



Existencia y supervivencia de esporas de variedades de *Bacillus thuringiensis* en granos de almacén

Presence survival spores of *Bacillus thuringiensis* varieties in grain warehouse

Sánchez-Yáñez Juan Manuel^{1*}, García-Ortiz Vanessa Ruby¹, Ulibarri Gérard²,
Hernández-Escareño Jesús Jaime³

Datos del Artículo

¹Microbiología Ambiental. Ed B-3, Ins título de Investigaciones Químico Bio lógicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Mujica s/n. Col. Felicitas del Río, CP 58000, Morelia, Michoacán, México.

²Department of Chemistry and Biochemistry, Laurentian University 935 Ramsey Lake Rd. Sudbury, Ontario P3E2C6, Canadá.

³Microbiología y Micología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus de Ciencias Agropecuarias, Av Fco Villa S/N Col Ex -Hacienda, "El Canada Escobedo, NL, México.

*Dirección de contacto:

³Microbiología y Micología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus de Ciencias Agropecuarias, Av Fco Villa S/N Col Ex -Hacienda, "El Canada", Escobedo, NL, México.

Jésus Jaime Hernandez-Escareño
E-mail address : jjescareno@hotmail.com

Palabras clave:

Esporas, subespecies, supervivencia, efecto solar, biocida.

J. Selva Andina Res. Soc.
2016; 7(2):34-46.

Historial del artículo.

Recibido enero, 2016.
Devuelto mayo 2016
Aceptado julio, 2016.
Disponible en línea, agosto, 2016.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Resumen

El género de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) sintetiza esporas y cristales tóxicos para insectos-plaga agrícolas. La especie de *Bt* es cosmopolita, por lo que es posible aislar subespecies de granos almacenados dado que las esporas persisten por más tiempo ahí que en la intemperie. Los objetivos del trabajo fueron: i) aislar subespecies de *Bt* de granos almacenados ii) evaluar la toxicidad de esos *Bt* en *Spodoptera frugiperda* y *Shitophilus zeamaisese* iii) analizar la persistencia de esas esporas en granos de *Zea mays* almacenados y expuestos al ambiente abierto. Los resultados indican que existen esporas de subespecies de *Bt* en granos almacenados. De acuerdo con el aislado *Bt1* o *Bt2* fueron tóxicos para *S. frugiperda* y *S. zeamaisese*. Se sugiere que una de esos *Bt* fue la var *morrisoni*. Esas esporas en granos de *Z. mays* almacenado supervivieron más tiempo, que las expuestas a la radiación solar, eliminadas por radiación solar biocida.

© 2016. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Genus *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) synthesized spores and crystals toxic to pest-insects in agriculture. *Bt* is cosmopolitan then possible to isolate some subspecies or varieties from warehouse. The aims of study were: i) to isolate *Bt* varieties from grain at werehouse ii) to evaluate *Bt* toxicity on *Spodoptera frugiperda* and *Shitophilus zeamaisese* iii) to analyze *Bt* spores persistence in *Zea mays* grains at werehouse compared to same *Bt* on grains exposed to sun radiation. Results showed that at werehouse were recovered more than one variety of *Bt* spores. According to each isolate *Bt1* o *Bt2* were toxic to *S. frugiperda* or *S. zeamaisese*. One those *Bt* belong to var *morrisoni*. At werehouse these spores on *Z. mays* grains surviving more time, while the same spores exposed to boicide sun radiation they died.

Key words:

Spores,
subspecies,
survival,
biocide
sun radiation.

© 2016. Journal of the Selva Andina Research Society, Bolivia. All rights reserved.

Introducción

Los insectos-plaga (IP) son uno de los principales factores que limitan la producción agrícola. Atacan los cultivos vegetales (CV) desde su siembra a la cosecha e incluso como granos en su almacenamiento. Lo anterior obligó a que en el siglo XX se empleara en forma intensa el Diclorodifenildicloroetano (DDE) y otros organoclorados durante el ciclo completo de CV para protegerlos del ataque de los IP, desde su etapa de huevecillo hasta el adulto (Rowe *et al.* 1987, Dimalge 1970). La aplicación de plaguicidas químicos protege CV, pero en los IP alrededor de 500 especies se indujo resistencia genética. En consecuencia a finales de los años 80 se reportan numerosos casos de tolerancia a una o más tipos de insecticidas (Georghio 1990, Herrero *et al.* 2001a, Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000). Mientras los plaguicidas contaminan el agua, el aire y el suelo y su espectro biocida puede incluir insectos benéficos (Martin & Travers 1989, Lambert & Peferoen 1992). Otra alternativa para el control de IP, es el microbiológico con ventajas sobre el químico por su especificidad, e inocuidad a humanos, animales o plantas y de un relativo bajo costo (Herrero *et al.* 2001b, Lightwood *et al.* 2000). Un ejemplo de bioplaguicida es el género de bacteria entomotóxica y/o entomopatógeno *Bacillus* cuyas especies son: *B. thuringensis* (*Bt*), *B. popilliae*, *B. larvae* y *B. sphaericus* (de Maagd *et al.* 2000, Pinnock *et al.* 1971, Kaelin *et al.* 1994) *Bt* se aplica comercialmente desde la mitad del siglo XX (Kiselek 1974,

