentos tóxicos pesan entre 50 a 60 kDa, son tóxicas para lepidópteros y dípteros, las toxinas Cry2A y Cry2Ac es activa contra lepidópteros, solamente. La toxina Cry3, produce cristales de tipo romboidal, y sus formas activas pesan alrededor de 66 kDa; son activas exclusivamente para coleópteros. Las toxinas Cry4, tienen actividad contra dípteros, Cry4Aa y Cry4Ba esta clase de proteínas se ha encontrado comúnmente en el serotipo *israelensis*, y sus fragmentos tóxicos son de 50 a 70 kDa. Dentro de las toxinas Cry5 se encuentran la Cry5Aa, Cry5Ab y Cry5Ba, las dos primeras tienen actividad dual contra nemátodos y ácaros; la última solo para coleópteros. Dos proteínas integran la clase Cry6, la Cry6Aa y la Cry6Ba, ambas son activas contra nemátodos y ácaros. La toxina Cry7, está formada por Cry7Aa y Cry7Ab, presentan cristales bipiramidales, pesan 66 kDa y son activas hacia coleópteros. Dentro de la clase Cry8 se encuentran los subtipos: Cry8Aa, Cry8Ba y Cry8Ca, su peso molecular va de 130 a 134 kDa. La primera se acumula en cristales esféricos; todas son activas hacia coleópteros, pero Cry8Aa también es activa hacia ácaros. Las toxinas de la clase Cry9 son la Cry9Aa, Cry9Ba y la Cry9Ca, de 126 y 130 kDa. La primera y la tercera presentan actividad hacia lepidópteros. Se desconoce el blanco de Cry9Ba. La toxina Cry10, genera un fragmento activo de 58 kDa; es activa contra dípteros, fué aislada de una cepa del serotipo *israelensis*. En la clase Cry11 se encuentra la

Cry11Aa y la Cry11Ba, la primera presenta un fragmento de 30 kDa y la segunda de 80. Ambas son activas contra dípteros. La toxina Cry12Aa, presenta toxicidad hacia nemátodos y ácaros. La toxina Cry13Aa de 88 kDa es tóxica hacia nemátodos. La Cry14, es tóxica hacia dípteros y coleópteros. La toxina Cry15Aa, presenta actividad tóxica hacia el lepidóptero *Manduca sexta*. Sin embargo, existen cepas de *B. thuringiensis* reportadas, que no están incluidas dentro de la clasificación, ya que no han sido depositadas en los bancos de datos y portan cristales con actividad tóxica diferente, por ejemplo se aisló una proteína de 54 kDa a partir de una cepa del serotipo *wuhanensis* y que presenta actividad tóxica hacia coleópteros, ácaros y áfidos; y otra proteína de 133 kDa que tiene actividad tóxica hacia protozoarios (Lorence y col. 1996). Este sistema de clasificación de los genes Cry y cyt está basado en la similitud de la secuencia de aminoácidos.

TOXINAS PRODUCIDAS POR *B. thuringiensis*

La habilidad que presenta *B. thuringiensis* para producir toxinas varía de una cepa a otra y la actividad presentada también depende de las condiciones del medio de cultivo (Pendleton 1969, Dulmage, 1977). Entre las toxinas producidas por *B. thuringiensis* se encuentran α -exotoxina, β -exotoxina, δ -endotoxina, toxina lábil, toxina soluble en agua, exotoxina "factor ratón", y una enzima no identificada que puede ser no tóxica (τ -exotoxina) (tabla 4). Para la selección de una cepa se deben tomar en cuenta ciertas características que resulten ideales (tabla 5).

α -exotoxina.

También conocida como fosfolipasa C ó lecitinasa, se ha estudiado en las variedades de *B. thuringiensis* y *B. cereus* (Krieg, 1969), afecta a los fosfolípidos de membrana, causando lisis y necrosis, actúa sobre la molécula de lecitina con la formación de un diglicérido y fosforilcolina. Se ha encontrado susceptibilidad en algunos insectos como *Galleria mellonella* y *Plutella maculipennis* (Faust, 1982).

β -exotoxina :

Fue descubierta por McConell y Richards en 1959 (Cantwell, 1964). El aislamiento y caracterización preliminar de la β -exotoxina los condujeron De Barjac y Dedonder (1965- 1968) a partir del serotipo H-1 (Lecadet, 1975). Su modo de acción lo investigó Sebesta y Horská en 1968, quienes mostraron que la exotoxina inhibe la RNA polimerasa dependiente de *Escherichia coli* "in vitro" (De Barjac, 1976, Johnson , 1978, Sebesta, 1968).

δ -endotoxina :

Se le considera una de las toxinas más importantes de acuerdo a su actividad (Faust, 1982), es sintetizada en forma de protoxina durante el proceso de esporulación, dentro de la célula vegetativa y aparece como una inclusión cristalina (Calberg, 1973), presentándose la mayoría de las veces en forma bipiramidal, pero puede variar en forma y tamaño, dependiendo de los serotipos de la bacteria, es diferente en cuanto a su composición y cantidad de cadenas

polipeptídicas, es termolábil y soluble en soluciones alcalinas y es hidrolizada a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales del hospedero, la susceptibilidad es dependiente de enzimas y serotipo, (Faust, 1982). Yamamoto en 1981, realizó estudios bioquímicos del cristal y obtuvo péptidos de diferentes pesos moleculares, un péptido de 135 kDa, denominado P-1, el cual fue tóxico para lepidópteros, y otro de 65 kDa denominado P-2, quien mostró toxicidad hacia dípteros, además de lepidópteros (Rowe, 1987; Youn, 1970).

MODO DE ACCIÓN DE LA δ -ENDOTOXINA

Para que ejerza su acción la toxina debe ser ingerida por el insecto susceptible, después, debe ser hidrolizada por las proteasas del intestino del insecto y descubrir la fracción tóxica. La mayoría de los estudios están de acuerdo en el hecho de que después de que la protoxina ha sido activada, la toxina liberada o fracción tóxica, se une a receptores específicos localizados sobre la superficie de la célula, como podría ser una proteína de membrana, (Knowles y Ellar, 1986). En 1982, Höfte, sugiere que la toxina induce la formación de poros en la membrana de las células epiteliales del intestino, causando un incremento en la permeabilidad, esto determina una lisis celular y rápida parálisis, eventualmente la larva deja de comer y muere (Höfte, 1982, Stanier, 1986). Una invasión secundaria puede acelerar la muerte de la larva infectada (Höfte, 1989). La combinación de parálisis intestinal y septicemia, en un tiempo de 24 a 96 horas después de haber ingerido los cristales paraesporales y la endoespora, pueden provocar la muerte de la larva (Lambert, 1992).

AISLAMIENTOS DE CEPAS DE *B. thuringiensis*

Entre los más importantes descubrimientos sobre *B. thuringiensis* se encuentra el reportado por Dulmage, en 1969, quien aisló del gusano rosado *Pectinophora gossypiella* una cepa de *B. thuringiensis* que resultó ser entre 20 y 200 veces más potente que las cepas conocidas hasta entonces, a esta cepa la denominó HD-1, que corresponde al serotipo 3a3b de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y actualmente esta cepa es la base para los productos comerciales en todo el mundo contra diversas plagas de lepidópteros de importancia agrícola (Dulmage, 1970, Dulmage y Rhodes, 1971). Entre otras aportaciones relevantes de Dulmage se encuentra: la recuperación de más de 60 cepas de *B. thuringiensis israelensis*, la producción de 102 extractos de fermentación, la elaboración de una guía internacional para la producción de esta bacteria, así como el desarrollo de un bioensayo estándar para medir toxicidad a los extractos producidos; la determinación de una efectiva concentración para los formulados elaborados y el establecimiento de la cepa HD-968-S-1983 como estándar primario de referencia para la determinación de la potencia de los extractos de Bti, (Galán y col. 1996). En 1970, Thompson aisló de larvas enfermas de *G. mellonella*, una nueva variedad de *B. thuringiensis*, la cual fue clasificada dentro del serotipo H-12 como var. *thompsoni*, quien resultó tóxica para *Pieris brassicae* (gusano europeo de la col) y *T. ni* (falso medidor), (Rodríguez Padilla y col., 1996).

En 1977, Goldberg y Margalit aislaron un bacilo de larvas del mosquito *Culex sp.*, el cual fue identificado por De Barjac como *B. thuringiensis*, var. *israelensis*.

Además, la bacteria presentaba un nuevo antígeno flagelar al que se le denominó H-14. Esta variedad se caracterizó por presentar cristales de diferentes tamaños y formas, y sobre todo por su patogenicidad hacia larvas del mosquito *A. aegypti*, lo que dio la pauta para considerarlo útil en salud pública para el control de vectores de enfermedades tropicales (García, 1986; Gharib, 1988; Rodríguez Padilla y col., 1996).

En 1981, los japoneses reportan los serotipos de *B. thuringiensis* H-17 var. *tokohuensis*, H-18 var. *kumamotoensis* y H-19 var. *tochigiensis*, las cuales resultaron no tóxicas para diferentes especies de larvas de insectos lepidópteros y dípteros, cepas que fueron aisladas del suelo en distintas prefecturas (Rodríguez Padilla y col. 1996).

En 1985, Pérez-Orona y col. probaron 3 cepas de *B. thuringiensis* del suelo GM-1, GM-7 y GM-13, contra larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* var. *quinquefasciatus*, las concentraciones letales medias obtenidas a las 72 horas fueron de 1410 y 316 mg/l para la cepa GM-1 contra *Aedes* y *Culex* respectivamente, mientras que GM-7 mostró actividad sólo contra *Culex*, con una CL_{50} de 125.8 mg/l, en tanto que GM-13 no tuvo efecto en ninguna de las especies probadas.

