

**Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Sanidad Vegetal**

Trabajo de Diploma

**Evaluación de medios de cultivo para la producción de
esporas y cristales de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki**

Diplomante: Maritza Martínez Mercado

Asesor: Falguni Guharay

Managua

Mayo, 1990

**Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Sanidad Vegetal**

Trabajo de Diploma

**Evaluación de medios de cultivo para la producción de
esporas y cristales de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki**

Diplomante: Maritza Martínez Mercado

Asesor: Falguni Guharay

**Presentado a la consideración del Honorable Tribunal Examinador
como requisito final para optar al grado de Ingeniero Agrónomo**

Dirección de Investigación y Post-grado (DIP)

Managua

Mayo, 1990

DEDICATORIA

A la memoria de todos los Héroes y Mártires que entregaron sus vidas por tener una patria libre y en paz.

A mi Madre Martha C. Mercado de Martínez máxima expresión de amor y cariño en mi vida.

Con especial cariño a mi hermana Bertha, principal artífice de mi obra como profesional.

A mi amiga Rosibel Varela.

A todos mis amigos.

AGRADECIMIENTO

Quiero dejar memoria de mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones.

A mi asesor Dr. Falguni Guharay, quien con su excelente asesoría y espíritu de solidaridad contribuyó a que este trabajo llegará a su término.

Al Centro Nacional de Protección Vegetal donde se ejecutó este trabajo.

Al personal del laboratorio de **Bacillus thuringiensis** del Centro Nacional de Protección Vegetal.

De manera muy especial al Ing. Gregorio Varela Ochoa e Ing. Isabel Rivas Chavarria por todo el apoyo prestado para la finalización de este trabajo.

Al Organismo Aleman GTZ por su apoyo.

A mi pueblo Revolucionario que me brindó la oportunidad de prepararme para servirle mejor a la Revolución.

CONTENIDO

sección	página
I. LISTA DE CUADROS	I
II. LISTA DE FIGURAS.....	I
III. RESUMEN.....	II
IV. INTRODUCCION.....	1
IV. MATERIALES Y METODOS.....	8
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	14
1.- Evaluación de medio base nacional en comparación con el medio M-25.....	14
2.- Evaluación de medio base nacional en comparación con el medio balanceado.....	19
VI.- CONCLUSIONES.....	25
VII.- RECOMENDACIONES.....	26
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	27

RESUMEN

Con el fin de conocer el crecimiento, rendimiento y toxicidad de *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki 3a3b producida en diferentes medios de cultivos se llevaron a cabo fermentaciones en frascos erlenmeyer utilizando el medio M-25, el medio base nacional y el medio base balanceado. Además se evaluaron estos medios después de ser sometidos a un proceso de hidrolisis. Aunque no son óptimos, los medios probados en este estudio, se pueden considerar adecuados para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y producción de las esporas y cristales. La deficiencia de azúcares reductores en el medio base nacional y excedente de los mismos en el medio M-25 señalan la necesidad de revisión de balance nutricional de ambos medio para el óptimo crecimiento de *Bacillus thuringiensis*. La hidrolisis aplicada al medio base nacional no produce crecimiento mayor de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el medio sin hidrolisis y induciendo a la bacteria la necesidad de un período más largo de adaptación durante el cual su crecimiento fué sostenidamente lento. La causa de este fenómeno está aún no determinada. El balance nutricional realizado al medio base nacional resulta en un crecimiento inicial rápido de *Bacillus thuringiensis* llegando al máximo punto de crecimiento entre 30 horas comparado con 72 horas en el medio base nacional. Sin embargo, la producción de esporas en este medio es inferior al medio base nacional bajo las condiciones de fermentación utilizadas. La cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki 3a3b cultivada en los medios bases nacionales y balanceados muestran toxicidad para las larvas de *Plutella xylostella* en las concentraciones de 0.000001 a 0.01 mg/ml.

Introducción

Los insecticidas químicos han sido producidos comercialmente desde hace 40 años. Los primeros fueron considerados una bendición para la agricultura, desde entonces incrementaron las cosechas y fueron del mismo modo usados para el control de serias enfermedades tropicales como la malaria.

Desde un inicio se conocía que los insecticidas químicos poseían un peligro potencial para la salud humana y la naturaleza. Más tarde fue descubierto que estos nuevos químicos fueron los causantes de daño ambiental resultando en envenenamientos humanos, contaminación de la tierra, agua y alimento. El uso indiscriminado de los mismos fueron creando una progenie de plagas resistentes de estos químicos.

Según un estudio de la Organización Mundial de Salud cada año el uso de los insecticidas químicos provocan 2,000,000 intoxicaciones y 40,000 muertos. Probablemente la mitad de las intoxicaciones y 3/4 parte de los muertos ocurren en los países del tercer mundo donde se usan solamente 1/5 parte de los insecticidas químicos. Un estudio reciente en las Filipinas encontró que después del uso de insecticidas clorinados, la tasa de mortalidad de adultos masculinos en el área rural sufrió un aumento de 27% (Goldenman y Rengam, 1989).

Nicaragua históricamente ha dependido de la importación de plaguicidas, lo que representa un alto costo en consumo de divisas para la obtención de estos productos. En la agricultura nacional, la aplicación de químicos como medida generalizada para el control de plaga y el uso irracional de los mismos a traído consecuencias negativas en los agro-ecosistemas, sobre la salud humana y ha

elevado los costos de producción.

En el año 1967, Nicaragua no pudo exportar carne de res a los EE.UU debido a que se encontraron altas concentraciones de residuos de Diclorofenil tricloroetano, DDT (Swezey y Daxl, 1983). Investigaciones en el Departamento de León mostraron que la leche materna contenía un promedio de 2.12 ppm de DDT lo que representa una contaminación 42 veces mayor al valor límite tolerable (0.05 ppm) por la Organización Mundial de Salud (WHO, 1980).

Del año 1962 a 1972 se reportaron 3000 intoxicaciones de plaguicidas por año en Nicaragua (Falcon y Smith, 1973). Se reporta el desarrollo de resistencia en insectos vectores como el zancudo *Anophelis albimanus* a grupos de insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos (WHO, 1980). Además se han reportado posible desarrollo de resistencia de plagas agrícola como *Plutella xylostella* a diferentes grupos de insecticidas químicos (Varela, 1987) y surgimiento de nuevas plagas insectiles en cultivos hortícolas por causa de destrucción de la fauna benéficas (Guharay, 1986).