Lambert & Peferoen 1992, Luna-Olvera & Peña-Cabriales 1993). *Bt* durante su esporulación genera un cristal o cuerpo paraesporal, también conocido como δ -endotoxina, tóxica para IP de los órdenes: díptera, coleóptera y lepidóptera e inclusive nematodos fitoparasitos (Rowe *et al.* 1987, Moir & Smith 1990, Schnepf *et al.* 1998, Tabashnik *et al.* 2000). El bioplaguicida basado en *Bt* es clave en la reducción de la aplicación de plaguicidas químicos y evitar la contaminación ambiental como práctica agrícola de protección de los CV (Pinnock *et al.* 1974, Ignoffo & Garcia 1978, Griego & Spence 1978). Al respecto al menos el 80% del mercado de bioinsecticidas lo cubren productos de *Bt*, normalmente se emplean como primera elección en el manejo integral de IP, (Rowe *et al.* 1987, Lambert & Peferoen 1992, Wirth *et al.* 2001). Un problema de la aplicación de *Bt* es la breve persistencia de sus esporas en el ambiente abierto (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Pinnock *et al.* 1974, Ignoffo & Garcia 1978, Benoit *et al.* 1990) debido a que el cristal entomotóxico se sintetiza con parte de la proteína, le da resistencia a la radiación solar, le brinda protección mecánica, tolerancia a sustancias químicas del tipo de los biocidas en consecuencia la exposición del complejo spora/cristal a la luz, causa la desnaturalización del cristal y muerte de la spora (Kiselek 1974, Luna-Olveda & Peña-Cabriales 1993, De Amorin *et al.* 2001). A pesar de ello, las esporas de *Bt* se recuperan con relativa facilidad de un amplio número de nichos ecológicos (Moir & Smith

2009, Martin & Travers 1989, Sayyed *et al.* 2000) Es posible detectar esporas de *Bt* en función de la fuente de aislamiento: agua, suelo, filoplano de plantas, larvas de insectos enfermas, productos almacenados y alimentos balanceados para animales de granja (Martin & Travers 1989, Meadows *et al.* 1992, Smith & Couche 1991). Sin embargo, si existe diferencia entre la frecuencia de aislamiento de las subespecies de *Bt* y las esporas de un ambiente en específico, entre de uno abierto y/o cerrado como el almacén de granos ahí superviven por más tiempo (Lambert & Peferoen 1992, Dumalge 1970, Itoua-Apoyolo *et al.* 1995) en especial del suelo (Martin & Travers 1989, Meadows *et al.* 1992, Smith & Couche 1991). Por lo general la supervivencia de las esporas de *Bt*, depende del ambiente específico de ubicación (Rowe *et al.* 1987, Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Audtho *et al.* 1999, Kalfon & Barjac 1985. Al respecto se reporta que la persistencia de las esporas de *Bt* aplicadas foliarmente, fue limitada en hojas o filosfera de *Phaseolus vulgaris* y *Zea mays*, en las que registró un tiempo viable que no fue mayor de 72 h, resultado de la actividad biocida de la radiación solar (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Meadows *et al.* 1992). En contraste en alimentos balanceados para animales o granos almacenados, se reportó una supervivencia de semanas, con un porcentaje del 7% de recuperación de las esporas de (Rowe *et al.* 1987, Martin & Travers 1989, Dumalge 1970, Itoua-Apoyolo *et al.* 1995). Un ejemplo de lo anterior son las hojas de *Nicotiana tabacum* en almacén, de las que se aisló un porcentaje similar de esporas de *Bt* detectadas en semillas almacenadas (Kaelin *et al.* 1994, Sayyed *et al.* 2000, Hua *et al.* 2001, De Amorin *et al.* 1991). Lo que apoya la mayor probabilidad de recuperación de estas formas de resistencia de *Bt* en almacén en un ambiente protegido de la radiación solar (Benoit *et*

al. 1990, Griego & Spence 1978), que de un abierto como cuando el complejo espóra/cristal se asperja en hojas y granos de plantas expuestas directamente a esa radiación (Luna-Olveda & Peña-Cabriales 1993, Smith & Couche 1991) En el ambiente de almacén de granos se sospecha la existencia de esporas de *Bt* de más de una variedad, serotipo o subespecie, siendo que principalmente son esos sitios cerrados donde se han reportado epizootias en IP causadas por *Bt*, lo sugiere que debido al número de esporas viables de la bacteria que son suficientemente, para causar una intoxicación e infestación masiva de los IP (Rowe *et al.* 1987, De Amorin *et al.* 2001, Wirth *et al.* 2001, Dumalge *et al.* 1990). Con base en lo anterior los objetivos de este trabajo fueron: i) detectar esporas de más de una subespecie de *Bt* en granos de almacén ii) evaluar la toxicidad de esos *Bt* en *Spodoptera frugiperda* y *Shitophilus zeamais* iii) analizar la persistencia de esporas de *Bt* en grano de *Zea mays* en ambiente de almacén y expuestos a la intemperie.

Materiales y métodos

Origen de las muestras. Se colectaron 84 diferentes muestras de granos de almacén y residuos con diferente tiempo de almacenamiento de los mercados de San Juan, Independencia y Vasco de Quiroga localizados en la Ciudad de Morelia, estado de Michoacán, México.

Recuperación de las esporas de Bacillus thuringiensis. Para el aislamiento de las esporas de *Bt* se suspendió 1.0 g/de granos o residuos en tubos de 18X150 mm con 10.0 mL de NaCl 0.85% p/v (solución salina y detergente comercial al 0.001%), los tubos se agitaron/5.0 min en un vórtex (Thermolyne). Los granos con daño por insectos se trituraron y posteriormente con los granos enteros se pasteuriza-

ron a 65 °C/13 min, e inmediatamente se enfriaron durante 7 min en baño de hielo. Para aumentar la posibilidad de la recuperación de esporas de esas muestras se tomó 0.1 mL del pasteurizado y se inoculó en tubos con 10.0 mL de caldo nutritivo (Bioxon) g/L: peptona gelatina 5.0, extracto de carne de res 3.0 pH 6.9, luego se incubó por 24 h, y sembraron por estría en cajas con agar nutritivo (Bioxon) g/L: peptona gelatina 5.0, extracto de carne de res 3.0, agar 15.0, pH 6.9, las cajas con agar nutritivo se incubaron a 30 °C/72 h. Para buscar las colonias típicas de *Bt* y por microscopia de la luz detectar su cristal y espora característicos (Audtho *et al.* 1999, Sayyed *et al.* 2000).

