

Te
u y y
K107
S. 873
1990

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

AISLAMIENTO DE CEPAS DE B. THURINGIENSIS PROPIAS DE
GUATEMALA Y CARACTERIZACION DE LA ENDOTOXINA

NINA MARIE STAUDER RAMIREZ

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Guatemala

1990



AISLAMIENTO DE B. THURINGIENSIS
PROPIAS DE GUATEMALA
Y CARACTERIZACION
DE LA
ENDOTOXINA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

AISLAMIENTO DE CEPAS DE *B. THURINGIENSIS* PROPIAS DE
GUATEMALA Y CARACTERIZACION DE LA ENDOTOXINA

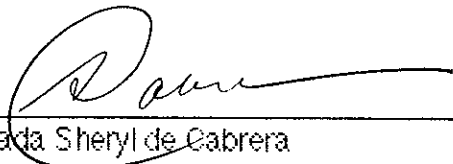
Nina Marie Stauder Ramírez

Trabajo de investigación para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica

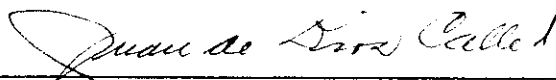
Guatemala


1990

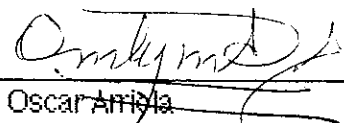
Yo. Bo. :

(f) 
Licenciada Sheryl de Cabrera
Asesora

Tribunal :

(f) 
Dr. Juan de Dios Calle

(f) 
Lic. Sheryl de Cabrera

(f) 
Ing. Oscar Amisla

Fecha de Aprobación: 19 de octubre de 1990.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a las personas que me apoyaron y colaboraron conmigo en la elaboración de la tesis y en especial,

al Ing. Carlos Rolz, por la oportunidad de trabajar en ICAITI,

a la Lic. Sheryl de Cabrera, por asesorar mi tesis,

al Dr. Juan de Dios Calle, por sus enseñanzas,

al Dr. Luján, a la Lic. Michelle Mury y al Sr. Gabriel Guzmán por su ayuda en la electroforesis.

al Ing. Ronald Estrada y Sra. por haberme proporcionado las larvas de *S. sunia*

A todos, muchas gracias.

A mis padres con mucho cariño,

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Historia	3
B. Propiedades Biológicas	4
1. Taxonomía	4
2. Fisiología	7
a. Requerimientos Nutricionales	7
3. Modo de Acción	8
C. Bioquímica del Cristal	11
1. Origen y Función del Cristal	11
2. Propiedades Químicas y Físicas	13
a. Solubilidad	13
b. Técnicas de Purificación	14
c. Composición Química	15
d. Electroforésis	15
e. Proteasas Contaminantes	16
3. Genética	16
4. Toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i>	17
D. Aplicaciones en la Agricultura	18

	Páginas
III. HIPOTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
V. JUSTIFICACIONES	22
VI. METODOS	23
VII. RESULTADOS	34
VIII. DISCUSIONES	43
IX. CONCLUSIONES	50
X. RECOMENDACIONES	51
XI. BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS	
1. Lugares de recolección de las muestras	55
2. Lugares de aislamiento de B.T. y tamaño de los cristales aislados	58
3. Análisis estadístico de los datos obtenidos en los bioensayos	62
4. Análisis de la Electroforesis	66
5. Proteínas encontradas en la electroforesis de los cristales de las distintas cepas de B.T.	67
6. Electroforesis de los cristales de B.T.	69
7. Programas utilizados	70

INTRODUCCION

Debido a los grandes problemas asociados con el uso extensivo de insecticidas químicos en la agricultura, ha sido necesaria la búsqueda de otras fuentes para el control de plagas. Los insecticidas microbiológicos ofrecen una buena alternativa, pues son muy específicos, no afectan a otros organismos ni al medio ambiente, y en el manejo integrado de sistemas de control de plagas, pueden reducir la dependencia de insecticidas químicos.

De las bacterias entomopatógenas, el *E. thuringiensis* es una de las más conocidas, siendo utilizada comercialmente en la actualidad. Se han aislado 22 subespecies o serotipos de acuerdo a su antígeno flagelar H, y éstas varían en sus propiedades bioquímicas, así como los insectos que atacan.

La actividad insecticida del *E. thuringiensis* está asociada con un cristal glicoproteico sintetizado dentro del organismo durante el ciclo de esporulación. En su forma nativa, la glicoproteína es una pro-toxina, que al ser solubilizada e hidrolizada por las proteasas dentro del insecto susceptible, se transforma en la toxina. El cristal es soluble, únicamente, en pH alcalino, lo que le confiere una alta especificidad como bioinsecticida: únicamente afectará a lepidópteros con pH mayor de 10 en el intestino.