Según estimaciones de las Naciones Unidas se necesita anualmente 200 millones de US dolares para reparar los daños sociales causados por insecticidas químicos, lo que representa aproximadamente del 40 a 50% de los ingresos totales por exportación (Falcon y Daxl, 1977).

Todo esta problemática nos plantea la necesidad de implementar programas del manejo integrado de plagas en la que deben intervenir diferentes métodos de control que permitan mantener las poblaciones de plagas a niveles económicamente permisibles. Dentro de las estrategias de control existe el uso de

control biológico.

El uso de los microorganismos para el control de las plagas y patógenos se considera como uno de los métodos más adecuados. La utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control de las larvas lepidópteras es un método muy difundido.

Bacillus thuringiensis se incluye en el orden *Eubacteriales*, familia *Bacillaceae*, género *Bacillus*. La familia Bacillaceae incluye bacilos, esporógenos gram-positivos, células en general grandes y a veces dispuesta en cadenas largas (Debach, 1968).

El *Bacillus thuringiensis* Berliner es un microorganismo semejante al *Bacillus cereus*, se halla ampliamente distribuido por el mundo, tiene forma de bastón, produce esporas, es aerobio y gram-positivo. El *Bacillus thuringiensis* Berliner es único en su caracterización por la producción de uno o más cristales parasporales proteínicos durante su ciclo de esporulación, su habilidad para utilizar citrato de carbono como única fuente de carbono y alto contenido del fosfato en sus esporas. Además esta bacteria tiene acción patogénica en larvas de lepidópteros. Se han identificado por lo menos 20 serotipos de esta bacteria en base de las propiedades de las proteínas flagelares (Debach, 1968).

El cristal o cuerpo parasporal formado por la bacteria durante su ciclo de esporulación generalmente tiene forma de diamante, pero en algunas especies la forma es romboide o cubica. El cristal es de naturaleza proteica, tiene más de 17% Nitrógeno y cuando menos 17 amino ácidos, pero no tiene fosforo.

Según Debach (1968) la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* contra las larvas lepidópteras fue reportado por Tovamanoff y Vago (1951-53), Hanney (1953-55) y Angus (1954-56) estableció la

relación entre la toxina cristalizada y la parálisis intestinal que ocurre después de ingestión del cristal. El mismo autor reporta que mientras la proteína tóxica causa parálisis por ingestión, está no tenía efecto cuando se inyectaba dentro del cuerpo indicando alguna correlación entre el pH del intestino y la susceptibilidad a la toxicidad del cristal ya que el cristal es soluble en soluciones alcalinas.

Steinhaus (1960-62) citado por Debach (1968) propone que para obtener un diagnóstico adecuado, el mejor procedimiento es remitir insectos afectados a un laboratorio de patología de insectos. Sin embargo, de un procedimiento práctico en el campo se puede obtener un diagnóstico bastante acertado sobre la naturaleza de la enfermedad observando las síntomas característicos y los cambios después de la muerte.

El primer signo de la infección de las larvas lepidópteras por *Bacillus thuringiensis* es generalmente una actividad reducida y una pérdida de apetito, seguida por la descarga de fluidos por la boca y el ano. La infección puede comenzar con diarrea y por último causa una septicemia y muerte del insecto. Después de la muerte la larva se oscurece con un color café o negro. Generalmente los insectos muertos están blandos y al perder su forma los tejidos internos pueden desintegrarse o tomar una consistencia viscosa, olorosa pero normalmente no se derriten o licúan como los insectos muertos por ciertas infecciones virósicas. El cadáver del insecto generalmente se seca y se encoge, el integumento permanece intacto. Examinando al microscopio secciones histológicas de un insecto muerto o seco normalmente se ve un gran número de bacterias. Si el examen bacteriológico se retarda pueden entonces estar presentes bacterias similares al verdadero patógeno (Debach, 1968).

Actualmente se encuentran formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* para control de plagas lepidópteras en varios cultivos. En el año 1986 el consumo de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura nacional se estimó en 282,000 Kg con una demanda potencial de 625,000 Kg, teniéndose una importación real del producto de 144,000 Kg, lo que refleja un déficit para satisfacer de la demanda mínima (MIDINRA, 1987).

En vista de que los productos comerciales como DIPEL, THURICIDE y BACTOSPEIN son producidos por empresas extranjeras, resulta muy cara su importación, alcanzando un valor de 9 a 12 US dolares por litro, mientras que el producto elaborado en el país puede costar al máximo de 1 a 4 US dolares por litro (MIDINRA, 1987). Por lo tanto en Nicaragua surge la necesidad de producir un preparado microbial tomando como base una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* utilizando un medio de cultivo con ingredientes disponibles localmente.

Para la cultivación o fermentación de *Bacillus thuringiensis* se pueden utilizar dos tipos de fermentaciones; semi-sólidas y sumergidas. Las fermentaciones sumergidas que son aplicadas en este estudio son utilizadas principalmente para formulaciones líquidas, suspensiones del complejo spora-cristal (Dulmage y Rhodes, 1971).

Uno de los factores más importantes en la optimización de un proceso de fermentación es el diseño del medio de crecimiento y producción (Cooney, 1981). Los cultivos de medios son preparaciones sólidas, semi-sólidas o líquidas que constituyen en micro-mundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio intentando ser un reflejo de su habitat natural en relación a la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo (Herrera, 1985).

Los requerimientos nutricionales básicos en medio para la fermentación de *Bacillus thuringiensis* incluyen agua, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, elementos minerales y factores de crecimiento o vitaminas (Dulmage y Rhodes, 1971; Herrera, 1985).

El agua constituye el vehículo de todas las sustancias reaccionantes dentro de estos seres vivos, así como en el exterior al trasladar iones y compuestos orgánicos. La composición salina del agua corriente varía en dependencia de la fuente pudiendo en algunos casos matar o inhibir a los microbios. Para evitar este efecto se usan aguas cuyas propiedades sean estables, por lo que se utiliza agua destilada en los medios de cultivo (Herrera, 1985).

Las fuentes de carbono tienen como principal función el suministro de energía para los procesos metabólicos del organismo y para la formación de biomasa, considerándose como suministradores de carbono las grasas, carbohidratos y proteínas. Generalmente se utilizan los carbohidratos como fuente de carbono en los medios de cultivos, aunque *Bacillus thuringiensis* es flexible y puede utilizar aminoácidos como fuente de carbohidratos.

En los medios utilizados para fermentaciones sumergidas de *Bacillus thuringiensis* se utiliza glucosa, melaza de remolacha, melaza de caña, sacarosa, almidón de maíz, yuca y boniato como fuentes de energía (Dulmage, 1970; Dulmage y Rhodes, 1971; Perez, 1983 y MIDINRA, 1987).