Conservación de las esporas de Bacillus thuringiensis. Los aislados de *Bt* se sembraron en caldo nutritivo, se incubaron a 30 °C por 72 h, se suspendieron en NaCl 0.85% (solución salina), se mezclaron en turba estéril (121 °C por 2 h) en viales 4 mL con tapón de rosca, se mantuvieron en refrigeración a 10 °C para mantener la viabilidad de esas esporas (Luna-Olvera & Peña-Cabriales 1993, Sánchez-Yáñez 2007).

Microscopia electrónica de los aislados de Bacillus thuringiensis. Para la observación de las esporas y cristales producidos por *Bt1* y *Bt2* (código usado para su identificación) de los aislados de los granos y residuos almacenados. Se utilizó el microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL Modelo JSM 6400, del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas (IIM) de la Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Morelia, Mich, México. Para ello se tomó una asada de cada *Bt* y se fijó en una placa metálica (1 x 1 cm), luego las placas se sumergieron en glutaraldéhidro/45 min., y se deshidrataron en alcohol absoluto para la observación al MEB, se recubrieron con una capa de oro, y se tomaron las microfotografías 5000 y 10000 magnifi-

caciones (Itoua-Apoyolo *et al.* 1995, Schnepf *et al.* 1998)

Marcaje de los aislados y cepa de HD-1 de Bacillus thuringiensis. La persistencia de las esporas en los granos de *Zea mayz* en almacén y a la intemperie se seleccionó *Bt2*, por su abundancia y como comparación se usó la cepa comercial de *Bt* HD-1 (usada como referencia por ser una cepa standard para medir la toxicidad de las esporas/cristales de otras variedades de *Bt*, respecto a diversas órdenes de insectos). Se diseñaron tres medios de cultivo selectivos para la recuperación de las esporas de *Bt* con base a su patrón de susceptibilidad a los antibióticos de un Multidisco^{®MR} Gram positivo (Sanofi). La cepa HD-1 con resistencia a ampicilina en AN, agregada estéril por filtración con membrana millipore (Gelman, Co) en concentración de 1500 µg/mL (Lakeside), para recuperar *Bt1* al AN se adiciono ampicilina 850 µg/mL (Lakeside), para recuperar *Bt2* al AN se agregó 750 µg/mL del mismo antibiótico en la forma señalada. Para inhibir el crecimiento de hongos en el AN se usaron 100 U/mL de nistatina (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000; Ignoffo & Garcia 1978).

Producción y recuperación del complejo espora/cristal de Bacillus thuringiensis. Para la fermentación del complejo espora/cristal del aislado: *Bt1* y *Bt2* individualmente se crecieron en caldo soya triplicada o CST (Bioxon) e incubaron a 30 °C por 96 h para observar al microscopio el 95% de las esporas/cristales. El CST se centrifugo a 10000 rpm por 10 min, finalmente, el complejo espora-cristal de cada aislado se recuperó por el método de coprecipitación lactosa-acetona (Dumalge 1970, Dumalge *et al.* 1990).

Supervivencia de esporas de Bacillus thuringiensis en granos de almacén y expuestos al ambiente. Las esporas y cristales de *Bt1*, *Bt2* y *HD-1*, se ajustaron

a 4.0×10^6 esporas/semilla, se asperjaron en 300 granos de *Z. mays*. Estos granos se colocaron en costales de polipropileno de 150 x 100 cm, para simular la forma como se conserva en almacén, los costales se introdujeron en un espacio similar al ambiente de un almacén condiciones micro climáticas promedio fueron: temperatura de 20 °C humedad relativa del 10%. Para registrar el tiempo de supervivencia de las esporas, se analizaron 100.0 g de c/grano a intervalos de 24 h por la técnica de cuenta viable en placa, para facilitar la disgregación de las esporas unidas a los granos, la solución salina se sustituyó por una de triptona (Difco) al 0.1 % y 10 ppm de N-laurilsarocosine sodium salt o LSD (Sigma). Luego se determinó la densidad de la población de *Bt* en granos con y sin pasteurización. Además, en el *Z. mays* asperjado se expuso al ambiente abierto (intemperie) para registrar el efecto de la radiación solar sobre el tiempo de supervivencia de esas esporas de *Bt* a intervalos de 12 h, se tomaron 100.0 g de este grano de la manera descrita con los almacenados (Sánchez-Yáñez 2007, Itoua-Apoyolo *et al.* 1995)

Análisis estadístico. Se realizó con una prueba estadística t-Student comparación de medias de Tukey para analizar la persistencia esporas de *Bt* en los

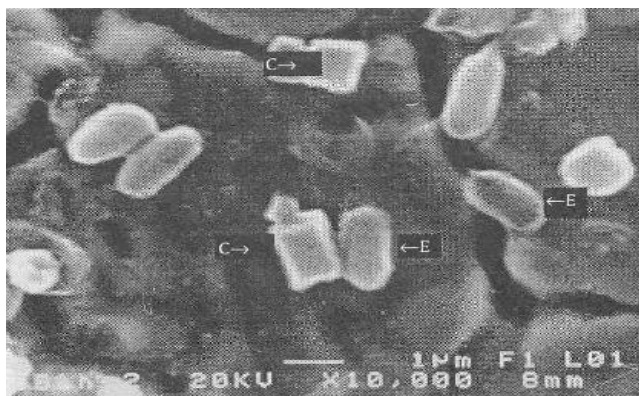


Figura 1 Micrografía electrónica de barrido de las esporas y cristales de tendencia bipiramidal producidos por *Bacillus thuringiensis* (*Bt2*) cultivo de 96h (10000X), tomada a 10000 magnificaciones. E= espora, C=cristal.

granos de *Z. mays* en ambiente de almacén así como en la intemperie (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Sánchez-Yáñez 2007).