La investigación tuvo como propósito el aislamiento de cepas de *E. thuringiensis* encontradas propiamente en Guatemala y la caracterización de la endotoxina de tres de las cepas aisladas. Las pruebas de toxicidad se hicieron contra el lepidóptero *Spodoptera sunia*, larva conocida como "prodenia" que afecta muchos cultivos de algodón.

La separación del cristal de las esporas y los desechos celulares se hizo por centrifugación en gradientes de densidad utilizando Urografina 100% (un agente de contraste), y el peso molecular de los cristales se determinó con base en el patrón electroforético mostrado en geles de poliacrilamida (sistema SDS-PAGE).

Todo el análisis de las cepas aisladas se hizo con base en comparaciones hechas con la toxina producida por una variedad conocida de *E. thuringiensis*: var. morissoni (B - 4049). Los cristales producidos por estas variedades fueron los más parecidos en tamaño y forma a los cristales encontrados en las cepas aisladas.

El proyecto se dividió en tres etapas:

- 1) El aislamiento de *E. thuringiensis* de muestras de tierra obtenidas en bodegas de granos y mercados en distintas regiones del país.
- 2) La separación y caracterización de la endotoxina de las cepas anteriores, utilizando electroforesis comparativa en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- 3) Prueba de la capacidad insecticida de algunas de las cepas aisladas, mediante bioensayos hechos contra larvas de *Spodoptera sunia*.

II. ANTECEDENTES

A. Historia del *B. thuringiensis*:

El *B. thuringiensis* fue identificado en 1902 por Ishiwata, cuando estudiaba la enfermedad de "sotto" en el gusano de seda *Bombyx mori* en Japón (1); el organismo que infectaba el gusano era conocido como "bacilo de la enfermedad de sotto". Más tarde fue aislado por Berliner y Mattes (1927). Fue Berliner quien lo nombró *Bacillus thuringiensis*, derivando el nombre de la provincia alemana de Thuringia, y ambos describieron la presencia de un cuerpo de inclusión dentro de las células en proceso de esporulación (1).

A partir de 1930 se iniciaron estudios para la utilización comercial del *B. thuringiensis* como insecticida (1). La primera preparación fue desarrollada en Francia, con el nombre de "Sporene" (6). Luego desarrollaron otros productos similares (Bactospeine, Biosper, Entobacterin, Parasporin, Thuricide, etc.), pero su efectividad era muy dependiente de las propiedades físicas y biológicas de las formulaciones. Los resultados en el campo no eran constantes (5).

No fue sino hasta 1969 que un producto comercialmente estable salió al mercado en los Estados Unidos utilizando la *var. kurstaki* HD-1. Fue con esto que se creó un nuevo ímpetu para continuar con nuevas investigaciones (5).

B. Propiedades Biológicas:

El *B. thuringiensis* es una bacteria gram positiva, aerobia, formadora de esporas, la cual sintetiza un cristal parasporal glicoproteico durante su ciclo de esporulación, que es tóxico contra insectos de varios órdenes (dependiendo de la especie) (7). El cristal representa del 20 al 30 % del peso seco de la célula, y esto lo diferencia de otras especies relacionadas.

Existen varias subespecies de *B. thuringiensis*; éstas varían tanto en el tipo de toxina que producen, así como en la especificidad del huésped que atacan (1). La mayoría de los serotipos conocidos producen cristales tóxicos contra larvas de lepidópteros (mariposas y palomillas); otras variedades (*var. israeliensis* y *var. kyushuensis*) son activas contra dípteros (mosquitos y *musca domestica*); una subespecie (*var. tenebrionis*) es tóxica contra larvas de coleópteros; y otras (*var. finitimus, pakistani, dakota, indiana*, etc.) producen los cristales, pero no son tóxicas (14).

La mayoría de los *B. thuringiensis* son tóxicos contra lepidópteros y producen un cristal bipiramidal característico muy bien definido. Sin embargo, existen informes sobre otras formas del cristal: truncadas, rómbicas, cúbicas o en forma de cuña. La forma del cristal esta influenciada por la subespecie de *B. thuringiensis* y los componentes del medio en que crece (10).

1. Taxonomía:

Dentro del género *Bacillus* existen 3 especies muy relacionadas entre sí: *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis*. Encontradas, comúnmente, en la tierra,

es difícil diferenciarlas con pruebas bacteriológicas rutinarias. El análisis de hibridación DNA-DNA, entre estas especies, muestra de un 80 a un 100 % de homología. La presencia del cristal parasporal ha sido la base de identificación de una especie como *E. thuringiensis* (1).