En 1987, Rodríguez-Tovar y col. reportaron más de 100 cepas nativas aisladas de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo y de insectos, 59 de estas fueron

propagadas en un mismo medio de melaza y probadas contra larvas de *A. aegypti*, resultando 5 de los aislados con actividad tóxica, (GM-21, GM-23, GM-25, GM-34 y GM-50) quien resultó más tóxica de éstas fue GM-34, identificada como *B. thuringiensis*, serotipo 3. En el mismo año, Galán Wong y col. aislaron cerca de 100 cepas de *B. thuringiensis* de las cuales se identificaron bioquímica y serológicamente 32, estas se propagaron en un medio de cultivo a base de melaza y posteriormente cada uno de los extractos fue obtenido por coprecipitación con lactosa-acetona y probados contra *Spodoptera frugiperda* y *Heliothis virescens*, encontrándose que la cepa GM-10 identificada como la variedad *aizawai*, presentó una CL_{50} de 19.3 $\mu\text{g/ml}$ de dieta mientras que para el estándar fue de 21.16 $\mu\text{g/ml}$ en *H. virescens*; sin embargo, para *S. frugiperda* el mismo aislado resultó 110 veces más tóxico que el estándar, con una CL_{50} de 59 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la del estándar 6491.2 $\mu\text{g/ml}$.

En 1989, Ohba y Aizawai reportaron 2 nuevas serovariedades pertenecientes al grupo serológico 3, subespecie *sumiyoshiensis*, 3a:3d y la subespecie *fukuokaensis* 3a:3d:3e; quienes resultaron tóxicas para tres especies de lepidópteros. En 1990, se describió la variedad *neoleonensis* como el serotipo H-24, quien se caracteriza por presentar un cristal inusual de forma triangular, actualmente está clasificada como H-24 a 24b (Lecadet, 1994; Rodríguez Padilla, 1996). En 1992, Olivera Carranza analiza 24 cepas nativas de *B. thuringiensis* de las cuales siete fueron tóxicas para insectos del género *Spodoptera* con porcentajes de mortalidad arriba del 80%, a la dosis probada de 500 $\mu\text{g/ml}$,

además todas las cepas resultaron ser pertenecientes a la variedad *aizawai*.

Chilcott y Wigley en 1992, obtuvieron un total de 690 cepas de *B. thuringiensis*, las cuales fueron aisladas de 455 muestras de suelo, larvas y habitats de insectos en Nueva Zelanda. Se probó la toxicidad contra insectos de tres ordenes: lepidópteros (*Planotortix octa*), dípteros (*Culex pervigilana*) y coleópteros (*Tenebrio molitor*). Algunos aislados fueron tóxicos para ambos lepidópteros y dípteros, otros resultaron no tóxicos para ninguno de los insectos estudiados. Por otra parte estudios realizados mediante electroforesis en gel con dodecil sulfato de sodio, indicaron una diversidad de proteínas con diferente peso molecular (kDa) de los distintos grupos de cristales tóxicos.

En 1993, Pascale y col. aislaron cepas de *B. thuringiensis* de residuos de tabaco y de abejas muertas (*Lasioderma serricorne*; Coleoptera: Anobiidae) colectadas de diversas partes del mundo. Se realizó la identificación serológica de los aislados, caracterización de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y análisis de inmunoblot. Las cepas que producían cristales romboidales se asociaron con el patotipo específico de coleóptero (grupo Cry III) y fueron el grupo mas abundante (59% de los aislamientos). Los resultados sugieren que la actividad no es restringida a aislamientos relacionados con el grupo específico de coleóptera.

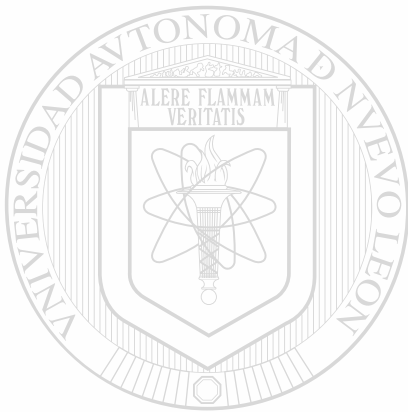
Kawalek y col. en 1995, aislaron una nueva cepa de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* en Malasia, purificaron las inclusiones cristalinas y realizaron bioensayos contra larvas del cuarto estadio de *Culex. quinquefasciatus*, *A. aegypti*, *A. togoi*, *A. albopictus*, *Anopheles maculatus* y *Mansonia uniformis*. Las CL_{50} de las inclusiones cristalinas para cada especie fueron de 0.34, 8.08, 0.34, 17.59, 3.91, y 120 ng/ml respectivamente. Estos valores muestran que las inclusiones parasporales de esta nueva subespecie tienen toxicidad insecticida comparable con la subespecie *israelensis*.

En 1997, Lonc y col. aislaron 24 cepas de *B. thuringiensis* y examinaron su serotipo, su composición proteica, el contenido de plásmidos, y su actividad insecticida. Las cepas PO1-PO11 y PO14-PO15 fueron reconocidas como *B. thuringiensis kurstaki* H3a3b3e, mientras que los aislados PO12 y PO13 mostraron un determinante antigénico nuevo el H-47, y se denominó serovariedad *wratslaviensis*. Otras investigaciones mostraron que las cepas tenían plásmidos diferentes (por ejemplo 6 plásmidos diferentes largos en la cepa PO12) y cristales compuestos de dos diferentes proteínas, 135.8 y 66.2 kDa (cepas PO1-PO11 y PO14-PO24) respectivamente, o una proteína de 66.2 kDa (PO12 y PO13). Las pruebas de toxicidad preliminar con suspensiones de esporas y cristales mostraron baja actividad (menos del 50% de mortalidad) contra larvas de moscas de la fruta y ninfas de cucaracha y altos efectos tóxicos contra larvas de mosca doméstica (mas del 90% de mortalidad).

En 1998, Bravo y col. aislaron 496 cepas de *B. thuringiensis* de 503 muestras de tierra colectadas de 5 macroregiones de México, y caracterizadas para establecer un patrón de distribución ecológico para los genes y desarrollo de agentes de control biológico. Las cepas se analizaron con PCR con primers capaces de detectar un rango de genes Cry y Cyt. En particular las proteínas cry 1 y 9 son tóxicas contra insectos lepidópteros; Cry3, Cry7 y Cry8 contra coleópteros y Cry11, Cry21 y Cyt contra dípteros. Las cepas que poseen el gen Cry1 fueron las más abundantes en la colección (49.5%), con 33 diferentes tipos de Cry1. El gen Cry3 se encontró en el 21.5% de las cepas, Cry11 y genes Cyt se mostraron en el 7.9% mientras que Cry7, Cry8 y Cry9 estuvieron en el 0.6, 2.4 y 2.6% de las muestras respectivamente. Los genes del tipo Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 y Cry21 no se encontraron en ninguna de las cepas, en tanto que el 14% de los aislados no respondieron a esos primers. En el mismo año Johnson y col. probaron varios aislamientos naturales de *B. thuringiensis*, contra larvas de *Musca domestica* y larvas de la familia *Calliphoridae* y determinaron que la toxicidad se debía a la protoxina de la clase Cry IB. La presolubilización de la toxina no fue necesaria para inducir mortalidad en ninguno de estos insectos, mientras que la adición de esporas a la δ -endotoxina fue esencial para inducir mortalidad significativa en larvas de *Chrysomya albiceps* y potenciar la mortalidad de otras especies estudiadas.

En 1999 Chang y col. aislaron cepas de *B. thuringiensis* STB-3 de tierra coreana que mostraron alta toxicidad contra *Spodoptera exigua*. El cristal es de forma

blpiramidal con un peso molecular de 130 kDa. El serotipo H de STB-3 fue idéntico a *B. thuringiensis* serovariedad *kenyae* (H4a4c). Sin embargo, en análisis de PCR usando genes Cry específicos contra *Spodoptera* mostraron que STB-3 tenía solo el gen Cry1E difiriendo de la serovariedad *kenyae* con Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1E.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 1. Insecticidas microbianos disponibles en el mercado mundial

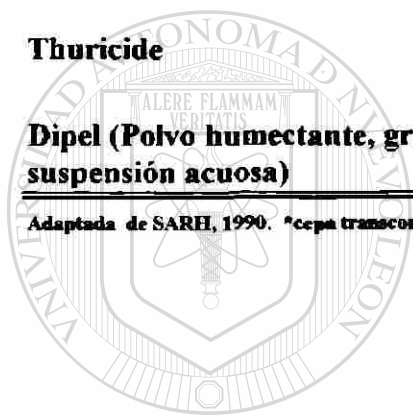
Grupo	Organismo	Producto	País
Virus	Virus de la Poliedrosis Nuclear	Virin-Ersh, Virin-ABB, Virin-EKS, Virin-Dipron, Virin-HS, Virin-GYAP Virin-LS, Virin-KHS, Virin-OS	URSS
		Elcar, Gypcheck, TM-Buocontrol	EU
		Manestrin, Hufantrín	Bulgaria
		Monsarimo-Virus	Fmlandia
		Virox	Inglaterra
		VPN 80, VPN 82	Guatemala
	Virus de la Poliedrosis Citoplásmica	VPC	Japón
Bacterias	<i>Bacillus popilliae</i>	Doom, Japademic, Milky Spore	EU
	<i>phaericus</i>	ABG-6185	EU
	<i>B. thuringiensis</i>	Agree	México
		Dipel, Javelin, Biotrol, Foil, M-1, Bactmos, Teknar, Vectobac, Larvo-Bt, Thuricide	EU
		Bactospaine	Bélgica
		Bathurin, Moskitur	Checoslovaquia
		BIP, Enterobacterin-3, Thuringin, Bitoksibacillin, Exotoksin, Gomelin, Inseckrin, Lepidocin, Bactokulicid, Dendrobacillin	URSS
		Bacillin, Thuridan	Polonia
		Thursindhgin, Turintoks	Rumania
		Biodin	Dinamarca
		Bactural	Yugoslavia
Hongos	<i>Beauveria bassiana</i>	Biotrol FBB, ABG-6178	EU
		Boverin	URSS
		Boverol, Boverosal	Checoslovaquia
	<i>Hirsutella thompsoni</i>	Mycar	EU
	<i>Metharhizium anisopliae</i>	Biotrol-FMA	EU
		Mataquino	Brasil
		Metarrhizin	URSS
	<i>Verticillium lecanii</i>	Vertelpac, Mycotol	Inglaterra
		Verticillin	URSS
		Verticon	Checoslovaquia
Nemátodos	<i>S. feltiae</i>	Seek, Spear, Neocide, Crop Patrol, Pest patrol	EU

Adaptada de Rodríguez-Monroy, 1991

Tabla 2. Productos comerciales a base de *B. thuringiensis* disponibles en México.