Resultados

En la figura 1 se muestra la microfotografía electrónica de barrido de las esporas y cristales amorfos o los diferentes tipos de -endotoxina sintetizados por *Bt2* producidos en un cultivo de 96 h de incubación (Rowe *et al.* 1987, Schnepf *et al.* 1998, Dumalge *et al.* 1990). En la figura 2 se muestra una magnificación del cristal sintetizado por *Bt1*, recuperado de granos en almacén. En ella se observan cristales rectangulares cúbicos e incluso amorfos, evidencia que sugiere que en los granos en almacén podría existir más de una variedad de *Bt* distinta a la *morrisoni*, como la *kurstaki* que normalmente no se recupera de ambientes distintos a la de los granos almacenados (Martin & Travers 1989, Meadows *et al.* 1992).

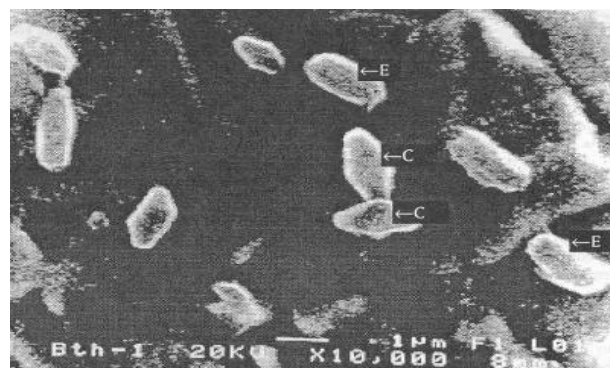


Figura 2 Micrografía electrónica de barrido de las esporas y cristales de tendencias bipiramidal producidos por el aislado *Bacillus thuringiensis* (*Bt1*) cultivo de 96h (10000X), tomada a 10000 magnificaciones.

E=espora, C=cristal.

La tabla 1 muestra el análisis bacteriológico de 84 diferentes granos y sus residuos obtenidos de almacenes para su conservación, usados como fuente de aislamiento de los *Bt*, observados al microscopio electrónico de barrido se detectaron dos tipos morfológicos de cristales como se muestra en las microfotografías al MEB señaladas en la figura 1, con cristales bipiramidales típicos de algunas variedades

de *Bt2* que intoxican lepidópteros como la subespecie *kurstaki* (Rowe *et al.* 1987, Herrero *et al.* 2001a) mientras que en la figura 2 se observan el complejo espora-cristal que generalmente son similares a lo reportado para *Bt* recuperados de ambientes cerrados como las subespecie *morrisoni* de *Bt* (Martin & Travers 1989, Meadows *et al.* 1992)

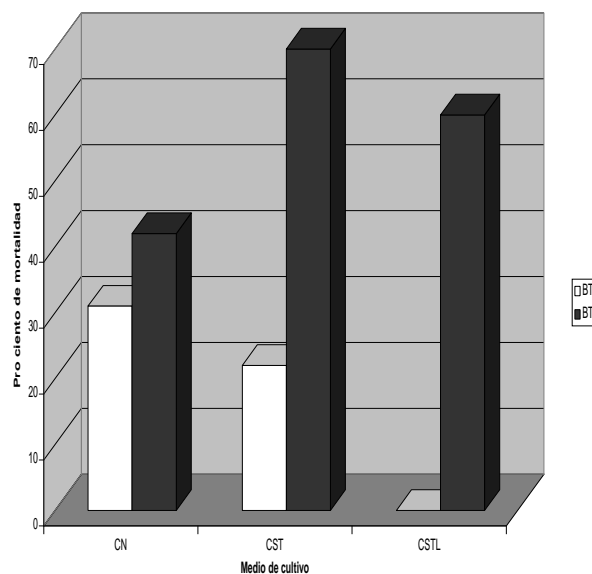
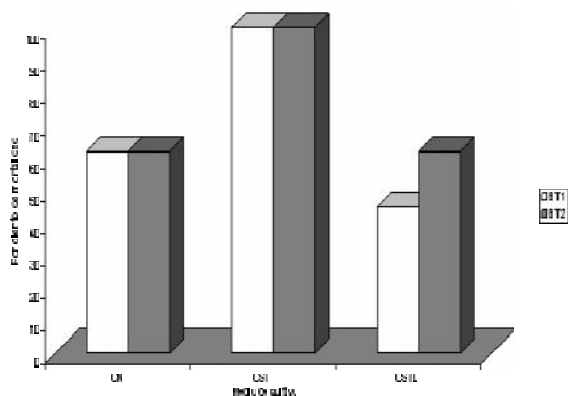
Tabla 1 Frecuencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en granos almacenados y sus residuos del Municipio de Morelia, Mich, México

Número de muestras y origen	Número y tipo de granos	Número y por ciento de aislamiento
5 bodegas rurales (2 días de almacenamiento)	10 <i>Triticum aestivum</i>	0(0%)
	10 <i>Sorgum vulgare</i>	0(0%)
	5 <i>Zea mays</i>	3(3.57%)
5 vendedores a granel (1 mes de almacenamiento aproximadamente)	25 <i>Helianthus annuus</i>	3(4.03%)
	25 <i>Lens culinaris</i>	0(0%)
3 residuos de almacén (1 mes de almacenamiento aproximadamente)	3 polvo de almacén	2(2.0%)
	6 granos deteriorados diversos (<i>Z. mays</i> , <i>S. vulgare</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>H. annuus</i> , <i>L. culinaris</i>)	0(0%)
Total= 13	84	5.9%

En la figura 3 se muestra que *Bt1* y *Bt2* cultivados en CST generaron complejo espora cristales que causaron un 100% de mortalidad en *S. frugiperda* que corresponde a *Bt* var. *kurstaki* (Itoua-Apoyo *et al.* 1995, Audtho *et al.* 1999).