El *E. thuringiensis* está dividido en variedades o subespecies según:

1) su antígeno flagelar H, 2) la forma y el tamaño del cristal, 3) ciertas características fenotípicas y 4) los perfiles de DNA.

Se han descrito más de 22 subespecies, y todas varían tanto en toxicidad, como en el rango de insectos que atacan. Existen variaciones en los cristales y diferencias metabólicas bien marcadas dentro de subespecies con el mismo serotipo (1); es por esto que las propiedades serológicas no se pueden correlacionar con la toxicidad y la composición química de los cristales (2).

Una de las colecciones más grandes de *E. thuringiensis* es la del Dr. Howard T. Dulmage, del Departamento de Agricultura en Brownsville Texas, E.E.U.U (1). Las cepas que se guardan en esta colección se asignan con el prefijo HD antes del número que indica su posición en la colección.

Otra clasificación utilizada para diferenciar entre subespecies se basa en la patogenicidad: la capacidad entomocida de las variedades a insectos de distinto orden (2).

A pesar de los problemas asociados con la clasificación taxonómica, la diferenciación por antígenos flagelares es y seguirá siendo la base para la identificación entre subespecies de *E. thuringiensis* hasta que nuevos y mejores métodos sean desarrollados (1).

TABLA # 1

Clasificación de *E. thuringiensis* según su número en la colección del Dr. Dulmage, su antígeno flagelar H y el serotipo del cristal *

Numero de la colección NRRL HD-	Nombre de la cepa	Antígeno Flagelar H	Serotipo Cristal
1	kurstaki	3a3b	k-1
172	kurstaki	3a3b	k-1, thu, aiz
2	thuringiensis	1	thu
3	finitimus	2	NI
4	alesti	3a	ale
5	kenyae	4a4c	ken
6	sotto	4a4b	NI
7	dendrolimus	4a4b	den
8	galleriae	5a5b	gal
9	entomocidus	6	NI **
10	subtoxicus	6	sub
11	aizawai	7	aiz
12	morrisoni	8a8b	NI **
13	tolworthi	9	NI **
14	thuringiensis	1	k-1
16	alesti	3a	NI **
498	damstadiensis	10	dar
567	israeliensis	14	isr
571	kyushuensis	11a11c	NI **
826	canadiensis	5a5c	NI **

* datos tomados de: *E. thuringiensis* Cultures available From the U.S. Department of Agriculture, March 1988.

** NI : No identificado

2. Fisiología :

Las células vegetativas del *E. thuringiensis* tienen forma de varilla, de 2 - 5 μm de largo y 1 μm de ancho. Crecen óptimamente a temperaturas de 28° a 30°C, con aireación continua a 250 revoluciones por minuto (rpm). Una aireación inadecuada, suprime la razón de velocidad de crecimiento, la producción del cristal, y la esporulación (1).

a. Requerimientos Nutricionales:

Los requerimientos nutricionales son relativamente sencillos. De los medios estudiados para su crecimiento, el Medio Basal (MB) descrito por Nickerson y Bulla (9), proporciona las mejores condiciones para el crecimiento, esporulación y formación del cristal en la mayoría de subespecies del *E. thuringiensis*. El MB es un medio definido químicamente a base de sales y glucosa, suplementado con citrato al 0.2% para complementar la fuente de carbono en el medio.

El citrato promueve la síntesis de ácidos grasos necesarios para el crecimiento bacteriano. Se cree que es uno de los factores reguladores de la enzima alostérica Acetil Co A carboxilasa, encargada de catalizar el paso determinante de la velocidad en la síntesis de ácidos grasos (2). Cualquiera que sea la función del citrato, se ha observado que no hay un buen crecimiento de la bacteria en medios que carecen de él.

La concentración de glucosa no afecta ni la toxicidad, ni el tamaño de la espora, pero sí afecta la longitud y la forma del cristal. En estudios hechos con *E.*

thuringiensis var. *thuringiensis*, la longitud del cristal promedio aumenta de 0.5 a 2.0 μm , en proporción al incremento de glucosa en el medio, y los cristales son amorfos en vez de bipiramidales. No se sabe aún qué factores afectan y controlan el crecimiento y el tamaño del cristal (10), pero se ha demostrado que la actividad tóxica de una cepa varía significativamente, dependiendo del medio de cultivo (5).