Nombre comercial	Distribuidor
Agree*	Ciba-Giegy
Baxil B.T.	Agrofarma Mexicana
Biobit	Agricultura Tecnificada
Javelin W. G.	Sandoz.
Thuricide	Sandoz.
Dipel (Polvo humectante, granulado y suspensión acuosa)	Abbott

Adaptada de SARH, 1990. *cepa transconjugante



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3. Clasificación de *B. thuringiensis* de acuerdo al Serotipo H.

Antígeno H	Serovariedades	Primera descripción válida	Antígeno H	Serovariedades	Primera descripción válida
1	<i>thuringiensis</i>	Bertmer, 1915; Hempel & Angus, 1958	24	<i>neoleontensis</i>	Rodríguez-Padilla, Galán-Wong, de Barjac, Dubnag, Tamez-Guerra & Rosam Calderon, 1988
2	<i>funisarius</i>	Hempel & Angus, 1958	25	<i>camerunensis</i>	Lee et al. (no publicada)
3a3c	<i>alesti</i>	Toumanoff & Vagn, 1951, Hempel & Angus, 1958	26	<i>nlo</i>	de Barjac & Lecadet (no publicada)
3a3b3c	<i>berstaki</i>	de Barjac & Lemalle, 1970	27	<i>maroccanensis</i>	Rodríguez-Padilla & Galán-Wong, 1988
3a3d	<i>sumitranensis</i>	Ohba & Aizawa, 1989	28	<i>montarrey</i>	(no publicada)
3a3d3e	<i>fukuokaensis</i>	Ohba & Aizawa, 1989	29	<i>unagiensis</i>	(no publicada)
4a4b	<i>otto</i>	Ishiyama, 1905; Hempel & Angus, 1958	30	<i>medellin</i>	Ordaz, Rojas, Correa, Montoya & de Barjac, 1992
4a4c	<i>kenyac</i>	Bonnefoi & de Barjac, 1963	31	<i>oguchini</i>	(no publicada)
5a5b	<i>galleriae</i>	Shvetsova, 1959; de Barjac & Bonnefoi, 1963	32	<i>cameroun</i>	(no publicada)
5a5c	<i>canadensis</i>	de Barjac & Bonnefoi, 1972	33	<i>lucasi</i>	Lee et al. (no publicada)
6	<i>chromocidus</i>	Hempel & Angus, 1958	34	<i>konstanz</i>	Lee et al. (no publicada)
7	<i>azawa</i>	Bonnefoi & de Barjac, 1963	35	<i>seoulensis</i>	Shin (no publicada)
8a8b	<i>morrison</i>	Bonnefoi & de Barjac, 1963	36	<i>malaysiensis</i>	Ho (no publicada)
8a8c	<i>ostriniae</i>	Gutrin, Krtina, Minghui & Xiangzhi, 1975	37	<i>andalousensis</i>	Santiago-Alvarez et al.
8b8d	<i>nigeriensis</i>	Rajagopalan et al. (no publicada)	38	<i>oswaldocruzi</i>	Rabinovitch et al.
9	<i>tolworthi</i>	Norris, 1964, de Barjac & Bonnefoi, 1968	39	<i>brasilensis</i>	Rabinovitch et al.
10	<i>larminskiensis</i>	Krieg, de Barjac & Bonnefoi, 1968	40	<i>huazhongensis</i>	Yu Zhibi
11a11b	<i>toumanoffi</i>	Krieg, 1969	41	<i>sooncheon</i>	Lee H. H. (no publicada)
11a11c	<i>kyushuensis</i>	Ohba and Aizawa, 1979	42	<i>jinghongensis</i>	Rong Sen Li (no publicada)
12	<i>thompsoni</i>	de Barjac & Thompson, 1970	43	<i>guyangensis</i>	Rong Sen Li (no publicada)
13	<i>palmarum</i>	de Barjac, Casuso Dumont, Shaik & Viviani, 1977	44	<i>higo</i>	Ohba (no publicada)
14	<i>israelensis</i>	de Barjac, 1978	45	<i>rochidensis</i>	Himrichsen & Hansen (no publicada)
15	<i>dakota</i>	De Lucca, Simonsen & Larsen, 1979	46	<i>chanpaensis</i>	Chanpaing (no publicada)
16	<i>indiana</i>	De Lucca, Simonsen & Larsen, 1979	47	<i>wratlavensis</i>	Lonc et al. (no publicada)
17	<i>tokokuensis</i>	Ohba, Aizawa & Shimizu, 1981	48	<i>balearica</i>	Caballero et al. (no publicada)
18	<i>kumamotoensis</i>	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981	49	<i>nayu</i>	Seung Hwan Park et al. (no publicada)
19	<i>tochigiensis</i>	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981	50	<i>navarrens</i>	Caballero et al. (no publicada)
20a20b	<i>yunnanensis</i>	Wan-Yu, Qi-Fang, Xue-Ping & You-Wei, 1979	51	<i>xiaguangensis</i>	lan Ping Yao (por publicarse)
20a20c	<i>pondiacheriensis</i>	Rajagopalan et al. (no publicada)	52	Kim	Kim et al., 1996
21	<i>colmen</i>	De Lucca, Palmgren & de Barjac, 1984	53	<i>asturiensis</i>	Santiago-Alvarez et al. (por publicarse)
22	<i>skandogensis</i>	Ying, Jie & Xichang, 1986	54	<i>polomenas</i>	Damgaard et al. (no publicada)
23	<i>japonensis</i>	Ohba & Aizawa, 1986	55	<i>patmaryolensis</i>	Santiago-Alvarez et al. (no publicada)

N.B. Cepa sin movilidad, *waharvensis* (Hubei Institute of Microbiology, 976) De Barjac & Frachon, 90; M.M. Lecadet y col, Instituto Pasteur Paris Francia, 996

Tabla 4. Toxinas producidas por cepas diferentes de *B. thuringiensis*.

Serotipo H	Biotipo	Variiedad	α -exotoxina	β -exotoxina	γ -exotoxina	δ -endotoxina	toxina lábil	toxina soluble	factor ratón
1	I	<i>thuringiensis</i>	+	+		+	+		+
2	II	<i>finitimus</i>	+	-		+		+	+
3	III 1	<i>alesti</i>	+	-		+			
3a, 3b	III 2	<i>kurstaki</i>	+	-		+			
4a, 4b	IV 1	<i>sotto</i>	+	-		+			
4a, 4b	IV 1'	<i>dendrolimus</i>	+	-		+			
4a, 4c	IV 2	<i>kenyae</i>	+	-		+			
5a, 5b	V 1	<i>galleriae</i>	-	+		+			+
5a, 5c	V 2	<i>canadensis</i>	-	+		+			
6	VI	<i>subtoxicus</i>	-	-	+	+			
6	VI'	<i>entomocidus</i>	-	-	+	+			
7	VII	<i>aizawai</i>	+	+		+			
8a, 8b	VIII 1	<i>morrisoni</i>	-	+		+			
8a, 8c	VIII	<i>ostrinae</i>	+	-		+			
9	IX	<i>tolworthi</i>	+	+		+			
10	X	<i>darmstadiensis</i>	-	+		+			
11a, 11b	XI 1	<i>toumanoffi</i>	+	+		+			
11a, 11c	XI 2	<i>kyushuensis</i>	+	-		+			
12	XII	<i>thompsoni</i>	+	-		+			
13	XIII	<i>pakistani</i>	+	-		+			
14	XIV	<i>israelensis</i>	+	-		+			
15	XV	<i>dakota</i>	+			+			
16	XVI	<i>indiana</i>	+			+			
-	-	<i>wuhanensis</i>	-	-		+			
17	XVII	<i>tohokuensis</i>	-						
18	XVIII	<i>kumamotoensis</i>	+	-		+			
19	XIX	<i>tochiensis</i>	+	-		+			

Ref. Faust and Bulla 1982.

Tabla 5. Características y estrategias para seleccionar cepas de *B. thuringiensis*.

No ser tóxico para plantas, animales, humanos e insectos benéficos.

La producción a escala masiva sea fácil a nivel comercial.

Tiempo de almacenaje por un largo período sin afectar su actividad.

Accesibilidad para trasladarlo a cualquier lugar del mundo.

Después de su aplicación en el hábitat natural ser persistente.