Figura 4 Toxicidad del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (1 y 2) en diferentes medios de cultivo contra *Sitophilus zeamais* en granos de *Zea mays*. CN=Caldo nutritivo, CST= Caldo soya triptica-sa, CSTL= Caldo soya triptica-sa lactosa

Figura 3 Toxicidad del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (1 y 2) en diferentes medios de cultivo contra *Spodoptera frugiperda* CN=Caldo nutritivo, CST= Caldo soya triptica-sa, CSTL= Caldo soya triptica-sa lactosa



En tanto que ambos *Bt* reproducidos en CN sintetizaron un complejo espora cristales menos tóxicos contra *S. frugiperda* con un 60% de mortalidad, algo similar se observó cuando estos aislados se crecieron en CSTL, *Bt1* produjo el complejo espora/cristal de baja toxicidad contra *S. frugiperda* con un 40% de mortalidad. Mientras que *Bt2* mantuvo el 60% en el mismo lepidóptero, resultado de la composición química del medio de reproducción (Rausell *et al.* 2000, Schnepf *et al.* 1998, Dumalge *et al.* 1990).

En la figura 4 se presenta como el complejo espora-cristal de *Bt1* fue tóxico para *Shitophilus zeamais* en función de la composición química del medio de cultivo en el que se reprodujo (Dumalge 1970, Klanfon & De Barjac 1985, Sayyed *et al.* 2000, mientras que en el CN el por ciento de mortalidad

fue del 30%, cuando *Bt1* se creció en CST tuvo toxicidad del 18%; en contraste al cultivado en CSTL no causó ninguna mortalidad en larvas de *S. zeamais*.

Estos resultados apoyan que de acuerdo con la toxicidad del complejo esporas/cristales son específicos para determinados ordenes de IP (Rowe *et al.* 1987, Schnepf *et al.* 1998, Dumalge *et al.* 1990), e indican que se trata de una variedad de *Bt* diferente a *kurstaki* (Rowe *et al.* 1987, Georghiou 1990, Maagd *et al.* 2000) y que se mostró en las microfotografías electrónicas de barrido, está subespecie sintetiza un tipo de cristal no romboide típico, el más conocido para *Bt* var. *kurstaki* (Herrero *et al.* 2001a, Herrero *et al.* 2001b, Tabashnik *et al.* 2000).

Tabla 2 Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt1* y *Bt2*) comparado con *B. thuringiensis* var *kurstaki* (HD-1) asperjados en granos de *Zea mays* en almacén y expuesto a la intemperie

Tiempo (días)	<i>Bt1</i> expuesto	<i>Bt</i> HD-1	<i>Bt2</i> almacén	<i>Bt</i> HD-1
	UFC x 10 ⁶ /g <i>Z. mays</i>	expuesto UFC x 10 ⁶ /g <i>Z. mays</i>	UFC x 10 ⁶ /g <i>Z. mays</i>	Almacén UFC x10 ⁶ /g <i>Z. mays</i>
0	3.5 ^a	3.5 ^a	3.5 ^a	3.5 ^a
2	3.0 ^a	3.5 ^a	3.0 ^a	3.0 ^a
4	3.5 ^c	3.0 ^a	3.0 ^a	3.0 ^a
6	3.4 ^a	2.5 ^b	3.1 ^a	3.0 ^a
8	3.0 ^a	2.6 ^b	3.1 ^a	3.0 ^a
10	2.5 ^b	2.5 ^b	2.0 ^b	2.5 ^b
12	2.0 ^b	1.5 ^c	2.1 ^b	2.0 ^b
14	2.0 ^b	1.0 ^c	2.1 ^b	2.0 ^b
16	1.5 ^c	1.0 ^c	2.1 ^b	2.0 ^b
18	0.0	0.0	2.1 ^b	2.0 ^b
20	0.0	0.0	2.10 ^b	2.0 ^b
21	0.0	0.0	2.00 ^b	2.0 ^b

*Letras iguales sin diferencia estadística según Tukey (P<0.01), CV 10%. Datos ambientales: material ~ métodos.

La tabla 2 se presenta el tiempo de supervivencia de las esporas de *Bt2* y *Bt* var. *kurstaki* HD-1 en granos de *Z. mays* almacenados a temperatura promedio de 20 °C±1 y humedad relativa del 10%. Mientras que

a la intemperie la temperatura mínima fue 10 °C a las 5 AM, de 25 °C a las 12 AM, de 35 °C a las 16 pm, con una humedad relativa de 40%, entre las 17-19 pm y del 30% en el resto del tiempo. Se observó

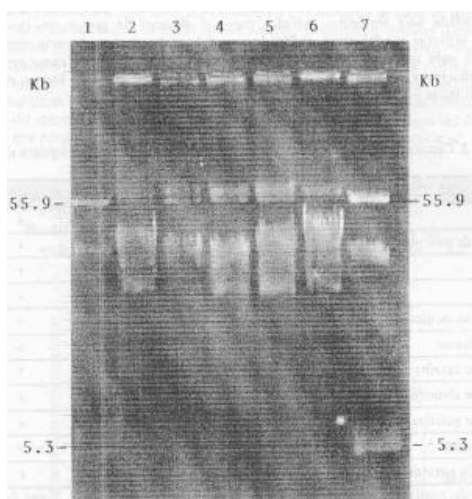
que las esporas de *Bt1* y *Bt2* así como las HD-1 fueron viables más tiempo cuando los granos de *Z. mays* se almacenaron por más de 21 días, (en la tabla se omitió la relación de la supervivencia de las esporas de *Bt1* en almacén, porque no fue estadísticamente diferente a lo registrado con *Bt2*). En evidente contraste con el menor tiempo de supervivencia de las esporas de *Bt* expuestas a la radiación solar responsable del efecto biocida, ya que a los 18 días posteriores del inicio del ensayo ya no se detectaron esporas viables de *Bt* en ningún caso (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Griego & Spence 1978).