3. Modo de Acción de la Toxina:

La alta selectividad del *E. thuringiensis* específico contra larvas de lepidópteros se deriva de las características únicas que posee el cristal. Los cristales tóxicos son muy estables; al ser ingeridos por vertebrados y otros insectos no susceptibles, pasan a través del intestino o son inactivados por las condiciones ácidas dentro del estómago (6).

El pH del intestino medio en la mayoría de lepidópteros es usualmente alcalino (pH 9 - 10.5), debido a la presencia de altos niveles de K_2CO_3 . Bajo estas condiciones, los cristales se disuelven y son hidrolizados por las enzimas proteolíticas presentes en el medio. Es, entonces, cuando el cristal parasporal o protoxina es activado a la toxina, un fragmento de menor peso molecular con propiedades entornicidas (10).

Las especies afectadas muestran distintos síntomas y respuestas a la toxina. En todos los casos hay parálisis intestinal, que ocurre, aproximadamente, de 1 a 2 horas después de ingestión y es cuando el insecto deja de comer. Subsecuentemente ocurren una serie de cambios degenerativos en el epitelio intestinal, acompañados de alteraciones metabólicas: hay un flujo desordenado

de iones a través de las membranas (6). Como consecuencia hay inanición, se produce una infección bacteriana y el insecto muere, generalmente, después de 24 a 96 horas de haber ingerido los cristales (5). Debido a que la ruta de entrada del cristal y las esporas es vía oral, la alimentación es una condición muy importante para que ocurra actividad insecticida (1).

Se ha propuesto que la toxina, al interferir con el transporte de iones, produce lisis celular e incrementa la permeabilidad de las membranas a los iones de potasio K^+ hacia la hemolinfa (14). Esto produce un incremento en el pH de ésta y una reducción en el pH del intestino medio.

Los cambios de pH en el intestino permiten la germinación de las esporas, el crecimiento de las células vegetativas y, posteriormente, la producción de esporas nuevas y cristales dentro del organismo. Los insectos muertos por infección con *E. thuringiensis* contienen altas concentraciones de esporas y cristales (1).

Los desórdenes patológicos asociados con la toxina son (2):

- a. Separación de las células intestinales de la membrana base.
- b. Estimulación de la actividad secretoria de las células epiteliales
- c. Inhibición del transporte activo de los iones de potasio.
- d. Acumulación de iones K^+ en la hemolinfa.
- e. Incremento en la permeabilidad del intestino a los iones de Na^+ y reducción en la entrada de glucosa a la hemolinfa.
- f. Parálisis del intestino y en algunos casos parálisis total.

El *B. thuringiensis* es patógeno, principalmente, del estado larvario de los insectos susceptibles; mientras más joven es la larva, mayor será el efecto de la toxina (1). El desarrollo y la intensidad de la infección bacteriana y los procesos tóxicos son muy variables y dependen tanto de la especie del insecto así como de la variedad de *B. thuringiensis* utilizada (5).

C. Bioquímica del cristal:

1. Origen y función del cristal parasporal:

Es poca la información obtenida acerca del origen, la estructura y, sobre todo, de la función del cristal parasporal. Hay varias preguntas importantes que aún permanecen sin responder :

1. ¿Por qué el *B. thuringiensis* forma el cristal proteínico?

Aparte del cristal parasporal, el *B. thuringiensis* está tan relacionado a *B. cereus*, que algunos lo designan como un variante de tal especie. Sin embargo, el cristal constituye, aproximadamente, el 30 % del peso seco del esporangio y es casi tan grande como la espora misma (10). Se han formulado varias hipótesis y proposiciones acerca de su origen (2):

- * Puede ser un vestigio evolutivo.
- * Representa un intermediario o un producto final del metabolismo
- * Sirve como alimento para la bacteria
- * Es el resultado de una síntesis específica designada a dar al organismo una ventaja selectiva sobre otras bacterias.
- * Representa una sobreproducción de las proteínas de la capa de la membrana.
- * Es un mecanismo de desintoxicación, etc.

2. ¿Cual es la estructura química del fragmento y cómo funciona?

Hoy día, se conoce la estructura química del fragmento y la toxina completa, pero su función dentro del insecto aún no está totalmente comprendida.

3. ¿Qué factores son los responsables en la selectividad observada contra determinados huéspedes?

En los bioensayos hechos con una subespecie de *E. thuringiensis* en contra de un amplio espectro de lepidópteros, se han observado grandes diferencias en actividad tóxica; esta diferencia en actividad también se ha reportado utilizando un amplio espectro de subespecies de *E. thuringiensis* en contra de un solo tipo de larva.