Los elementos minerales son sales inorgánicas esenciales para el crecimiento de microorganismo. Estas incluyen los elementos potasio, manganeso, fósforo, azufre y en menores cantidades calcio, zinc, hierro u otros minerales. El manganeso es necesario para la esporulación y el calcio para la estabilidad del calor en las esporas (Dulmage y Rhodes,

1971).

Las fuentes de nitrógeno son esenciales en el proceso de síntesis de amino ácidos para la formación de proteínas y otros compuestos nitrogenados como bases purínicas y pirimídicas necesarias para la vida del microorganismo. Las harinas de semilla de algodón, soya, pescado, sangre de res, residuo de pollo, salvado de trigo y levadura forrajera pueden ser utilizados como fuentes de nitrógeno en los medios de cultivo (Dulmage y Rhodes, 1971; Salama *et al.*, 1983).

El balance cuantitativo y cualitativo de los componentes que intervienen en un medio de cultivo tienen un efecto directo en la cinética de crecimiento de la bacteria así como el rendimiento que se puede esperar en un medio de cultivo.

Con la intención de buscar alternativas para la producción de insecticidas biológicos a nivel local, se plantea la necesidad de obtener un medio óptimo basado en materiales locales con el cual se puede producir *Bacillus thuringiensis* con costo reducido y de manera eficiente.

Por esto se plantea el siguiente trabajo que tiene como objetivo estudiar la cinética de crecimiento, rendimiento de esporas y cristales y toxicidad del complejo spora-cristal de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo con el fin de determinar un medio óptimo para la producción de la cepa nativa (3a 3b CNPV B th-12) de *Bacillus thuringiensis*.

Materiales y Métodos

El estudio se llevo a cabo en el Centro Nacional de Protección Vegetal (CENAPROVE) , ubicado en el Km 12.5 Carretera Sur, San José de la Cañada, Managua.

Para el estudio se utilizó un cultivo puro de *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki. Esta cepa fue aislada el 31 de Junio, 1987 de un suelo proveniente del campo de frijol en Santa Lucia , Quebrada de Agua, Departamento de Boaco, Región V, Nicaragua. La cepa fue identificada en el Instituto Pasteur, Paris, Francia como *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki serotipo 3a3b y fue registrado como CNPV Bt-12.

En la primera fase del trabajo se comparó la cinetica de crecimiento y rendimiento de esporas de *Bacillus thuringiensis* en los medios de cultivos M-25, medio base nacional. El medio M-25 es utilizado en el laboratorio de *Bacillus thuringiensis* del Centro de Estudios Avanzados y Post-grados del Instituto Politécnico Nacional de Mexico y el medio base nacional es el medio en estudio para su optimización. Los contenidos de estos medios se presentan en el cuadro I.

Con el objetivo de lograr mayor asimilación de las proteínas, amino ácidos y vitaminas provenientes de harinas y levaduras se puede someter los contenidos del medio a un proceso de hidrolisis tratando el medio con ácido fosfórico (0.7% vol/vol) y manteniendo la mezcla a una temperatura de 121° C por 40 minutos utilizando autoclave. El medio M-25 es hidrolizado normalmente; para efectos de comparación se realizó igualmente hidrolisis del medio base nacional.

Cuadro I. Componentes de los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

Medio M-25*		Medio base nacional		Medio base balanceado	
Glucosa	3%	Melaza	2%	Melaza	7%
Harina de Sangre	1,2%	Harina de Soya	1%	Harina de Soya	1,2%
Levadura	0,6%	Harina de Pescado	1%	Harina de pescado	1,1%
CaCO ₃	0,1%	Levadura	0,2%	Levadura	0,6%
H ₃ PO ₄	0,7%	CaCO ₃	0,1%	CaCO ₃	0,1%
Agua de Maiz*	0,5%	K ₂ HPO ₄	0,15%	K ₂ HPO ₄	0,15%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3%	H ₃ PO ₄	0,7%	H ₃ PO ₄	0,7%
MgSO ₄	0,2%			CuSO ₄	0,000417%
KCl	0,2%			MnSO ₄	0,0000063%
CoCl ₂	0,003%				
MnSO ₄	0,004%				

* Medio utilizado en CINVESTAV, Mexico

* Un producto industrial en forma de polvo
Se agrega H₃PO₄ para realizar la hidrolisis

Para la fermentación todos los medios se distribuyeron en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 200 ml en cada frasco. El pH del medio se ajustó a 7.5 antes de esterilizar con una solución de NaOH (5%). La esterilización se realizó en autoclave utilizando la temperatura de 121°C por 15 minutos.

Preparación del inóculo: Para la preparación de frascos de inóculo se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki 3a 3b la cual se hizo crecer en nutriente agar inclinado a una temperatura de 32-34°C por 72 horas y guardado a 4°C hasta su empleo. Azadas de este cultivo fueron usadas para inocular frascos conteniendo 100 ml de la dieta NYSMA (Cuadro II) anteriormente autoclavada a 121°C por

15 minutos. Los frascos fueron incubados en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30° C por 16 horas, luego un 2% (v/v) de estos se utilizó para inocular otra serie de los mismos frascos y se incubaron por 8 horas más. Luego estos se utilizaron para inocular otra serie de los mismos frascos a 2% (v/v).

Cuadro II. Composición de dieta NYSMA.

Constituyentes	Cantidad (g)
MnSO ₄	0.0030
CaCO ₃	0.0400
Mg SO ₄	0.0400
Extracto de levadura	0.2500
Peptona	1.5000
Carne Seca	2.5000
Agua	500 ml

Fermentación: Todos los frascos conteniendo 200 ml de medio del cultivo fueron esterilizados e incubados bajo las mismas condiciones que los frascos del inóculo. Se realizaron dos repeticiones por cada medio del cultivo ensayado. Los frascos de fermentación fueron inoculados con 2% del volumen del contenido de la segunda serie de frasco del inóculo. De cada frasco se tomaron 6 ml de muestra cada 6 horas hasta la cosecha a las 48 horas. De cada muestra tomada se midió el crecimiento de la bacteria en base al número de células viables, bacillus, número de preesporas y número de esporas por conteo total en cámara Neubauer. Se realizaron observaciones periódicas de los cultivos mediante preparación en placas que se

examinaron al microscópio. A las mismas muestras se le realizaron análisis de la cantidad de azúcares reductores utilizando el método del dinitrosalicílico (DNS).