En la tabla 3 se muestra el perfil bioquímico complementario usado en la identificación de los *Bt* de granos de almacén como la subespecie *morrisoni*, con diferencia en la capacidad de hidrólisis de caseína, en los aislados de *Bt* de esta investigación, este dato fisiológico al igual que la toxicidad de los cristales contra *S. zeamais*, y el tipo morfológico de cristales observados, en los medios de cultivo usados en la generación del complejo espora/cristal, y reafirma que se trata de una variedad de *Bt* diferente a *kurstaki* (Dumalge et al. 1990).

Tabla 3 Comparación del perfil bioquímico de *Bacillus thuringiensis* de granos almacenados y *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni***

Característica	<i>Bt. morrisoni</i> **	<i>Bt2</i> de almacén
Movilidad	+	+
Formación de película	+	+
Catalasa	+	+
Ureasa	-	-
Fermentación de glucosa	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Hidrólisis de Caseína	+	-
Hidrólisis de Almidón	+	+
Citrato Simmons	+	+
Reducción de Nitratos	-	-

Figura 5 Gel de agarosa que muestra el patrón de plásmidos de *Escherichia coli* V%17 (carriles 1 y 7) de *Bacillus thuringiensis* de granos almacenados, *Bt1* (carril 2) *Bt2* (carril 3) *Bt3* (carril 4) *Bt4* (carril 5) y *Bt5* (carril 6)



En la figura 5 se muestra el gel de agarosa con los plásmidos de *Bt* aislados de granos en almacén, de acuerdo con el método de extracción de ADN extra cromosómico (Kieser 1984), después de que *Bt* se cultivó en CN con naranja de acridina y el SDS para la eliminación de los plásmidos para luego repetir la extracción del ADN (Kieser 1984). Resultado de este ensayo estos plásmidos ya no se detectaron, aunque *Bt* creció normalmente en CN, además de que no formaron los típicos cristales. Con lo que se demostró que la síntesis de estos plásmidos y cristales estaban directamente relacionados, como la señala literatura para las subespecies o variedades de

Bt (Hua *et al.* 2001, De Amorin *et al.* 2001, Griego & Spence 1978).

Discusión

De acuerdo con lo reportado con los resultados mostrados basados en la morfología ultramicroscópica de los cristales de *Bt*, la toxicidad del complejo espora/cristal contra *S. frugiperda* y *S. zeamais*, el perfil bioquímico, sugiere la existencia de una subespecie de *Bt* var. *morrisoni* en granos almacenados. Con el bioensayo horizontal se probó que *BtI* causo una mortalidad de un 90% en *S. frugiperda* un IP de cultivos agrícolas en campo abierto (Lightwood *et al.* 2000, Kaelin *et al.* 1994), al MEB la morfología de sus cristales sugiere que *BtI* pertenece a la var *kurstaki* (de Maagd *et al.* 2000, Schnepf *et al.* 1998). Similar a lo reportado para *Bt* subespecie *morrisoni* (Rowe *et al.* 1987, Herrero *et al.* 2001a, Herrero *et al.* 2001b). Es probable que el movimiento de los granos desde el campo hasta el almacén haya facilitado su contaminación con esporas de *Bt* subespecie *kurstaki* y la *morrisoni* a pesar de que ambas variedades sean distintas, su viabilidad es relativamente corta cuando se exponen a la luz, consecuencia de que parte de la proteína que se destina para el cristal se suprime de la cubierta de la espora, lo que la hace susceptible a la acción biocida de la luz solar (Ignoffo & Garcia 1978, Martin & Travers 1989, Benoit *et al.* 1990, Griego & Spence 1978), en especial cuando no se almacenan, en contraste si los granos colectados evitan la luz solar, existe evidencia de que podrían preservarse en un almacén desde semanas a meses (Rowe *et al.* 1987, Luna-Olvera & Peña-Cabriales 1993), esta ruta es una forma de dispersión de las esporas (Lambert & Peferoen 1992, Schnepf *et al.* 1998), la presencia de más de una subespecies de *Bt* en granos se ha hipotizado y

depende del momento de almacenamiento independientemente del tipo y tamaño de los granos (Rowe *et al.* 1987, Klanfon & De Barjac 1985). En esta investigación fue relativamente sencillo determinar el por ciento de aislamiento de las esporas de *Bt* a partir de los diversos granos, este porcentaje fue diferente o mayor al que se reporta en ambientes abiertos (expuestos a la luz solar) como el agua, el suelo o las hojas de plantas (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Martin & Travers 1989, Lambert & Peferoen 1992, Luna-Olvera & Peña-Cabriales 1993). Existe cierta tendencia a detectar el mayor porcentaje de recuperación de esporas de *Bt* en almacén (Meadows *et al.* 1992). Alguna información señala que granos recién cosechados expuestos a la luz directa del sol, contenían un número limitado o nulo de esporas viables de *Bt* (Pinnock *et al.* 1974, Ignoffo & Garcia 1978, Griego & Spence 1978), pero aquellos colectados y almacenados inmediatamente por más de 2 a 3 semanas, se les detectaron esporas viables de *Bt* (Meadows *et al.* 1992, Kaelin *et al.* 1994, Smith & Couche 1991). Esto hace suponer que el periodo de cosecha de granos es crítico por el contacto con los insectos saprobios, los pájaros y sus desechos que transportan esporas de *Bt* (Rowe *et al.* 1987, Luna-Olvera & Peña-Cabriales 1993), y sugiere que el almacenamiento de los granos favorece la viabilidad y diversidad de subespecies de esporas de *Bt*, al igual que la baja humedad (Martin & Travers 1989, Lambert & Peferoen 1992). Aunque no se ha afirmado categóricamente también se hipotiza que en ausencia de luz solar la persistencia de las esporas es mayor que expuestas a la radiación solar (Benoit *et al.* 1990, Griego & Spence 1978), además sugiere que los granos almacenados contienen esporas de diferentes subespecies de *Bt* (Rowe *et al.* 1987, Schnepf *et al.* 1998, Benoit *et al.* 1990). Este hecho se probó en la actual inves-