La eliminación de insectos blancos que sea eficaz y eficiente.

Los costos de producción se requiere que sean bajos.

Manipulación y estabilidad genética.

La producción en g/l debe de ser alta.

Que la cepa esté libre de fagos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIAL Y METODOS

1.- OBTENCION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Un total de 96 cepas nativas de *B. thuringiensis* obtenidas de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. fueron estudiadas.

2.- MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO

El medio de fermentación estuvo constituido por los siguientes materiales (en g/l) : Harina de soya como fuente de nitrógeno, (15); melaza como fuente de carbono, (20); líquido de remojo de maíz como factor de crecimiento, (10); carbonato de calcio, (CaCO_3) como amortiguador de pH, pH del medio 7.0.

3.- ACTIVACION DE LA CEPA

Las cepas de *B. thuringiensis* se sembraron en tubos con agar nutritivo inclinado, pH 7, se incubaron por 24h a 30°C.

4.- PREPARACION DEL INOCULO

En matraces de 250ml se colocaron 50ml del medio de fermentación ya mencionado y se sembró una asada de cada una de las cepas activadas. Se colocaron en agitación a 200rpm, 30°C por 12h.

5.- FERMENTACION

a) Para lepidópteros :

Se tomó el 1% de inóculo para sembrar en matraces de 500ml con 100ml del medio de fermentación.

b) Para dípteros :

Se tomó el mismo volumen del inóculo (1%) y se colocaron en matraces de 50 ml, con 10ml del medio de fermentación.

Los matraces se mantuvieron en agitación a 200rpm, a temperatura de 30°C, durante 72 horas aproximadamente, se realizaron observaciones microscópicas diariamente para verificar esporulación y formación de cristales, hasta la formación de un 80% de esporulación.

Al terminar la fermentación, los cultivos totales obtenidos, en el caso de dípteros se congelaron hasta la realización de bioensayos preliminares para determinar toxicidad.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

6.- RECUPERACION DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTALS

Una vez terminada la fermentación, en el caso de lepidópteros, se procedió a la extracción del complejo espóra-cristal, mediante el método de coprecipitación lactosa-acetona (Dulmage 1970).

7.- PRUEBAS DE TOXICIDAD PARA LEPIDOPTEROS

El insecto blanco empleado en los bioensayos fué *Trichoplusia ni*.

Se evaluaron los extractos insecticidas mediante el procedimiento descrito por Dulmage (1976), utilizando una dieta modificada de Shorei (tabla 6).

a) Bioensayos preliminares:

Estos se realizaron para seleccionar cepas tóxicas contra *T. ni* usando como factor de selección la dosis de 50µg/ml de dieta. El procedimiento a seguir fué el siguiente:

Se pesaron 250mg del complejo espora-cristal, el cual se aforó en 50ml de agua destilada para formar una solución stock.

Posteriormente se tomó un volúmen de 1.25ml de la solución stock y se agregó a 11.25ml de agua destilada, para obtener una concentración de 50µg/ml. Esta concentración se realizó tomando en cuenta el volumen total al mezclar con 112.5ml de la dieta de Shorei para insectos en cada copa utilizada. De esta forma se agregó la dosis de toxina; la mezcla se vació en copas de plástico, se dejaron reposar por dos horas y posteriormente se infestó cada copa con una larva del primer estadio de *T. ni*, incluyendo 25 copas por cada extracto, por triplicado y como control se emplearon 100 copas con dieta de Shorei sin toxina, por cada 500 copas. Finalmente se tapó cada copa y se incubó por 7 días a 25°C, y humedad relativa del 79-80%, al cabo de los cuales se determinó el porcentaje de mortalidad, (Dulmage, 1976).

b) Determinación de la Concentración Letal (CL₅₀):

A los extractos que presentaron una toxicidad mayor al 50% a la dosis utilizada de 50µg/ml se les realizaron nuevos bioensayos para determinar la CL₅₀, utilizando siete concentraciones en el rango de 50 a 5µg/ml de dieta, con 25 larvas por concentración y por triplicado y 100 larvas como control, registrando el número de larvas vivas y muertas. En todos los bioensayos que se realizaron se utilizó la cepa de referencia GM-10, crecida en el mismo medio de fermentación, para comparar la concentración letal media de nuestras muestras y determinar la potencia de las mismas.

8.- PRUEBAS DE TOXICIDAD PARA DIPTEROS

a) Bioensayo preliminar con cultivo total:

Los cultivos totales obtenidos se descongelaron y se sometieron a bioensayos preliminares contra larvas de *A. aegypti* de tercer estadio tardío o cuarto temprano (OMS, 1982), esto se realizó de la siguiente manera :

- 1) En un vaso de plástico se colocaron 25 larvas del tercer estadio tardío de *A. aegypti*.
- 2) Se llenaron con 148ml de agua destilada, para completar 150ml de volumen de agua.
- 3) Se agregó la cantidad correspondiente del cultivo total, o diluciones de este (10^{-1} , 10^{-2} ó 10^{-3}) en cada vaso, para dar concentraciones finales de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} cada una con tres repeticiones.

4) Se preparó como control cuatro vasos sin toxina, cada uno con 25 larvas.

Después de que se agregaron los microlitros o ml correspondientes de cultivo total, las larvas se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 70-80% de humedad relativa, durante 24 horas, posteriormente se registró la mortalidad.

b) Determinación de la Concentración Letal Media (CL_{50}):

Se seleccionaron aquellos cultivos que presentaron mortalidad entre 10^{-4} a 10^{-7} dilución del cultivo total, se realizaron nuevamente bioensayos pero en este caso usando extracto insecticida con un total de 7 concentraciones en el rango de 1 a 6mg/l con tres repeticiones y 100 larvas como testigo, también se realizaron bioensayos con el estándar IPS-82 contra el mismo insecto de prueba con el fin de determinar su CL_{50} y obtener la potencia de nuestros extractos mediante la siguiente fórmula:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

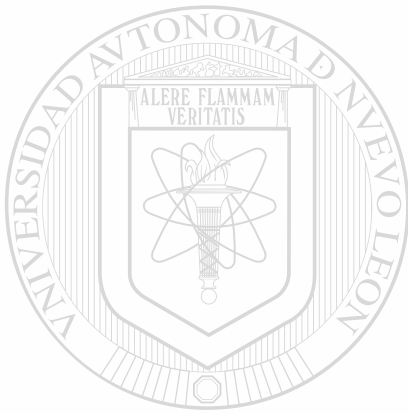
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Potencia desconocida del extracto (UTI) = $\frac{CL_{50} \text{ IPS-82}}{CL_{50} \text{ desconocida del extracto}} \times 15000$

CL_{50} desconocida del extracto

9) ANALISIS DE BIOENSAYOS

A partir de los registros de mortalidad, los datos se sometieron a analisis de varianza de un factor para obtener posibles diferencias entre las cepas y posterior comparación de medias de mortalidad por el método DMS. Mediante el programa computarizado probit se determinó la CL_{50} de nuestros extractos más tóxicos



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 6. Ingredientes de la dieta de Shorei (Dulmage, 1976).

Componentes	(g/l)
Harina de soya	71.1
Germen de Trigo	31.1
Sal Wesson	10.6
Sacarosa	13.6
Ac. sórbico	1
Metil-d-hidroxibenzoato	1.6
Ac. ascórbico	4.26
Agar-agar	15.7
	(ml)
Ac. acético al 25%	12
Formalina al 10 %	4.4
Cloruro de colina al 15 %	7.3
Agua destilada	1,000
Solución vitamínica*	3.5

* pantoteato de calcio, 12 ml; niacina, 6ml; riboflavina 3ml; ácido fólico, 3ml; tiarina, 3ml; piridoxina, 1.5ml; biotina, 0.12ml; vitamina B12, 25ml.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

Los resultados de los bioensayos preliminares contra *T. ni* fueron muy alentadores, ya que obtuvimos mas de 20% de las cepas con una toxicidad mayor al 80%. En la figura 1 se muestra la distribución de frecuencias de mortalidad mostradas por cepas de *B. thuringiensis* nativas de Río Verde, San Luis Potosí, evaluadas contra *T. ni*, en la cual se observa que la mayor frecuencia encontrada fue de 16 cepas, correspondientes al rango entre el 90 y el 100% de mortalidad. En segundo lugar está la representada por 15 cepas, cuya mortalidad se encontró en el rango del 10 al 20%. La frecuencia menor observada fue representada por dos cepas que mostraron una mortalidad entre el 60 y 70%. Solamente una de las cepas, la RV-10-8 mostró 0% de mortalidad hacia larvas de *T. ni*.

Estos resultados de mortalidad mostrados por cepas de *B. thuringiensis* se sometieron a Análisis de Varianza de un factor, en el cual se obtuvieron diferencias estadísticas entre las cepas a nivel de 0.05, mientras que la comparación de medias de mortalidad por DMS, dio como resultado un total de 45 grupos diferentes. Dentro del primer grupo obtenido (grupo A), se encontraron las cepas con mayor toxicidad para lepidópteros, la RV-1-7 y RV-4-34, presentando una mortalidad del 100%; en el grupo AB, se encontraron las cepas RV-3-16, RV-4-42, RV-1-9, RV-4-26 que presentaron un 98% de mortalidad; en el ABC, la cepas RV-2-8 y RV-1-4 presentaron un 97% de mortalidad; en el grupo ABCD, las cepas RV-1-1, RV-4-59, RV-1-12, RV-2-7, RV-11-2,

RV-1-13, RV-10-4 presentaron de un 92 a un 96% y en el ABCDE, la cepa RV-1-13 mostró un 90% de mortalidad. Dentro del grupo BCDE, la mortalidad obtenida fue de un 89% presentada por las cepas RV-13-1 y RV-1-20; en el grupo CDEF se obtuvo una mortalidad del 88% para la cepa RV-1-24; en el grupo DEF, hubo un 84% cepa RV-1-25 y en el grupo EFG se obtuvo una mortalidad del 81% para las cepas RV-3-1 y RV-10-9. Las cepas restantes presentaron mortalidades por debajo del 80% y se distinguieron en los 36 siguientes grupos, (tabla 7).