La segunda fase del estudio consistió en la comparación del medio base nacional y el medio base balanceado (Cuadro I). El balance del medio base nacional se realizó en base de los requerimientos nutricionales básicos de una bacteria (Revah, 1981; ver cuadro III) y la deficiencia nutricional del medio base en comparación con el medio M-25 (Cuadro I). El contenido nutricional del medio balanceado en relación a los requerimientos de la bacteria se presenta en Cuadro III.

Durante esta fase se comparó la cinética de crecimiento, rendimiento de esporas y cristales y la toxicidad de productos obtenidos en los medios base nacional y medio balanceado sin o con hidrólisis, lo cual se efectuó en la misma manera como fue descrito anteriormente utilizando ácido fosfórico. Para el estudio se utilizaron dos repeticiones por cada medio. El tiempo de fermentación en esta fase se prolongó hasta 72 horas durante lo cual se tomaron muestra cada 6 horas para estudiar la cinética de crecimiento y rendimiento.

Al terminar la fermentación se realizó la recuperación del complejo spora-d-endotoxina por coprecipitación de acetona descrita por Dulmage et al. (1970).

Prueba de virulencia: Para probar la virulencia de los productos de fermentación recuperados en forma de polvo seco se prepararon suspensiones acuosas en concentraciones de 0.01 , 0.001, 0.0001, 0.00001 y 0.000001 mg/ml agregando 0.2 ml de Triton-X-100 por cada 50 ml de suspensión.

Cuadro III. Requerimientos nutricionales de la bacteria y contenido del medio balanceado.

Elementos	Necesidad de bacteria	Contenido de medio balanceado
	g/l	g/l
Carbono	30-40	35
Nitrógeno	1,8	1,82
Fosfóro	0,375	2,56
Azufre	0,09	0,23
Potasio	0,337	3,40
Magnesio	0,0375	0,056
Sodio	0,125	0,1308
Calcio	0,825	1,416
Hierro	0,165	0,244
Cobre	0,00225	0,000622
Manganeso	0,000825	0,000631

Se determinó la toxicidad de los productos con larvas de *Plutella xylostella* utilizando el método de inmersión de folios (Splittstoesser y McEwen, 1961). Se cortaron discos de 18 mm de diámetro de hojas de repollo (cultivado en el invernadero de CENAPROVE) introduciendo 10 discos en plato petri conteniendo las diluciones a probar. Se mantuvieron los discos en las suspensiones por 2-3 minutos y luego se colocaron los discos sobre papel filtro para absorber el exceso de agua.

Los discos tratados se colocaron individualmente en un plato petri donde se introdujeron una larva (I o II estadio) de *Plutella xylostella* proveniente de la cria de CENAPROVE y de la Escuela de Sanidad Vegetal, UNA, las que se recolectaron del Valle de Sébaco. La

humedad de los discos dentro de los platos petri se mantuvo sellandolos con Parafilm, la temperatura en el local del bioensayo osciló entre 23 a 25 °C y la humedad relativa entre 70-80%. Después de 24 horas los discos tratados fueron reemplazados por discos sin tratamientos para asegurar la alimentación de las larvas en prueba. En total se utilizaron 470 larvas por bio-ensayo . Hasta los 7 días apartir de 24 horas se realizaron recuentos diarios para determinar el grado de mortalidad de las larvas en el bio-ensayo.

Resultados y Discusión

1. Evaluación de Medio Base Nacional en comparación con el medio M-25:

Durante esta fase se realizó fermentación de *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki 3a3b en los medios mencionados para conocer el comportamiento de la cinética de crecimiento y el consumo de azúcares reductores durante el proceso de fermentación.

1.1. Cinética de crecimiento

En la figura 1 se presenta las cinéticas de crecimiento de la bacteria en los diferentes medios de cultivo donde se observa que en los medios M-25 y medio base nacional sin hidrólisis el crecimiento exponencial o logarítmico se inicia a las 6 horas de fermentación, mientras que en el medio base nacional con hidrólisis el crecimiento logarítmico se inicia hasta las 18 horas. Las siguientes fases de crecimiento presentan características muy similares en los tres medios.

1.2 Producción de esporas y cristales

A las 48 horas terminó la fermentación obteniéndose 7.15×10^8 esporas /ml en el medio M-25. En el medio base nacional hidrolizado se produjo 5.25×10^8 esporas/ml y en el mismo medio sin hidrólisis la producción de la esporas llegó a 4.55×10^8 esporas/ml.

1.3 Consumo de azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores presente en el medio de cultivo refleja su capacidad de soportar el crecimiento de la bacteria y la variación de la cantidad de los azúcares durante la fermentación indican el grado de asimilación del medio por el microorganismo.