tigación, dado que se detectaron cristales con morfología: romboidales o bipiramidales y amorfos como se muestra en las microfotografías al MEB mostradas en las figuras 1 y 2 recuperados en diversos granos y los residuos, una características morfológica definida en las distintas subespecies de *Bt* (Herrero *et al.* 2001a, De Maagd *et al.* 2000, Meadows *et al.* 1992, Klanfon & De Barjac 1985), al igual que en los lugares relacionados con la industria de alimentos para animales de granja (Kaelin *et al.* 1994, Dumalge 1970, Klanfon & De Barjac 1985). Otra evidencia de la existencia de más de una subespecies de *Bt*, fueron bioensayos horizontales con *S. frugiperda* y *S. zeamais* (Sayyed *et al.* 2000, Hua *et al.* 2001, Tabashnik *et al.* 2000, Wirth 2001) En principio porque *Bt* sintetiza una clase específica de cristales entomotóxicos acorde con las distintos órdenes de IP, por lo que la diferencia en la toxicidad de la δ -endotoxina es dependiente de la variedad de *Bt*, de su origen y el medio de cultivo que se usa para la síntesis de ese complejo espora-cristal. Este hecho se comprobó en el bioensayo horizontal realizado para *S. frugiperda* y *S. zeamais*, ahí los aislados de *Bt* en función de la composición química del medio de reproducción, en especial el CST, ahí generaron los complejos esporas/cristales tóxicos contra estos dos IP, a pesar de pertenecer a órdenes de insectos: lepidóptera y coleóptera, lo que apoyo la identificación de una subespecie de *Bt* diferente a la reportada para ambientes de almacén de granos como la var. *kurstaki* y/o las fábricas de alimentos de ganado y aves como la var. *Morrisoni* (Rowe *et al.* 1987, Martin & Travers 1989, Lambert & Peferoen 1992, Meadows *et al.* 1992). Finalmente comportamiento bioquímico de algunos de estos aislados fue similar al de la subespecie *morrisoni* de *Bt*. Mientras la otra fue análoga a la ampliamente distribuida en la naturaleza conocida como *kurstaki*

(datos no mostrados) (Audtho *et al.* 1999, De Amorin *et al.* 2001, Guerchicoff *et al.* 2001).

Por otro lado, los resultados de este trabajo sugieren que es necesario investigar sobre la síntesis de esporas-cristales de los nuevos aislados de *Bt* recuperados de diversas fuentes como los granos y sus residuos en almacén, tanto en medios de cultivo artificiales como naturales (Klanfon & De Barjac 1985, Sayyed *et al.* 2000, Dumalge 1990). Dado que 3 aislados de *Bt* de la subespecie *israelensis* reproducidos en 6 medios de cultivo en concentraciones variables de azúcares y proteínas genero la síntesis de esporas y cristales con diferente grado de toxicidad para mosquitos (Rowe *et al.* 1987, Georghiou 1990, Dumalge *et al.* 1990).

La viabilidad de las esporas de ambos aislados de *Bt* fue mayor en el almacén y restringida cuando *Z. mays* se expuso al ambiente abierto (Sánchez-Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Pinnock *et al.* 1974), la literatura al respecto indica que la muerte de las esporas fue causada por la acción germinada de la luz solar, asociada con la carencia de las pequeñas proteínas solubles en el ácido (PPSA) que forman parte de la cubierta de las esporas de *Bt*; estas PPSA proporcionan a las esporas tolerancia a la radiación solar (Ignoffo & Garcia 1978, Benoit *et al.* 1990, Griego & Spence 1978). Con base en lo anterior se justifica porque a nivel de campo en el eficaz control de un específico IP; el complejo espora cristal deberá aplicarse exclusivamente cuando la mayor por ciento de los huevecillos del IP estén eclosionando, y darle un tiempo suficiente de consumo del material foliar con el complejo espora/cristal de *Bt*; principalmente durante las primeras horas del día y/o por la tarde cuando la radiación solar es menor que al mediodía (Lambert & Perefon 1992), cuando la exposición del complejo espora/cristal a esa radiación destruye y desnaturalizan ambos (Sánchez-

Yáñez & Peña-Cabriales 2000, Ignoffo & Garcia 1978). Lo anterior justifica el empleo de complejos espora/cristal encapsulados de *Bt*, que aumentan la eficacia del control biológico de IP agrícola, forestales y urbanos (Rowe *et al.* 1987, Rausell *et al.* 2000, Schnepf *et al.* 1998).

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación se apoya que en almacén de granos independientemente del tipo, origen y en especial de la ausencia de luz, con mínima de humedad y baja actividad depredatoria de microorganismos que eliminen las esporas de *Bt*; se favorece la existencia y supervivencia de más de una variedad de *Bt*. La supervivencia de las posibles subespecies de las esporas de *Bt* en los granos de *Z. mays*, fue directamente dependiente de su exposición a la radiación solar, en contraste con la persistencia relativamente prolongada en los granos *Z. mays* almacenados. Estos resultados que apoyan innovadoras formas de aplicación de los complejos esporas/cristales de *Bt*, que toleran efectos letales de la radiación solar para mejorar la eficacia del control biológico de IP en el campo, en el bosque y en la ciudad que eviten la proliferación de insectos vectores transmisores de enfermedades como el dengue, el paludismo y el chikungunya; en lugar de los convencionales y contaminantes plaguicidas químicos de riesgo para la salud humana.