En la tabla 8 se muestran las primeras 10 cepas de *B. thuringiensis* que presentaron elevada toxicidad contra *T. ni* y su forma de cristal; cabe mencionar que las 2 cepas que presentaron el 100% de mortalidad formaban cristales bipiramidales y cuadrados, al igual que casi el resto de las primeras 10 cepas mas tóxicas, solo 2 de las cepas mencionadas presentaron cristales bipiramidales únicamente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 7. Comparación de medias de mortalidad de cepas de *B. thuringiensis* bioensayadas contra *T. ni* a concentración de 50µg/ml de dieta.

CEPA	GRUPO ESTADÍSTICO	% DE MORTALIDAD	CEPA	GRUPO ESTADÍSTICO	% DE MORTALIDAD	CEPA	GRUPO ESTADÍSTICO	% DE MORTALIDAD
RV-434 RV-1-7	A	100	RV-1-22	KLM	44	RV-14-5 RV-4-39 RV-4-21 RV-1-8 RV-2-15	W	20
RV-3-16 RV-4-42 RV-1-9 RV-4-26	AB	98	RV-1-28 RV-3-10 RV-4-35	KLMN	42	RV-4-7 RV-13-3	WX	18
RV-2-8 RV-1-4	ABC	97	RV-4-11	KLMNO	41	RV-3-2 RV-2-5	WXY	17
RV-1-1 RV-4-39 RV-1-12 RV-2-7 RV-11-2 RV-1-1B RV-10-4	ABCD	92-96	RV-5-18 RV-1-29	KLMNOP	40	RV-4-60 RV-4-40 RV-5-7	WXYZ	14-16
RV-1-3	ABCDE	90	RV-4-45 RV-1-16	KLMNOPQ	38	RV-5-5	WXYZa	13
RV-13-1 RV-1-20	BCDE	89	RV-3-3 RV-4-13	LMNOPQR	36	RV-1-17	WXYZab	12
RV-1-24	CDEF	88	RV-4-56 RV-2-1	MNOPQRS	34	RV-10-6	XYZabc	10
RV-1-25	DEF	84	RV-4-8 RV-2-4 RV-4-44	NOPQRST	33	RV-5-23 RV-2-6 RV-10-5	YZabc	9
RV-3-1 RV-10-9	EFG	81	RV-4-57 RV-1-21 RV-1-19	OPQRSTU	32	RV-3-6 RV-10-10 RV-3-12	Zabcd	8
RV-11-7	FG	78	RV-1-2	PQRSTUV	30	RV-1-34 RV-3-5 RV-3-15	abcd	5
RV-11-5 RV-1-30 RV-1-11	G	74-76	RV-10-3	QRSTUVWXYZ	29	RV-5-3	bcd	4
RV-1-26 RV-10-2	H	60-62	RV2-14 RV-5-9	RSTUVW	28	RV-3-9	cd	2
RV-1-31	HI	56	RV-1-6 RV-3-13	STUVW	25	RV-10-8	d	0
RV-1-10 RV-4-56 RV-5-19	HIJ	54	RV-15-1	TUVW	24			
RV-1-32 RV-2-12 RV-10-1	JK	48	RV-1-15	UVW	22			
RV-5-26 RV-1-18 RV-13-2 RV-11-6	JKL	45	RV-1-14 RV-4-2 RV-1-5	VW	21			

Letras diferentes indica que son estadísticamente distintas.

Tabla 8. Cepas de *B. thuringiensis* mas tóxicas encontradas contra *T. ni* probadas a concentración de 50µg/ml y tipo de cristal presentado.

Cepa	Forma de cristal	% de mortalidad
RV-4-34	Bipiramidal y cuadrado	100
RV-1-7	Bipiramidal y cuadrado	100
RV-3-16	Bipiramidal y cuadrado	98
RV-4-42	Bipiramidal y cuadrado	98
RV-1-9	Bipiramidal y cuadrado	98
RV-4-26	Bipiramidal y cuadrado	98
RV-2-8	Bipiramidal y cuadrado	97
RV-1-4	Bipiramidal	97
RV-1-1	Bipiramidal	96
RV-4-59	Bipiramidal y cuadrado	94

Solo se muestran resultado obtenidos de las 10 primeras cepas de *B. thuringiensis* que presentaron mayor mortalidad (de un total de 96 cepas). Resultado de 3 repeticiones.

En la tabla 9 se muestra la toxicidad comparativa de cepas de *B. thuringiensis* que resultaron altamente tóxicas contra *T. ni* y la mostrada por *B. thuringiensis* cepa GM-10. Los valores de CL_{50} presentada por las cepas RV-1-7 y RV-4-34 estudiadas fue similar a la toxicidad presentada por una de las cepas más tóxicas de nuestro laboratorio (GM-10).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 9. Toxicidad comparativa de cepas de *B. thuringiensis* bioensayadas contra *T. ni* que resultaron altamente tóxicas y la mostrada por *B. thuringiensis* GM-10.

Cepa	µg/ml de dieta	% de mortalidad ^a	CL_{50} µg/ml de dieta
RV-1-7	50	100	7.9
RV-4-34	50	100	8.3
GM-10	50	100	*8.4

a: promedio de 3 repeticiones

*Monsiváis, 1997.

Por otra parte estas cepas de *B. thuringiensis* probadas contra *A. aegypti* en bioensayos preliminares, presentaron mortalidades entre 0 y 30% a dilución 10^{-4} valores muy por debajo de las consideradas altamente tóxicas comparando con resultados de cepas estudiadas en el laboratorio que presentaron una mortalidad de 42% pero a una dilución de 10^{-6} (Maldonado Blanco,1994), únicamente la cepa RV-1-8 que presentó mortalidad de 66% y cuya forma de cristal es bipiramidal y redondeado y la cepa RV-4-8, presentó un 63% de mortalidad y su forma de cristal es cuadrado (dilución 10^{-4}) (tabla 12). La CL_{50} de ambas cepas fue mayor en comparación con la CL_{50} del estándar, lo que indica mucho menor toxicidad. Se muestra la potencia de las cepas más tóxicas y la del estándar IPS-82, en la cual se observa que nuestras potencias son muy bajas comparadas con la del estándar (tabla 10).

Tabla 10. Cepas de *B. thuringiensis*, bioensayadas que presentaron toxicidad hacia larvas de *A. aegypti* y su forma de cristal.

Cepa	% de mortalidad	CL_{50} *	Forma de cristal	Potencia (UTI/mg)
RV-1-8	66	4.5050	Bipiramidal y redondeado	30,096
RV-4-8	63	2.6376	Cuadrado	52,888
IPS-82	100	0.0093		15,000

Resultado de tres repeticiones

En la tabla 11 se muestran las cepas de *B. thuringiensis* que presentaron mayor toxicidad hacia lepidópteros y/o dípteros, la mayoría de ellas presentó cristal bipiramidal a excepción de la RV-4-8, que posee solamente cristal cuadrado.

Tabla 11. Cepas de *B. thuringiensis* que presentaron actividad dual hacia lepidópteros y dípteros, y su forma de cristal

Cepas	Tipo de cristal	% de mortalidad	
		Lepidopteros (<i>T. ni</i>) ^A	Dípteros (<i>A. aegypti</i>) ^B
RV-4-34	Bipiramidal y cuadrado	100	10
RV-1-7	Bipiramidal y cuadrado	100	10
RV-3-16	Bipiramidal y cuadrado	98	20
RV-1-9	Bipiramidal y cuadrado	98	15
RV-4-42	Bipiramidal y cuadrado	98	5
RV-4-26	Bipiramidal y cuadrado	98	0
RV-4-8	Cuadrado	33	63
RV-1-8	Bipiramidal y redondo	20	66

A: Probadas a 50µg/ml

B: Ensayadas a 10⁴ dilución de cultivo total

En la tabla 12 se muestran los resultados de mortalidad hacia *A. aegypti* mostrados por cepas de *B. thuringiensis* en la cual podemos observar que la mayoría de las cepas presentaron mortalidades bajas (hasta el 33%), la cepa RV-13-1 presentó valores de 46.6% y solamente la RV-4-8 y la RV-1-8 mostraron un 63 y 66% respectivamente, a la dilución 10^{-4} de cultivo total.