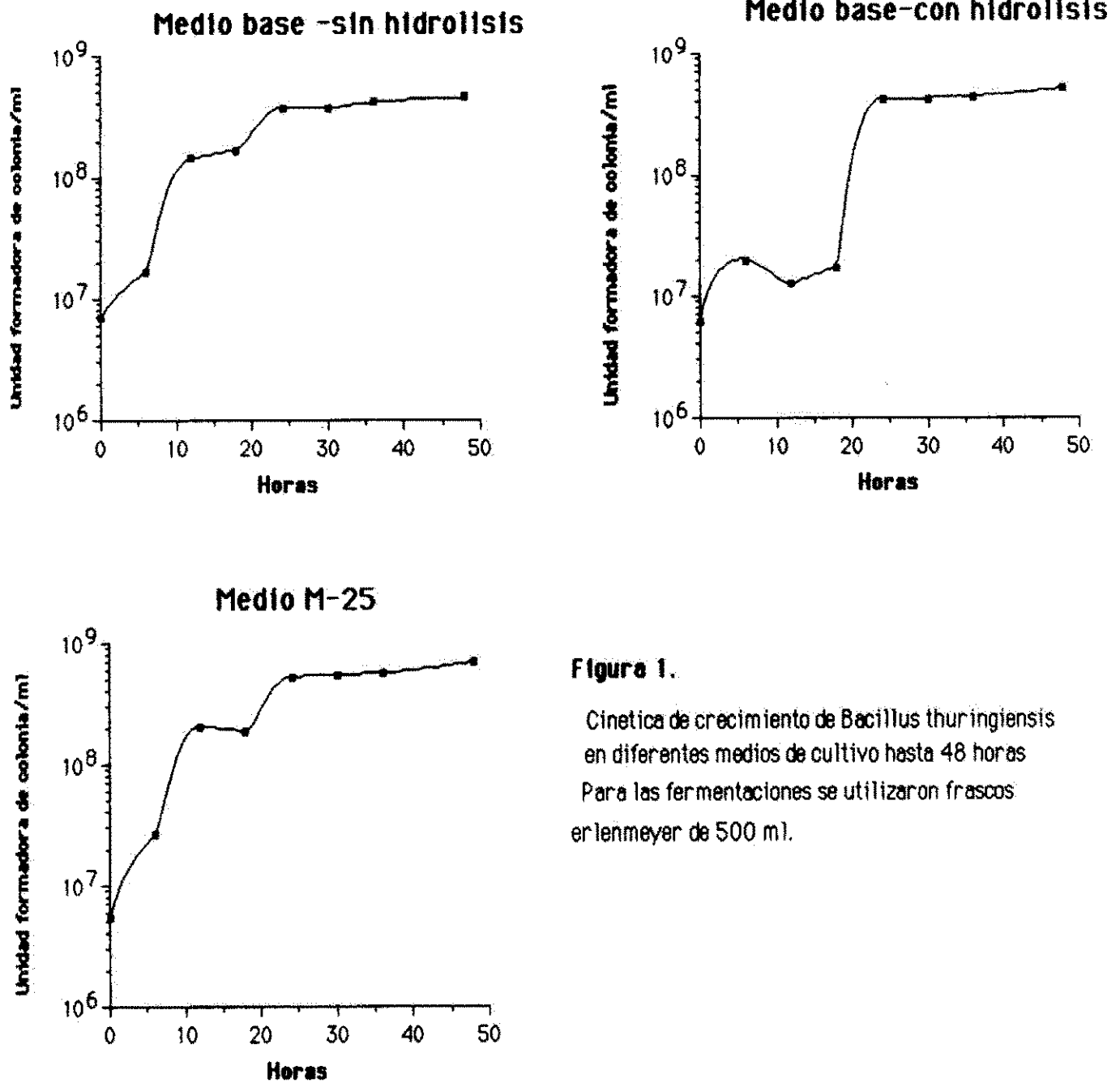


Figura 1.

Cinetica de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo hasta 48 horas
 Para las fermentaciones se utilizaron frascos erlenmeyer de 500 ml.

En la figura 2 se presentan los contenidos de azúcares reductores en los medios de cultivos durante la fermentación. Se puede observar que en el medio M-25 la cantidad de azúcares reductores al inicio de fermentación fue 27.5 g/litro, 6 veces mayor que en el medio base nacional con hidrólisis (4.8 g/l) y 10 veces mayor que en el medio base nacional sin hidrólisis (3.1g/l). En el M-25 el proceso de asimilación de azúcares por la bacteria se inicia desde las 0 horas observándose consumo de azúcares acelerado durante todo el proceso de fermentación. Al contrario en el medio base nacional con y sin hidrólisis se observa que el consumo de azúcares se inicia a partir de 6 y 12 horas respectivamente. Así mismo se puede observar que al final de la fermentación en el medio M-25 queda 12 g/l de azúcares reductores sin consumir y en los medios bases nacionales el consumo es casi total.

En la misma figura se observa que en el medio base nacional sin y con hidrólisis aumenta la cantidad de azúcares reductores en las primeras 6-12 horas mientras que en el medio M-25 no se observa esta tendencia.

1.4 Discusión

Los resultados de fermentaciones de *Bacillus thuringiensis* en los diferentes medios indican la superioridad del medio M-25 sobre el medio base nacional ya que en el medio M-25 se produce mayor número de esporas después de 48 horas de fermentación. Sin embargo, la cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en este medio no difiere de la del medio base nacional.

Analizando los contenidos nutricionales de ambos medios (Cuadro I) se puede considerar que el medio M-25 es más aprovechable por la bacteria ya que se suministra el carbono en forma