La comparación entre serotipos individuales no garantiza una especificidad similar contra un huésped determinado; no existe una razón "a priori" del porqué las células vegetativas con cierto serotipo correlacionen con la toxicidad del cristal, excepto que es la base de la clasificación taxonómica (10). La especificidad insecticida se puede deber a la secuencia única de los amino ácidos que forman la toxina (13).

Lo que sí se conoce experimentalmente es:

- * Que la formación del cristal coincide con las primeras fases de la formación de la espora y
- * Que existe una relación entre la síntesis de las proteínas del cristal, el crecimiento y la esporulación de la bacteria.

No sólo se traslapa el tiempo de aparición del cristal con la espora, sino que se forman muy cerca una de la otra. Esta relación sugiere que pueden

compartir componentes químicos. Estudios electroforéticos hechos con proteínas del cristal y la membrana de la espora, muestran un patrón similar de composición química y toxicidad. Aparentemente, la proteína que forma la capa de la espora, es la misma que compone el cristal (2).

2. Propiedades químicas y físicas:

a. Solubilidad:

Para poder caracterizar las propiedades químicas y físicas de la subunidad glicoproteica, es necesario solubilizarla. Los cristales de todas las subespecies son insolubles en soluciones acuosas, neutras o ácidas; por esta razón, las técnicas de solubilización del cristal incluyen tratamientos con base y tratamientos con agentes desnaturizantes (1). La actividad insecticida de la toxina está proporcionalmente ligada a la cantidad de fragmentos tóxicos derivados en la hidrólisis de la protoxina.

Se pueden obtener soluciones con actividad biológica, tratando los cristales intactos a pH 12 con NaOH 1N y luego dializando contra buffer de fosfatos 0.02N a pH 7.5 (12). La máxima solubilidad del cristal se obtiene después de 5 horas del tratamiento con álcali; la subunidad permanece estable por varias horas después y, eventualmente, se va dissociando en fragmentos cada vez menores, resultando en una pérdida de la actividad insecticida (2).

También se logra solubilidad completa del cristal utilizando una solución 1% (peso / vol) SDS; 2% (vol / vol) beta-mercaptoetanol; urea 6M; y buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.2 (13). La adición de agentes desnaturizantes tales

como urea 6M, dodecil sulfato de sodio (SDS), beta-mercaptoetanol y cloruro de guanidina, dan una mejor solubilización del cristal, pero los cristales pierden su actividad (1).

Los enlaces disulfuro en los cristales son, principalmente, intratenarios. Esto juega un papel importante en las características de insolubilidad del cristal, pues para romper los puentes y lograr buena solubilidad, se necesita un pH alcalino (10).

Debido a las múltiples técnicas utilizadas para preparar y solubilizar los cristales, muchos experimentos muestran un alto grado de variación en los resultados obtenidos (1).

b. Técnicas de purificación:

Desde su descubrimiento, uno de los problemas principales afrontados por los investigadores ha sido la separación de las esporas y los cristales, pues son de tamaño similar (10). Varias técnicas han sido utilizadas para conseguir este fin, entre las cuales podemos mencionar: separaciones en sistemas bifásicos utilizando solventes orgánicos y polímeros de alto peso molecular, centrifugación en gradientes de densidad utilizando CsCl y agentes de contraste y centrifugación zonal en gradientes de NaBr (8).

Los métodos que utilizan centrifugación en gradientes de Renografina han dado excelentes resultados (1) y fueron los que se utilizaron para la separación de los cristales en esta investigación. Renografina es el agente de contraste de rayos X metilglucamine: 3,5-diacetilamino-6,4,6-triiodobenzoato.

c. Composición química:

El cristal está compuesto de un 95% de proteína y un 5% de carbohidratos. Análisis cromatográfico para hexosas neutras revelan que contiene un 3.8% residuos de glucosa y un 1.8% residuos de manosa (3).

Los amino ácidos más abundantes son el ácido aspártico y el ácido glutámico. No se han detectado lípidos, ácidos nucleicos ni derivados del ácido siálico. La estructura de las cadenas laterales de carbohidratos aún se desconoce, así como los lugares de unión con la proteína (2).

d. Electroforesis:

Estudios electroforéticos de los cristales de varias subespecies con SDS-PAGE, han demostrado que se producen 2 bandas bien marcadas: una de mayor peso molecular (135,000 daltons), y otra de menor peso molecular (68,000 daltons) en la mayoría de las subespecies. Aparecen también otras bandas más tenues, producto de una hidrólisis incompleta del cristal (1).