Tabla 12. Cepas de *Bacillus thuringiensis* bicensayadas contra *A. aegypti* a dilución 10^{-4} de cultivo total

Cepa	% de mortalidad*
RV-3-9	
RV-3-6	0
RV-2-4	
RV-4-2	
RV-3-1	
RV-10-5	
RV-1-30	
RV-5-26	
RV-5-18	
RV-3-12	
RV-4-26	
RV-3-2	
RV-5-3	3.3
RV-1-9	
RV-2-1	
RV-5-5	
RV-14-5	
RV-5-23	
RV-2-15	
RV-4-56	
RV-5-19	
RV-1-7	
RV-2-4	6.6
RV-3-5	
RV-2-7	
RV-3-16	
RV-3-10	
RV-1-16	
RV-1-34	
RV-4-34	
RV-1-19	10
RV-1-20	
RV-2-6	13.3
RV-10-6	
RV-3-4	
RV-4-42	16.6
RV-4-57	
RV-3-3	20
RV-3-13	23.3
RV-4-59	
RV-6-8	33.3
RV-13-3	
RV-13-1	46.6
RV-4-8	63.3
RV-1-8	66.6

Procedió de tres repeticiones

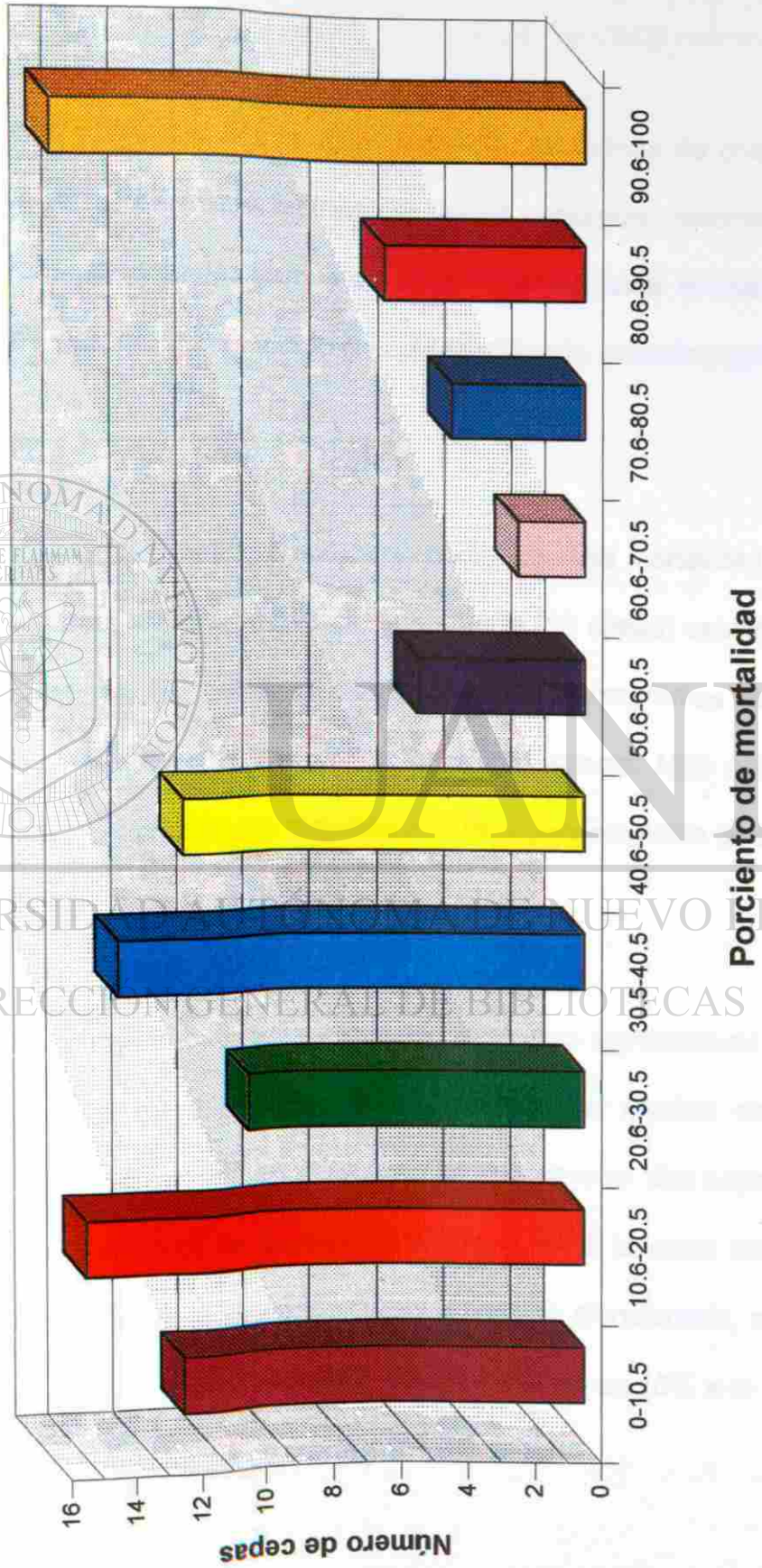
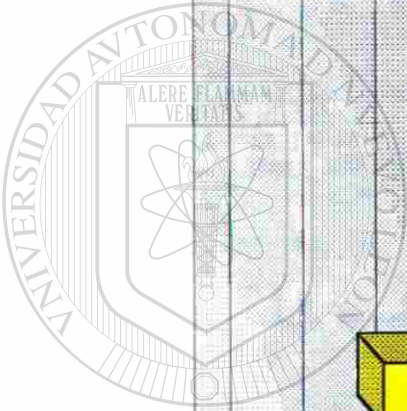


Figura 1. Distribución de frecuencias de mortalidad mostradas por cepas de *B. thuringiensis* probadas contra *T. ni* a concentración de 50 µg/ml de dieta



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las cepas aisladas mostraron una amplia diversidad de formas de cristal; variando desde la clásica forma de cristal bipiramidal, hasta cuadrada, redondeada, y otras amorfas; la mayoría presentó dos formas de cristal. Por otra parte el total de las cepas formaron cristales y esporas en el medio de cultivo utilizado, aproximadamente en 72h.

Los extractos insecticidas probados mostraron porcentajes de mortalidad variables en *T. ni*. Sin embargo, la más alta frecuencia encontrada (16 cepas) estuvo en el rango mayor de mortalidad que fué del 90 al 100%; también encontramos solamente una cepa que mostró 0% de mortalidad contra el mismo insecto. Más del 30% de las cepas (22) presentaron mortalidades mayores al 80% a concentración de 50µg/ml y los restantes (74 cepas variaron entre 0-80%).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El análisis de varianza para un factor estableció diferencias significativas de toxicidad entre las cepas y los resultados de la comparación de medias de mortalidad determinaron que hubo 45 grupos, en el primero se encontraron dos cepas, RV-1-7 y RV-4-34 que registraron 100% de mortalidad contra *T. ni* a la dosis establecida de 50µg/ml de dieta y fueron las más tóxicas para el insecto mencionado, mientras que para *A. aegypti* también mostraron toxicidad, aunque solo de un 10% a la dilución 10⁻⁴ de cultivo total, que fué la mas alta concentración probada.

La mayoría de las cepas presentaron actividad dual, aunque las cepas altamente tóxicas para lepidópteros, en el caso de dípteros su toxicidad fué muy baja, y las cepas más tóxicas para dípteros presentaron también toxicidad baja para lepidópteros. Además una característica que todas las cepas presentaron es el cristal de forma bipiramidal a excepción de la RV-4-8, que presenta cristal de forma cuadrada.

Las cepas más tóxicas para dípteros RV-4-8 y RV-1-8 mostraron también toxicidad contra *T. ni* de un 20 a un 30% de mortalidad. Esto pudiera hacernos pensar que las proteínas producidas por estas cepas sean del tipo Cry2Aa que tiene actividad dual para lepidópteros y dípteros. Para comprobar esto lo indicado es caracterizar las proteínas de estas cepas, así como los genes que las producen.

Las CL_{50} de los dos extractos más tóxicos para *T. ni* fueron comparados con el extracto obtenido de la cepa de *B. thuringiensis* GM-10, cultivada en las mismas condiciones que las cepas probadas. Las cepas RV-1-7 y RV-4-34 mostraron CL_{50} de 7.9 y 8.3 $\mu\text{g}/\text{m}$ de dieta respectivamente, similar a la cepa GM-10 que presentó 8.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dieta.

En el caso de las cepas mas tóxicas encontradas para dípteros (RV-4-8 y RV-1-8) la mortalidad registrada (63 y 66% respectivamente) con 10^{-4} dilución de cultivo total indica que a esta concentración la toxicidad mostrada es bastante baja, ya que los valores de la CL_{50} fueron de 4.5 y 2.6 mg/l , para las cepas RV-1-8 y RV-4-8 respectivamente, cerca de 100 veces más baja que otras cepas probadas en nuestro

laboratorio previamente, que mostraron CL_{50} de 0.0317mg/l (Maldonado Blanco y col. 1998).

El porcentaje de aislados obtenidos con toxicidad solo contra las larvas de lepidópteros fué de 11%, solo contra dípteros no se encontraron y contra ambos (lepidópteros y dípteros) fué de 89%; de éstos, un 32% de los aislados mostró toxicidad mayor al 80% contra *T. ni* a la dosis probada; por otra parte la toxicidad contra dípteros fue baja, con solo unas pocas cepas mostrando mortalidades entre 30 y 60% a altas concentraciones del cultivo total.