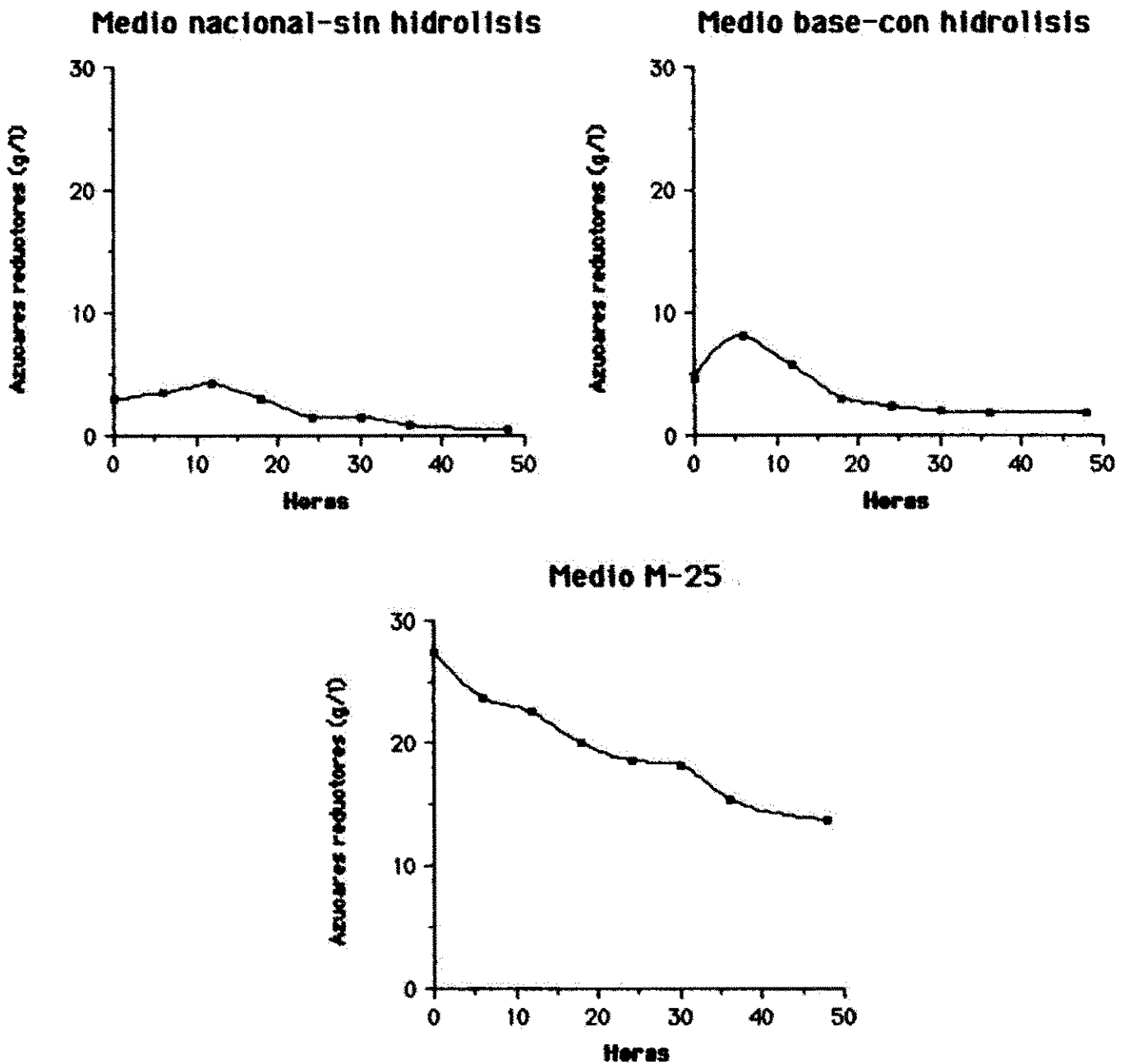


Figura 2.

Cantidades de azúcares reductores presentes en los diferentes medios de cultivo durante las 48 horas de fermentación efectuado en frascos erlenmeyer. La cantidad de azúcares se determinó en base del método dinitrosalicílico.

de glucosa, un monosacárido de fácil asimilación y este medio es hidrolizado antes de su uso, mientras que en el medio base nacional la melaza es la fuente de carbohidrato, un disacárido que tiene que ser desdoblado antes de ser asimilado por la bacteria señalando que en el medio base nacional la disponibilidad y asimilación de azúcares reductores sean pobres. Este planteamiento se confirma a través de los resultados obtenidos del análisis de los azúcares reductores en los medios.

Para mejorar la disponibilidad de los azúcares reductores y otros factores nutricionales se sometió el medio base nacional a una hidrólisis previo a su uso, obteniéndose mayor cantidad de azúcares reductores al inicio de fermentación y consumo de azúcares más acelerado. Sin embargo, la cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en este medio demuestra un período de crecimiento lento hasta las 18 horas aunque la producción de esporas fue ligeramente superior al medio base nacional sin hidrólisis después de 48 horas de fermentación. Esto nos indica que el proceso de hidrólisis del medio base nacional produce condiciones que impide rápida iniciación de la fase exponencial de crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, mientras no se observa este efecto en el medio M-25 que también es sometido al mismo proceso de hidrólisis. Por lo tanto es necesario investigar el efecto de hidrólisis sobre el medio base nacional y su aprovechamiento por la bacteria.

Es importante señalar la baja cantidad de azúcares reductores con que se inicia las fermentaciones en los medios nacionales en comparación con el medio M-25 que podría convertirse en una limitante para el crecimiento bacteriano ya que a las 48 horas en los medios bases nacionales son casi consumidos en totalidad los azúcares

señalando la necesidad de balancear este medio. Por otro lado en el medio M-25 queda sin utilizarse una gran cantidad de los azúcares. Ese excedente de los azúcares reductores eleva los costos de producción debiéndose formular los medios considerando el factor económico, basándose en recursos de menor costo.

Por tal razón, se debe tratar de utilizar fuente de carbono más accesible (como melaza) en lugar de azúcares puros (como glucosa) aunque sea necesario someter el medio a un tratamiento previo como hidrólisis para hacerla más asimilable por el microorganismo (Dulmage y Rhodes, 1971).

2. Evaluación de Medio Base Nacional en comparación con el Medio Base Nacional balanceado:

En esta fase se realizaron fermentaciones de *Bacillus thuringiensis* en el medio base nacional y en medio nacional balanceado basado en los resultados obtenidos en la fase anterior. Ambos medios se probaron sin y con hidrólisis usando ácido fosfórico como hidrolizador.

2.1 Cinética de crecimiento

En la figura 3 se presentan las cinéticas de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en los diferentes medios ensayados hasta 72 horas donde se observa que la cinética obtenida en el medio balanceado difiere claramente del medio base. En el medio balanceado la bacteria demuestra un crecimiento rápido iniciando la fase exponencial a las 6 horas y alcanzado su punto de crecimiento máximo a las 20 horas. En el medio base aunque la iniciación de la fase exponencial ocurre al mismo momento el crecimiento de la población es más lento alcanzando su punto máximo a las 72 horas.