Estudios de composición química de los componentes individuales de cada banda, muestran un perfil de amino ácidos casi idéntico al patrón mostrado por el cristal entero (1). Esta evidencia sugiere que el cristal puede estar formado por una subunidad única repetitiva o pro-toxina que, bajo condiciones apropiadas, se convierte en un fragmento tóxico más pequeño de 68,000 d (13). Se ha reportado un rango de pesos moleculares distintos para la subunidad glicoproteica, que varía de 90,000 a 135,000 daltons, dependiendo del método utilizado para la solubilización y la determinación del mismo.

Haciendo un resumen de los datos reportados, se puede concluir que: en todos los métodos se produce un compuesto de alto peso molecular y otro de menor peso molecular, ambos con propiedades tóxicas, y se cree que el complejo de bajo peso molecular se genera del grande (2).

e. Proteasas contaminantes:

Algunas preparaciones parecen tener proteasas contaminantes, responsables de la producción de los fragmentos de menor peso molecular que aparecen en la electroforesis. Estas proteasas existen probablemente dentro de las células, se generan durante el proceso de esporulación (pues está caracterizado por un extensivo recambio de proteínas) y, consecuentemente, se unen de manera no específica al cristal (4). Se debe asumir que el cristal contiene proteasas contaminantes absorbidas del medio, a no ser que se pruebe lo contrario (10).

3. Genética:

La síntesis de la pro-toxina está codificada por 1 solo gene, es una característica específica de la esporulación y, aparentemente, está controlada a nivel de transcripción. Se ha demostrado la existencia de un RNAm específico para la toxina, que está presente, únicamente, en células en proceso de esporulación (1).

El *E. thuringiensis* posee numerosos plásmidos que varían en tamaño (de 1.5 a 180 M daltons) y en número (de 2 a 17) dependiendo de la especie. A la

fecha los únicos genes que se conocen para la síntesis de la proteína del cristal son de origen plasmídico (14).

La Ingeniería Genética nos proporciona una herramienta para la construcción de cepas más efectivas, estables, selectivas, con mayor virulencia y longevidad ambiental, para el control de plagas (1); y con el advenimiento de nuevas cepas, se abren más caminos para la investigación.

4. Toxinas producidas por *B. thuringiensis* :

Se han descrito varias toxinas producidas por el *B. thuringiensis*. La naturaleza bioquímica de cada una varía de acuerdo a la subespecie.

1. alfa - exotoxina. Llamada también "exotoxina termolábil". Es una enzima que se acumula en la fase exponencial del crecimiento en algunas variedades; causa lisis celular. Posiblemente es una lecitinasa o fosfolipasa C (E.C.3.1.4.3.) (14).
2. beta - exotoxina. Esta toxina se conoce como "toxina termoestable". Es un derivado de la adenosina, soluble en agua, que actúa como inhibidor específico de la polimerasa de ARN dependiente de ADN, que compete con el ATP por el sitio activo de la enzima. La exotoxina es muy efectiva contra las moscas. Actúa interrumpiendo la mitosis celular y puede causar mutaciones en células de mamíferos (14).
3. delta - endotoxina. Es la toxina encontrada en la mayoría de las subespecies tóxicas a lepidópteros.

D. Aplicaciones en la agricultura

En total, más de 130 especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros son controlados por distintas subespecies de *E. thuringiensis*. Entre éstos se pueden mencionar muchas plagas defoliadoras que afectan cultivos de gran importancia como el algodón, soya, viñedos, tabaco, frutas, nueces, vegetales, e insectos que actúan como vectores de algunas enfermedades comunes al hombre: malaria, filarias, fiebre amarilla, etc. (7).

Las formulaciones de *E. thuringiensis* utilizadas, actualmente, se pueden dividir en dos grupos: El Grupo I, lo comparten aquellos productos tóxicos contra Lepidópteros y utilizan especies como la *var. kurstaki*. El Grupo II lo constituyen aquellos productos tóxicos contra dípteros, y utilizan la *var. israeliensis*. (1).

1. Ventajas del uso de *E. thuringiensis* como bioinsecticida

1. Tiene un amplio espectro de actividad insecticida contra gran número de plagas.
2. Debido a su alta especificidad, no afecta a insectos benéficos en el medio ambiente y, por lo tanto, se puede utilizar en el manejo integrado de control de plagas.
3. No es dañino al hombre; no afecta los productos finales que llegan al consumidor y, por lo tanto, puede ser aplicado inmediatamente antes de la cosecha.
4. El costo de producción es bajo, por lo que puede competir en el mercado con los insecticidas químicos (1).

5. No es fitotóxico y es muy efectivo.
6. Hasta el momento no se ha mostrado resistencia alguna por parte de insectos susceptibles al *E. thuringiensis* (6).