En conclusion, se obtuvieron dos cepas nativas de *B. thuringiensis* altamente tóxicas para *T. ni* y dos cepas con baja toxicidad para larvas de *A. aegypti*, las cuales podrían ser probadas contra otras especies de insectos así como caracterizarlas en cuanto a sus proteínas tóxicas y los genes que las producen.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

- Aizawai, K.** 1971. Strain improvement and preservation of virulence of pathogen. En. Microbial control of insect and mites, Burges D. y H. Hussey (ed.), Academic, Press, London. pp 655-672.
- Aizawai, K., N. Fujiyoshi y N. Ohba.** 1974. Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* strain for microbial control. 1st. Intersectional Congress of the International Association on Microbiological Societies, Tokyo, Japon.
- Aizawai, K. N; M. Fujiyoshi; Ohba Yoshikawa.** 1975. Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* for microbial control. Proceeding of Intersectional Congress of IAMS. Tokio. 2:597-606.
- Alexander, M.** 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. 2a. Edición. Editorial Editro. México, D.F. pp 211-217.
- Aronson, A. L; W. Beckman, y P. Dunn.** 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol Rev. 50:1-24.
- Aronson, A. L; H. McGaughney y D. Johnson.** 1992. The solubility of inclusions proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and a factor in toxicity to insects. Appl. Environm. Microbiol. 57:981-986.
- Basu D; S. Das; K. Bandyopadhyay, y S. K. Sen.** 1991. Isolation and cloning of *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* HD73 toxin gene and construction of a chimaeric gene for expression in plants. Indian J. Exp. Biol. 29:1002-1009.
- Baumann, P; M. A. Clark, L. Baumann y A. H. Broadwell.** 1991. *Bacillus sphaericus*® as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxin. Microbiol. Rev. 55:425-436.
- Bone, L. W; K. P. Botjer y S. S. Gil.** 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: Egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. Exp. Parasitol. 60:314-322.
- Brock, D.T.** 1993. Microbiología. 6a edición. Editorial Hispanoamericana. México, D.F. pp. 322-841.
- Buchner, G. E.** 1960. Potencial bacterial pathogens of insects and their characteristics. J. Insect. Pathol. 2:172-195.
- Burges, H. D.** 1969. Control of insects by *Bacillus thuringiensis*. Proc. 5th. Br. Insectic Fungic. Conf. Pp. 405-411.

- Burges, H. D. 1986.** Impact of *Bacillus thuringiensis* on pest control with emphasis on genetic manipulation. *J. Mircen.* 2:101-120.
- Cantwell, E.G. 1982.** Activity of a Thermostable Exotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* in the *Salmonella*/Microsomal Assay for the Bacterial Mutagenicity. *J. Invertebr. Pathol.* 40:350-358.
- Cantwell, E.G; A. M. Heimpel; y M. J. Thompson. 1964.** The production of an exotoxin by various crystal forming bacterial related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol.* 6: 466-480.
- Carter, L. J. 1971.** Use of bacteria for microbial control. En: *Microbial control of insects and mites.* Burges, H. D. And N. W. Hussey (ed.) Academic Press, N.Y.
- Castro, A.J. 1982.** Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-1 y GM-2 en *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* (Lepidóptera: *Noctuidae*). Tesis Inédita de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, N.L. México.
- Cate, J. 1990.** Biological control of pests and diseases: integrating a diverse heritage. En: *New Directions in Biological Control: Alternatives for Supressing of Agricultural Pests and Diseases,* Ralph R. Baker y Peter E. Dunn, ed. pp.23-43.
- Chang, J. H; J. Y Roh; Y. H. Je; H. W. Park; B. R. Jin; S. D. Woo; S. K. Kang. 1998.** Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding delta-endotoxin CryIe. *Appl. Microbiol.* 26:387-390.
- Couch, T.L. y R. Ross. 1980.** Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. And Bioeng.* 22:1297.
- Davidson, E. W. y P. Myers. 1981.** *Fems Microbiol. Lett.* 10:261-265.
- Deacon, J. W. 1983.** Microbial control of plant pest and diseases. *Aspects of Microbiology.* Amer. Soc. For Microbiology Washington, U.S.A.
- De Barjac, H. 1989.** New Facts and trends in bacteriological control of mosquitoes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 84: 101-105.
- De Barjac , H. y A. Bonnefoi. 1968.** A classification strains of *Bacillus thuringiensis* with a key to their differentiation. *J. Invertebr Pathol.* 11:347-355.
- De Barjac, H. y M. M. Lecadet. 1976.** Dosage Bioquimique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN polymerases bacteriennes (Note) C.R. Acad. Sc. Paris.

- De Barjac, H. y E. Franchon. 1978.** Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. R. Acad. Sc. Paris. T. 268, D: 797-800.
- De Barjac, H. y E. Franchon. 1990.** Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga. 35:233-240
- De la Garza, L. S. 1984.** *Bacillus thuringiensis* como agente de control microbiológico de insectos plagas. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México. (Tesis inédita).
- Donovan, W. P; C. C. Dankocsik; M. P. Gilbert; M. C. Gawron Burke; R. G. Groat y B. C. Carlton. 1988.** Amino acid sequence and entomocidal activity on the P2 crystal protein: an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. 263:561-567.
- Donovan, W. P; J. M. González; M. P. Gilbert y C. Dankocsik. 1989.** Amino acid sequence and entomocidal activity of the crystal protein. J. Biol. Chem. 264-274.
- Dulmage, H. T. 1970.** Production of the spore δ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 16:385-389.
- Dulmage, H. T. 1971.** Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 18:353-358.
- Dulmage, H. T. 1981.** Production of bacteria for biological control of insects. En: Biological control of crop production, G.C. Papavizaz (ed.), Beltsville Symposia in Agricultural Research Allanheld, Osmum and Co Totowa, N.J. pp. 5-129.
- Dulmage, H. T. 1989.** Production and use of *Bacillus thuringiensis* perspective from, 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Supl. III. 84:113-121.
- Dulmage, H. T; J. A. Correa y A. J. Martínez. 1970.** Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-cristal complex of *Bacillus thuringiensis* J. Invertebr. Pathol. 15:15-20.
- Dulmage H. T. y Rodes. 1971.** Production of pathogens in artificial medium. En: Microbial control of insects and mites. Burges, H.D. And N.W. Hussey. Ed. Acad. Press.
- Dulmage, H. T; A. J. Martínez y T. Peña. 1976.** Bioassay *Bacillus thuringiensis* (Berliner) δ -endotoxin using the tobacco budworm. Technical Bulletin No. 1528. Agricultural Research Service. U.S. Department of Agriculture in cooperation with Texas Agricultural Experimental Station. Bronswille, Texas, USA. Pp 1-14.
- Dulmage, H. T. y Orlin. 1977.** A proposed standarized bioassay formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. J. Invertebr. Pathol. 18:240-245.

- Ellar, D. J.** 1994. Molecular genetics of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxina and toxin receptors. The 11nd. International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 august 2 september, proceedings. I:10-15.
- Falcon, L. A.** 1971. Use of bacteria for microbial control. In: Microbial control of insects and mites, Burges H.D. Y N. W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N.Y.
- Faust, E. C; P. F. Rusell, y R. C. Jung.** 1974. Parasitología Clínica. Reimpresión 1979. Salvat (Eds.), S. A. Mallorca, España. Pp. 888.
- Faust, R. M. y L. A. Bulla.** 1982. Bacterial and their toxins as insecticides microbial and viral pesticides. De. Edward Kurstak. Marcel Dekker, New York, N.Y. 3:75-206.
- Feitelson, J. S; T. C. Quick y F. Gaertner.** 1990. Alternative hosts for *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins genes. En: New Directions in Biological Control: Alternatives for Supressing of Agricultural Pests and Diseases, Ralph R. Baker y Peter E. Dunn. Editores. pp. 561-571.
- Feitelson, J. S; J. Payne, y L. Kim.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Bio/technology. 10:271-275.
- Galán, W. L. y C. Rodríguez.** 1989. Bioinsecticidas, Microbiología Industrial para su producción. Información Científica y Tecnológica. 11:44-47.
- Galán, W. L.** 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*. Tesis Inédita (Doctorado). Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- Galán, W. L; C. Rodríguez y H. Luna.** 1996. Avances recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 15-55.
- Galán, W. L; L. Damas; P. Tamez; C. Rodríguez; B. Pereyra; R. Tamez; H. Medrano; A. G. Guerra y E. King.** 1996. Retrospective View of he Dr. Howard T. Dulmage Contributions to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Research. J. Entomol.
- García, R; B. Des Rochers y W. Tozer.** 1981. Studies of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito larvae and other organisms. Proc. Calif. Mosq. Vector. Contr. Assoc. 49:25-29.
- García, R, B. Des Rochers, W. Tozer y J. Menamara.** 1993. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) var. *israelensis* for mosquito control. Proceedings and Papers of the fifty first Ann. Conf. Of Calif. Mosq. And Vec. Cont. Assoc. Pp. 25-29.
- Gill, S. S; Cowles, E. A; Francis, V.** 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry Iac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol Chem. 270:2727-82.

Goldberg, L. y J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News. 37:355-358.

Goldberg, L.; B. Sneh; E. Battat y D. Klein. 1980. Optimization of medium for high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. Biotechnol. Lett. 2:419-426.

Guillet, P. J. Dempah y J. Coz. 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l.iii. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale. Rapport ORSTOM No. 7. Pp. 1-10.

Hannay, C. L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. Nature. 127:1004.

Hannay, C. L. y P. Fitz-James. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. Berliner Canadian. J. Microbiol. 1:694-710.

Heimpel, A. M. y T. A. Angus. 1958. The site action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. J. Insect Pathol. 1:152-170.

Heitefus, R. 1989. Consequences of the use of chemical plant protection agents. En: Crop and plant protection: the practical foundations, capítulo 7; pp. 191-216.

Henry, J. E. 1971. Experimental application of *Nosema locustae* for control of grasshoppers. J. Invertebr Pathol. 18:389-394.

Höfte, W. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Reviews. 53: 242-255.

Honeé, G. J. E. M; T. P. M. Vander; L. Visser. 1988. Nucleotide sequence of a crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subs. *Pentomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. Nucleic acids res. 16:6240-6240.

Ignoffo, C. M. y W. F. Hink. 1971. Propagation of arthropod pathogens in living systems En: Microbial control of insects and mites. Burges, H.D., N. W. Hussey (eds.) Academic Press. New York.

Johanson, E. Donovan. 1978. Inhibition of RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by beta exotoxin. Can. J. Microbiology. 24:537-543.