Comparando el medio base sin y con hidrólisis se observa que

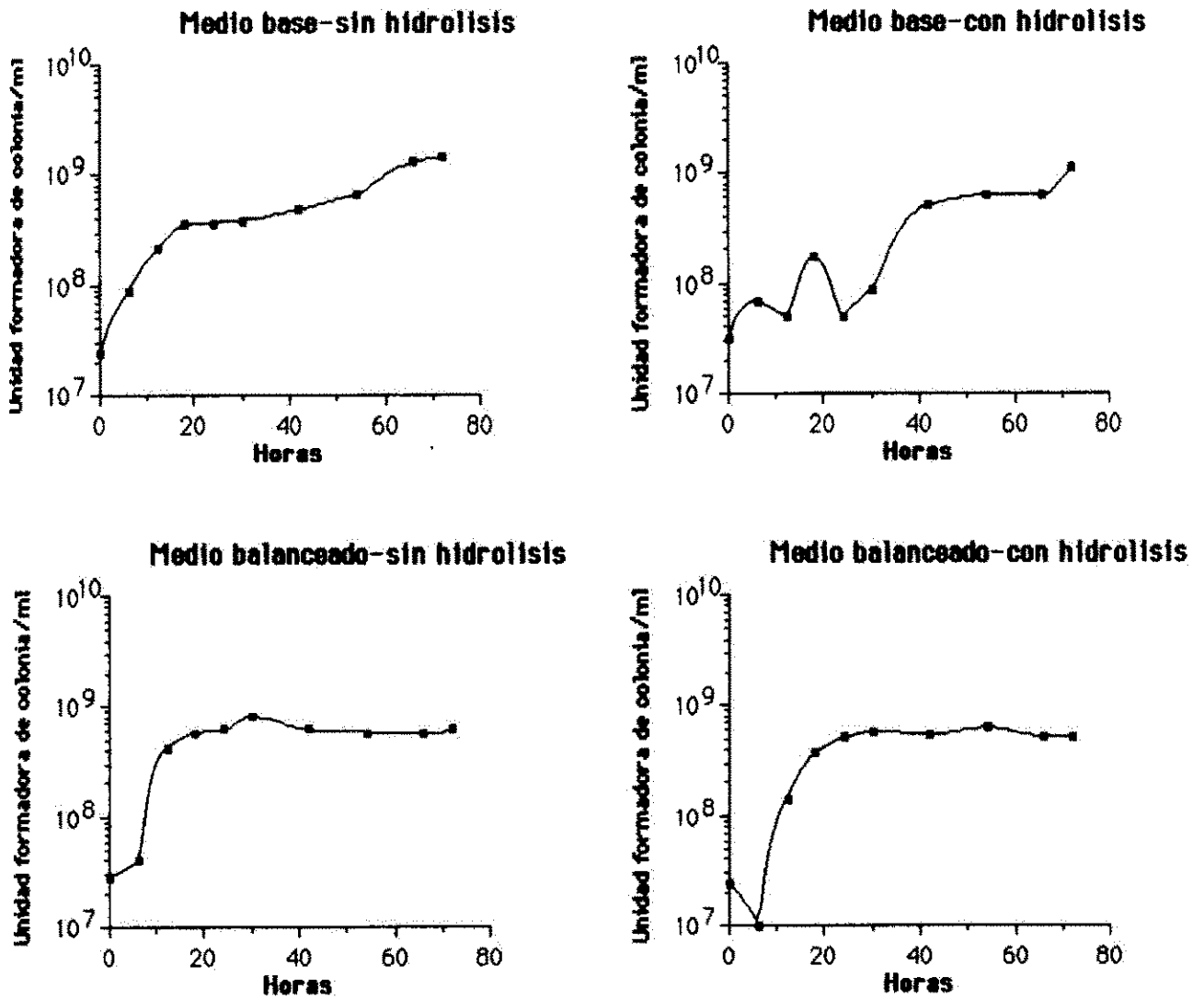


Figura 3.

Cinetica de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo.

La fermentación se realizó en frascos erlenmeyer de 500 ml hasta 72 horas.

La hidrolisis se realizó utilizando ácido fosfórico (0.7%).

en el medio con hidrolisis la bacteria presenta un período de adaptación largo (hasta 30 horas) después del cual se da el proceso de crecimiento exponencial alcanzando su punto máximo a las 72 horas igual al medio sin hidrolisis. En el medio base sin hidrolisis no se observa este período de adaptación caracterizado por crecimiento lento. Por otro lado los medios balanceados sin y con hidrolisis presentan cinéticas de crecimiento similares.

2.2 Producción de esporas y cristales

La producción de esporas y cristales en los medios bases con y sin hidrolisis fué de 1.11×10^9 y 1.43×10^9 esporas y cristales por ml respectivamente después de 72 horas de fermentación. El medio balanceado con hidrolisis produce 5.25×10^8 y el medio balanceado sin hidrolisis 6.32×10^8 esporas y cristales/ml después de 72 horas. No existe diferencia significativa entre los número de esporas producidos en los medios bases con y sin hidrolisis, así como entre los medios balanceados con y sin hidrolisis, mientras la producción de esporas es significativamente mayor en el medio base en comparación con el medio balanceado (Cuadro IV).

2.3 Virulencia de los productos de fermentación

Para determinar la virulencia se determinó la toxicidad de los productos de fermentación sobre las larvas de *Plutella xylostella* utilizando el método de inmersión de folios. En el cuadro V se presentan las actividades insecticidas de la endotoxina producida en los cuatro medios. Los datos indican que los más alto porcentaje de mortalidad se obtuvieron con el producto del medio base sin hidrolisis que produjo 100% de mortalidad de larvas con la concentración de .001 mg/ml seguida por el medio base con hidrolisis que causó 75% mortalidad con la misma concentración. Los resultados obtenidos con

los productos de los medios balanceados son comparables con el medio base aunque muestran valores más bajos.

Cuadro IV. Producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki 3a 3b en los diferentes medios de cultivo después de 72 horas de fermentación*.

Medios de cultivo	Promedio de esporas y cristales/ml*	
Medio base sin hidrolisis	1.43×10^9	a
Medio base con hidrolisis	1.11×10^9	a
Medio balanceado sin hidrólisis	6.32×10^8	b
Medio balanceado con hidrolisis	5.25×10^8	b

* Las fermentaciones se realizaron en frascos erlenmeyer de 500 ml

* Las cifras no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0.05$) si son acompañadas por la misma letra.

Cuadro V. Porcentaje de mortalidad* de larvas de *Plutella xylostella* expuestas a la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* cultivada en cuatro medios de fermentación.

Medio de cultivo	Concentración de esporas (mg/ml)				
	.01	.001	.0001	.00001	.000001
Medio base sin hidrolisis	100	100	90	90	65
Medio base con hidrolisis	100	75	65	70	70
Medio balanceado sin hidrolisis	85	75	70	50	50
Medio balanceado con hidrolisis	95	70	65	60	60

* Mortalidad ocurrida a los 7 días después de infección. Se usaron 20 larvas por tratamiento y se presenta en forma corregida en base al testigo.

2.4 Discusión

El balance nutricional realizado al medio base nacional tiene como meta obtener una mejor asimilación de todos los nutrientes del medio para lograr altos rendimientos de esporas y cristales y mejorar la toxicidad del producto elaborado. El balance del medio base nacional se realizó aumentando la cantidad de carbohidratos, proteínas y algunos microelementos como cobre y manganeso (Cuadro III). Los resultados nos señalan que bajo las condiciones que se realizaron las fermentaciones el medio balanceado no logró mejorar la producción de la bacteria y su toxicidad en comparación al medio base nacional. Sin embargo, en este medio se observó crecimientos iniciales de la bacteria más rápidos. Es de gran valor tomar en cuenta el tiempo de fermentación o sea el tiempo durante el cual se obtiene una formación y liberación de esporas y cristales completos. Mientras más corto sea el tiempo de fermentación más rentable resulta la producción. Por lo tanto se debe valorar el rápido crecimiento que presentaron los medios balanceados resultando un ahorro de aproximadamente 10 horas de fermentación comparado con el medio base nacional en base de primer fase de crecimiento. El medio balanceado también contiene altas concentraciones de nutriente exigiendo una concentración de oxígeno más alta, lo cual bajo las condiciones de fermentaciones realizadas en este estudio pudo haber actuado como una limitante para el crecimiento óptimo de la bacteria y producción de esporas y cristales. Según Megna (1963) algún desequilibrio en el suplemento de nitrógeno y carbohidrato da como resultado una esporulación incompleta, rompimiento de células, germinación de esporas y/o autólisis. Otros autores señalan que altas concentraciones de nutrientes parecen inhibir la esporulación y producción de toxina

(Norris, 1969; Sherrer et al., 1973; Holmber et al., 1980).