2. Desventajas del uso de *E. thuringiensis* como bioinsecticida

1. Las esporas y los cristales del *E. thuringiensis* son sensibles a la luz ultravioleta; esto reduce la actividad insecticida del producto cuando se expone al campo.
2. Debido a que el *E. thuringiensis* tiene que ser ingerido por el insecto susceptible, las formulaciones comerciales requieren de 2 factores importantes:
 - * Una aplicación uniforme del producto sobre la fuente de alimentación del insecto y,
 - * que el insecto ingiera la toxina antes de que ésta sea degradada por la condiciones ambientales (1).

III. HIPOTESIS

1. En Guatemala, pueden existir cepas de *E. thuringiensis* tóxicas contra Lepidópteros.
2. Si alguna de las cepas de *E. thuringiensis* aislada en Guatemala es de la misma subespecie que la cepa de *E. thuringiensis* utilizada como referencia, el patrón de electroforesis de los cristales de ambas cepas serán similares.

IV. OBJETIVOS

- A. Aislar cepas de *E. thuringiensis* propias de Guatemala que sean tóxicas contra lepidópteros.

- B. Purificar y caracterizar la endotoxina de las cepas anteriores, y comparar su patrón electroforético con el de la toxina purificada de *E. thuringiensis* var. *morrisoni*.

- C. Determinar la toxicidad de cuatro de las cepas aisladas con bioensayos hechos contra *Spodoptera* *sunia*, una plaga común del algodón en Guatemala.

Y. JUSTIFICACIONES

Dado que Guatemala es un país eminentemente agrícola, se hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes para el control de plagas. El *B. thuringiensis* ofrece una buena alternativa para el manejo integrado de sistemas de control de plagas, reduciendo la utilización de insecticidas químicos. Su modo de acción es altamente selectivo, muy efectivo y no es dañino al medio ambiente.

El aislamiento cepas de *B. thuringiensis* propias de Guatemala y la caracterización de la endotoxina de las cepas aisladas es muy importante, dado a que no sólo nos abre la posibilidad de haber encontrado una cepa nueva (no identificada previamente), sino que nos brinda la oportunidad de poder encontrar cepas tóxicas contra insectos encontrados propiamente en el país. Posteriormente, se pueden efectuar estudios sobre la especificidad, taxonomía e ingeniería genética de las cepas aisladas.

VI. METODOS

A. Equipo materiales y reactivos

1. Obtención de las muestras de tierra

- * espátulas o cucharas para recoger la tierra
- * brocha de pintura (para obtención de polvo)
- * tamiz pequeño
- * bolsas de plástico nuevas, numeradas

2. Aislamiento de *B. thuringiensis* de muestras de tierra

- * frascos Erlenmeyer provistos de tabiques internos (bafles)
- * Autoclave CASTLE tipo 1624
- * Balanza OHAUS Brainweight B-300D, de 30 a 300 g.
- * Incubadora THELCO modelo 4, Precision Scientific Co. Inc.
- * Incubadora con Agitación, New Brunswick Scientific Co. Inc.,
Controlled Environment Incubator, USA Patent # 3002.895
- * Microscopio de luz WILD Heerbrugg, Suiza
- * Tubos de cultivo con tapón de rosca, 3 ml de capacidad
- * Cajas Petri esterilizadas

3. Medios de Cultivo

- * Agar T3 (12)

- Triptona	3.0 g
- Triptosa	2.0 g
- Extracto de Levadura	1.5 g
- Buffer de Fosfatos	0.05 M pH 6.8
- MnCl	0.005 g
- Agar	15.0 g

Aforar a 1 Lt.

* Medio Basal (MB) (9)

- MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.30 g
- MnSO ₄ H ₂ O	0.05 g
- CaCl ₂	0.08 g
- ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.005 g
- CuSO ₄ 5H ₂ O	0.005 g
- FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0005 g
- K ₂ HPO ₄	0.50 g
- (NH ₄) ₂ SO ₄	2.00 g
- glucosa	1.00 g
- Acido Cítrico	0.2 %

Aforar a 1Lt.

Ajustar el pH a 7.4 con KOH 2N.

4. Coloración Azul de Coomasie para el cristal de *E. thuringiensis*

* Coomasie Brilliant Blue	0.25%
Sigma Chemical Co. 65%	
* Etanol	50 %
* Acido Acético	7 %

5. Separación del Cristal

- * Microfiltros SIGMA 7103 0.22 micrones
- * Viales de 3 - 5 ml. esterilizados
- * Jeringas 5 ml. esterilizadas
- * Centrífuga refrigerada IEC International Refrigerated Centrifuge Model B -20. International Equipment Co.
- * Solución de Urografina 100%:

Es una solución acuosa de N-metil-D-glucamine (SIGMA M 2004) y diatrizoato de sodio (SIGMA 4506) (10:66). Esta combinación se considera como solución de Urografina al 100%, de concentración 760 mg/ml y con un índice de refracción de $n = 1.4159$.