- Johnson, C; A. H. Bishop y C. L. Turner. 1998.** Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). *J. of Invertebr. Pathol.* 71:138-144.
- Kawalek, M. D; Benjamin, S; Lee H. L; Gill, S.S. 1995.** Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2965-2969.
- Kidd, G. 1994.** The *Bt* working group really does work. *Bio/technology.* 12:577.
- Knoweles, B. H. y D. J. Ellar. 1987.** Colloid-osmotic lysis a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta* 924:509-518.
- Krieg, V. A. 1969.** In Vitro determination of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* and related bacilli. *J. Invertebr. Pathol.* 15:313-320.
- Krieg, A. 1981.** The genus *Bacillus*. *Insect Pathogens.* In: *The Prokaryotes.* De. Springer. Verlag. II, sect. S. Chap. 136:1743-1755.
- Krieg, U. A; A. M. Huger, G. A. Langenbrunch y W. Schnetter. 1983.** *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: A new pathology effective against larvae of coleoptera. *J. Apl. Entomol.* 96:500-508.
- Lambert, B. H. y K. Höfte. 1992.** *Bacillus thuringiensis* Insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2536-2542.
- Lambert, B. y M. Pferoen. 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Science.* 42:112-122.
- Lecadet, M. M. 1970.** *Bacillus thuringiensis* toxins. The proteinaceous crystal. En T.C. Montie, S. Kades and S.J. Ajl (Eds), *Microbial Toxins* vol. 2 Academic Press. New York. Pp 437-471.
- Lecadet, M. y H. De Barjac. 1975.** *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin. *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases.* Davidson De. Chapter 11.
- Lorence, Q. A. 1996.** 1. Biopesticidas. Cuadernos de Vigilancia Biotecnológica. J. Soleiro y R. Castañón, (eds). CAMBIOTECH, México, D.F. Pp. 72.
- Lorence, Q. A. y R. R. Quintero. 1996.** Mecanismo Molecular de Acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Avances Recientes en la Biotecnología en Bacillus thuringiensis.* L. Galán, C. Rodríguez, H. Luna (eds). UANL. Monterrey, N. L. México. pp. 63-94.
- Lüthy, P. 1980.** Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Federation of European Microbiological Societies (FEEMS) Microbiol. Lett.* 8:1-7

Lüthy, P. y H. R. Ebersold. 1981. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Pharmacother pergamon press. Great Britain. 13:257-283.

Maldonado, Blanco, M. G. 1994. Desarrollo de un medio de Cultivo a base de Subproductos Agroindustriales para la producción de δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14. Tesis Inédita (Maestría). Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N. L. México.

Medrano, R. H; S. A. Solis; A. Casillas; G. C. García; C. U. Granados; C. Rodríguez; y L. Galán. 1987. Production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. HD-1 at pilot plant level and its use on insect pest maize. 4th European Congress o Biotechnology. pp.14-19. Amsterdam, The Nettherlands.

Memorias del V Curso de Control Biológico. 1994. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Pp. 2-77.

Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1982. Insectos destructivos e insectos útiles: su costumbre y su control. 15a. Edición. Editorial Continental. México, D.F. Pp.670-749.

Monsiváis, Lara, D. 1997. Uso de la harina de camarón como sustituto de harina de soya en la producción de *Bacillus thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10. Tesis inédita (Licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.

Morris, O. N; V. Converse, P. Kanagaratnam, J. C. Cote. 1998. Isolation characterization, and culture of *Bacillus thuringiensis* from soil and dust from grain storage bins and their toxicity for *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). Can Entomol. 130: 515-537.

Nordlung, D. A. 1984. Biological control with entomophagous insects, J. Ga. Entomol. Soc. 19:14-27.

Norris, J. R. 1978. Microbial control of pest insects. En: Companion to Microbiology, Bull and Meadow (eds.) Longmang. pp:459-480.

Ohba, M. y K.Aizawa. 1989. New flagelar (H) Antigenic Subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 with description of two new subspecies, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Sumiyoshiensis* (H serotype 3a:3d) and *Bacillus thuringiensis fukuokaensis* (H serotype 3a:3d:3e). J. Invertebr. Pathol. 54:208-212.

Olvera, Carranza C. 1992. Toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith) y *Spodoptera exigua*. Tesis Inédita (Licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.

Ortega, J; F. Espinoza y L. López. 1994. El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México. Salud Pública de México. 36(6): 624-632.

Pelczar, Reid, Chan. 1981. Microbiología. 2a. Edición. Editorial McGraw-Hill Book, Madrid, España. Pp.219-229.

Pendleton, Y. R. 1969. Insecticides of crystal forming bacteria. Process Biochem. Pp. 29-32.

Pérez O. C; M. L. Rodríguez y L. J. Galán. 1985. Efecto de tres extractos de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* var. *quinquefasciatus* say (Diptera:Culicidae) en condiciones de laboratorio. Folia Entomológica Mexicana. 63:75-81.

Porter, A. G, E. W. Davidson, y J. W. Liu. 1993. Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiol Rev. 57:838-861.

Rady, M. H; T. A. Younis. Isolation and curing of plasmid DNA from *Bacillus thuringiensis israelensis* strains showing variable insecticidal activities. J. Egypt Soc Parasitol (EGYPT). 26:423-432.

Reardon, R. C; 1990. Use of microbials for control of defoliating insects of broadleaved trees. Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaide, Australia. Pp. 169.

Rodríguez-Monroy, M. M. De la Torre y E. De Urquijo-Niembro. 1991. *Bacillus thuringiensis*. Características Biológicas y perspectivas de producción. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 33:279-292.

Rodríguez-Tovar M. L; L. Galán; C. Rodríguez; R. Tamez. 1987. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para mosquitos culicidos. Departamento de Zoología de Invertebrados y Departamento de Microbiología e Inmunología. Fac. De Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L. México. 66400.

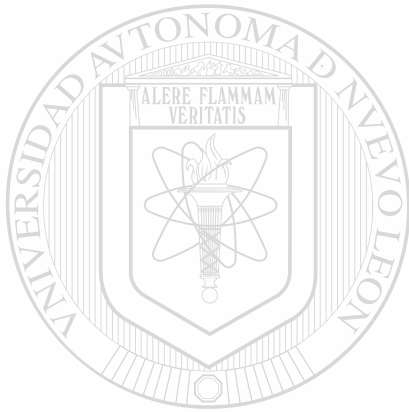
Rodríguez-Tovar, M. L. 1994. Diseño y evaluación de formulados de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en laboratorio y campo en *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) y *Aedes aegypti* (Linnaeus). Tesis inédita. Fac. de Ciencias Biológicas. U.A.N.L., Monterrey, N. L. México.

Rodríguez-Padilla. C; E. Román; R. Tamez. 1996. Clasificación de *Bacillus thuringiensis*. En: Avances Recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. L. Galán, C. Rodríguez, H. Luna. (eds). U.A.N.L. Monterrey, México. pp. 51-61.

Rowe, G. E. y A. Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. VCR Crit. Rev. Biotechnol. Boca Raton Florida. 6:87-127.

Service, M. W. (Ed.) 1986. Blood-sucking insects: vectors of disease. Edward Arnold. London.

- Sifuentes, J. A. 1978.** Plagas del Maíz de México, algunas consideraciones sobre su control. Folleto de divulgación No. 58. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de México.
- Smith, G; Merrick, E. Bone y D. Ellar. 1996.** Mosquitocidal activity of the CryIC delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Appl. Environ. Microbiol. 62(2):680-684.
- Smith, R. A. 1982.** Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Can. J. Microbiol. 28:1089-1092.
- Soper, R. S; y D. M. LacLeod. 1981.** Descriptive epizootiology of an aphid mycosis. U. S. Dept. Agruc. Tech. Bull. 1634:1-17.
- Sprenkel, R. K; W. M. Brooks, J. M. Van Duyn, & L.L. Dietz. 1979.** The effects of three cultural variables on the incidence of *Nomuraea rileyi* phytophagous lepidoptera, and their predators on soybeans. Environ. Entomol. 8:334-339.
- Stairs, G. R. 1971.** Use of viruses for microbial control of insects. En: Microbial control of insects and mites. Burges, H. D. Y N. W. Hussey (Eds.), Academic Press. New York, N.Y.
- Steinkraus, D. C. 1990.** Control of vector by the entomophthorales: Current status and future challenges. Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaida, Australia. Pp. 97.101.
- Stanier R. Y; E. A. Adelberg y J. L. Ingraham. 1986.** Microbiología, versión española, 4a. Edición, editorial Repla. México, D.F. Pp. 621-817.
- Thompson, M. 1992.** Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent. Application number: 91305048.0. Publication number:04617799A3.
- Valenzuela, L. E. 1987.** Microorganismos entomopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Vandekar, M. y H. T. Dulmage. 1983.** Guidelines for production of *B. thuringiensis* H-14. UNDP/World Bank/W.H.O. Geneva, Switzerland.
- Young, T. K. y Huang, H. T. 1970.** The beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol 15:100-108.



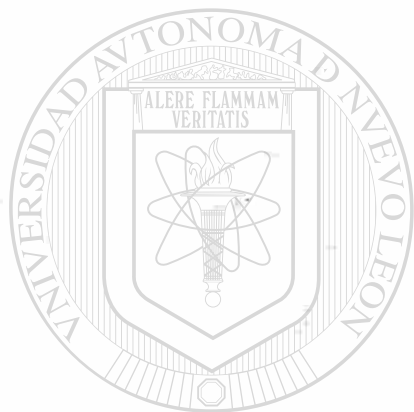
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®