Los resultados obtenidos con los medios bases sin y con hidrolisis confirman la tendencia del aumento del período de adaptación de la bacteria en este medio hidrolisado observado en la fase anterior, mientras no se observa esta tendencia en el medio balanceado hidrolisado. La causa de este efecto observado posterior a la hidrolisis sera un tema importante de investigaciones futuras.

Aunque los resultados de los bioensayos realizados con las larvas de *Plutella xylostella* son preliminares y no permite la estimación de Dosis Letal 50 a través de análisis de Probit, quedan establecido que los productos de fermentación en los medios ensayados son tóxicos a este insecto. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones toxicológicas con otras especies de insecto y estimar la dosis de aplicación para los ensayos de campo en termino de Unidades Internacionales.

Los resultados encontrados no permite identificar un medio de cultivo que es superior. Sin embargo, los datos obtenidos con los medios ensayados nos permite conocer el comportamiento de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y comparar la eficiencia del medio actual con otros medios. Estas comparaciones generan fundamentos para los cambios en el medio actual con el fin de llegar a un medio óptimo para la producción eficiente de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* 3a3b en escala comercial.

Conclusiones

1. La deficiencia de azúcares reductores en el medio base nacional y excedente de los mismos en el medio M-25 señalan la necesidad de revisión de balance nutricional de ambos medio para el óptimo crecimiento de *Bacillus thuringiensis*.
2. Aunque no son óptimos, los medios probados en este estudio, se pueden considerar adecuados para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y producción de las esporas y cristales.
3. La hidrólisis aplicada al medio base nacional no produce crecimiento mayor de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el medio sin hidrólisis e induce a la bacteria necesitar de un período más largo de adaptación durante lo cual el crecimiento poblacional de la bacteria se mantiene lento. La causa de este fenómeno aún no esta determinado.
4. El balance nutricional realizado al medio base nacional resultó en un crecimiento inicial rápido de *Bacillus thuringiensis* llegando al máximo punto de crecimiento entre 30 horas en este medio comparado con 72 horas en el medio base nacional. Sin embargo, la producción de esporas en este medio es inferior al medio base nacional bajo las condiciones de fermentación utilizadas.
5. La cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki 3a3b cultivada en los medios bases nacionales y balanceados muestran toxicidad para las larvas de *Plutella xylostella* en las concentraciones de 0.000001 a 0.01 mg/ml.

BIBLOGRAFIA

1. Cooney, C.L. (1981). Growth of Microorganisms. Biotechnology. Vol. Microbial Fundamental Ed. H.J. Rehm and G.Reed. Pag. 104
2. Debach, P. (1968). Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Enfermedades causadas por bacterias Cristalíferas. Vedado, Habana Pag. 610-613.
3. 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.
4. Dulmage, H.T y R.A. Rhodes (1971). Production of pathogens in artificial media. En Microbial Control of Insects and mites. ed H.D. Borges y N.W. Hussey. Acad. Press Cap 24. p.507-540.
5. Dulmage, H.T., Correa, J.A. y Martínez, A.J. (1970). Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis* . J.Inverteb. Pathol. 15:15-20
6. Falcon, L.A. y Daxl, R. (1977). Informe al gobierno de Nicaragua sobre el control integrado de plagas del algodónero. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Managua, 61 pp.
7. Falcon, L.A y Smith, R. (1973). Guidelines for integrated control of cotton pest. Food and Agriculture Organization of the United nations (FAO). Rome, 92 pp.
8. Goldenman, G. y Rengam, S. (1989). Pesticides and you . International Organization of Consumers., Penang, Malaysia.
9. Guharay, F. (1986). Problemática de producción hortícola en la VI Región y sugerencias para su superación. Informe Técnico. DGEIA, MIDINRA, Mimeog.

Recomendaciones

1. Para llegar a un medio óptimo basado en los insumos locales se debe continuar los ensayos de fermentación variando los contenidos nutricionales especialmente la cantidad de melaza y las proteínas en el medio base tomando en cuenta los resultados obtenidos con el medio balanceado en este estudio.
2. Se debe investigar los efectos de hidrolisis sobre los contenidos nutricionales de los medios y el aprovechamiento de ellos por la bacteria.
3. Iniciar investigaciones con el fin de conocer los efectos de diferentes condiciones de fermentación (aireación, pH, temperatura, agitación etc.) sobre el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en los medios balanceados.
4. Determinar la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* producida en los medios a diferentes insectos y determinar su DL₅₀ y Unidades Internacionales.

10. Herrera, A.L. (1985). Introducción a los medios de cultivos. Manual de Medios de Cultivo. Editorial Científica-Técnica, La Habana. Pag. 5-9.
11. Holmberga, S.R. (1980). Efecto de alta concentración de nutrientes en cultivos de *Bacillus thuringiensis*. Biotech Bioeng 22: 17-27
12. Megna, J.C. (1963). Production of pathogens in artificial media. U.S. Patent 3,076,922.
13. MIDINRA (1987). Propuesta de Investigaciones para la producción de *Bacillus thuringiensis* en Nicaragua.
14. Norris, J.R. (1969). En The Bacterial spore G.W. Gould y A. Hurst Ed. Academic Press, London.
15. Revah, S. (1981). Ingeniería de reacciones bioquímicas. Fundamentos. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalopa. Pag. 47-48.
16. Salama, H.S et al. (1983). Novel Fermentation media for production of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. J. Inverteb. Pathol. 41: 8-19
17. Spliittstoesser, C.M. y F.L. McEwen. (1961). A bioassat technique for determining the insecticidal activity of preparations containing *Bacillus thuringiensis* Berliner. Journal of Insect pathology. 3:391-398.
18. Swezey, S. y Daxl, R. (1983). The IPM revolution in Nicaragua, breaking the circle of poison. Institute for food and development policy. San Francisco
19. Varela, G. (1987). Efectividad de cuatro insecticidas sobre *Plutella xylostella* (Curtis) y *Leptofobia eripe* (Boisd) en el cultivo de repollo. Tesis Ingeniero Agrónomo. ISCA, Managua.
20. World Health Organization (1980). Resistance of disease vectors to pesticides. Fifth Report of the World Health Organization commission on the Biology and Control of Vectors. Technical report No. 855