Conflictos de intereses

Esta investigación no tiene conflictos de interés en relación con quien la realizó y apoyó.

Agradecimientos

Al proyecto 2.7 (2016) de la CIC de la UMSNH. Al Instituto de Investigaciones Metalúrgicas-UMSNH

por las facilidades del microscópico de barrido y su técnico Francisco Solario. A Beatriz Noriega-Gamboa por su paciencia en la elaboración de las figuras. A BIONUTRA, S.A. de CV, Maravatio, Mich, México.

Literatura citada

- Amador RAL, Boschini FC. Fenología productiva y nutricional de maíz para la producción de forraje. *Agron Mesoam.* 2000; 11(1): 171-7.
- Audtho M, Valaitis AP, Alzate O, Dean DH. Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 -endotoxin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(10): 4601-5.
- Benoit TG, Wilson GR, Bull DL, Aronson AI. Plasmid-associated sensitivity of *Bacillus thuringiensis* to UV light. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(8): 2282-6.
- De Amorim GV, Whittome B, Shore B, Levin DB. Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1-like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(3): 1035-43.
- De Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Stiekema W, Bosch D. *Bacillus thuringiensis* delta-endo toxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:1559-63.
- Dulmage HT, Correa JA, Gallegos-Morales G. Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. 1990. p. 110-133. /n.' H. de Barjac and D. J. Sutherland

- (eds.). Bacterial control of mosquitoes and black flies. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NJ.
- Dulmage HT. Production of the spore- -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J Invertebr Pathol.* 1970; 16(3): 385-9.
- Georghiou GP. Overview of insecticide resistance. ACS Symposium series. American Chemical Society (USA); 1990. p. 18-41.
- Griego VM, Spence KD. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl Environ Microbiol.* 1978; 35(5): 906-10.
- Guerchicoff A, Delécluse A, Rubinstein CP. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(3): 1090-6.
- Herrero S, Ferré J, Escrache B. Mannose Phosphate Isomerase Isoenzymes in *Plutella xylostella* Support Common Genetic Bases of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins in *Lepidopteran* Species. *Appl Environ Microbiol.* 2001a; 67(2): 979-81.
- Herrero S, Oppert B, Ferré J. Different Mechanisms of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Indian meal Moth. *Appl Environ Microbiol.* 2001b; 67(3): 1085-89.
- Hua G, Masson L, Jurat-Fuentes JL, Schwab G, Adang MJ. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(2): 872-9.
- Ignoffo CM, Garcia C. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. *Environ Entomol.* 1978; 7(2): 270-2.
- Itoua-Apoyolo C, Drif L, Vassal JM, Debarjac H, Bossy JP, Leclant F, et al. Isolation of Multiple Subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a Population of the European Sunflower Moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(12): 4343-7.
- Kaelin P, Morel P, Gadani F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(1): 19-25.
- Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid.* 1984; 12(1): 19-36.
- Kiselek EV. Survival of bacterial entomopathogens in tree crowns and in soil around the trunk. *Vestn Selskokhoz Nauki (Moscow).* 1974; 5: 68-71.
- Klanfon AR, De Barjac H. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Entomophaga.* 1985; 30(2): 177-86.
- Lambert B, Peferoen M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience.* 1992; 42(2): 112-22.
- Lightwood DJ, Ellar DJ, Jarrett P. Role of Proteolysis in Determining Potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac -Endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(12): 5174-81.
- Luna-Olvera H, Peña-Cabrales J. Ecología de *Bacillus thuringiensis*. En *Avances Recientes en la Biotecnología en Bacillus thuringiensis*. Editores LJ Galán-Wong et al. 1993. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. México 1993: 179-85.
- Martin PA, Travers RS. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates.

- Appl Environ Microbiol. 1989; 55(10): 2437-42.
- Meadows MP, Ellis DJ, Butt J, Jarrett P, Burges HD. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl Environ Microbiol. 1992; 58(4): 1344-50.
- Moir A, Smith DA. The genetics of bacterial spore germination. Annu Rev Microbiol. 1990; 44(1): 531-53.
- Pinnock DE, Brand RJ, Jackson KJ, Milstead JE. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. J Invertebr Pathol. 1974; 23(3): 341-6.
- Rausell C, Martinez-Ramirez AC, García-Robles I, Real, MD. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(4): 1553-8.
- Rowe OE, Margaritis A, Dimalge HT. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. Crit Rev Biotechnol. 1987; 6(1): 87-127.
- Sánchez-Yáñez J. Breve Tratado de Microbiología Agrícola Teoría y Práctica. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CO-SUSTENTA, SA de CV, Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán, Morelia, Mich México. 2007: 130-3.
- Sánchez-Yáñez JM, Peña-Cabriales J. Persistencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz, de frijol y en el suelo. Terra Latinoam. 2000; 18(4): 325-31.
- Sayed AH, Haward R, Herrero S, Ferré J, Wright DJ. Genetic and Biochemical Approach for Characterization of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in a Field Population of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(4): 1509-16.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62(3): 775-806.
- Smith RA, Couche GA. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl Environ Microbiol. 1991; 57(1): 311-5.
- Tabashnik BE, Liu YB, de Maagd RA, Dennehy TJ. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4582-4.
- Wirth MC, Delécluse A, Walton WE. Lack of cross-resistance to Cry19A from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(4): 1956-18.