6. Electroforesis

- * Cámara de Electroforesis MINI PROTEAN II DUAL SLAB CELL. BIO RAD

Tamaño de la Cámara: 16 cm (L) x 12 cm (W) x 18 cm (H)

Tamaño del gel: 7 cm (L) x 8 cm (W).

- * Constant Voltage Power Supply BIO RAD No. 165 - 4761

Límite de Voltaje: 600 V DC

- * Secador de gel GEL DRYER Model 543

Soluciones

- * Solución de Acrilamida / Bisacrilamida 7.5%:

Se pesan 28.5 g. de acrilamida y 1.5 g. de bisacrilamida. Se mezclan con 100 ml. de agua destilada caliente (aprox. 60°C). Al enfriarse la solución, se filtra utilizando filtros millipore de 0.2 μ m. Esta solución se prepara 1 día antes de la corrida.

- * Buffer Tris - HCl (1M) pH 8.7:

Se pesan 3.0 g. de Tris - HCl y 9.8 g. de Tris - base y se afora a 100 ml.

- * Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%

- * Buffer Tris - HCl (1M) pH 6.8

Se pesan 15.8 g. de Tris - HCL y se afora a 100 ml.

- * Solución de Persulfato de Amonio 10%

- * Buffer especial de cámaras pH 8.3

Se pesan 3.0 g. de Tris - base, 14.4 g. de glicina y 1 g. de SDS. Se afora a 1 Lt.



* Preparación del gel de comida 7.5%:

Reactivos A:	* 10 ml.	sol. de Acrilamida / Bisacrilamida
	* 11.2 ml.	buffer Tris-HCl (1M) pH 8.7
	* 150 ul	sol. SDS 20%
	* 8.2 ml.	Agua destilada
Reactivos B:	* 100 ul.	Persulfato de Amonio 10%
	* 10 ul.	TEMED (tetra- etil-metil-etilendiamina)

Se mezclan en un vaso de precipitar todos los reactivos A y se degasifican al vacío por 15 min. Se adicionan los reactivos B. Rápidamente se vierte el gel en las placas y se espera 1 hora. Se adiciona un poco de isobutanol sobre el borde del gel para que éste se ponga liso. Después de la hora, se lava el isobutanol con agua destilada / desionizada y se prepara el gel de soporte.

* Preparación del gel de soporte:

Reactivos A:	* 1.67 ml.	solución de acrilamida-bisacrilamida
	* 1.25 ml.	Buffer Tris - HCl (1M) pH 6.8
	* 7.00 ml.	Agua destilada / desionizada
	* 50.0 ul.	solución SDS 20%
Reactivos B:	* 50.0 ul.	Sol. Persulfato de Amonio 10%
	* 5.0 ul	TEMED

Se degasifican durante 15 min. todos los reactivos A. Se mezclan los reactivos B. Rápidamente se vierte el gel de soporte sobre el gel de comida hasta que rebalse un poco. Se coloca el peine, teniendo cuidado de evitar la formación de burbujas de aire. Se espera 1 hora hasta que polimerice y se pueden adicionar las muestras al gel.

7. Bioensayos

- * 300 larvas del tercer "instar" de *Spodoptera sunia* comúnmente llamado Prodenia.
- * Dieta de larvas cortada en cuadrados de 1 x 1 x 0.5 pulgadas. Esta dieta fue preparada en los laboratorios del Ing. Ronald Estrada, a base de:

* Acido Ascórbico	8.0 g.
* Acido Sórbico	2.5 g.
* Metil parabeno	5.0 g.
* Tetraciclina	5.0 g.
* Vitaminas EURAYIT	1.0 cucharada
* Harina de Avena	22.6 g.
* Levadura	62.4 g.
* Gemen de Trigo	100.0 g.
* Agar	20.0 g.
* Leche en polvo	50.0 g.
* Agua	1,500.0 ml.

- * 30 recipientes plásticos desechables.
- * 5 Jeringas desechables de 3 ml.
- * Suspensión de esporas y cristales de las cepas # 82, #96, # 155, #164, y *E. thuringiensis* var. *morrisoni* (NRRL HD 12).

8. Determinación de proteínas

- * La concentración de proteína en todas las muestras se determinó en base a la absorbancia a 280 nm. Se utilizó un espectrofotómetro marca GILFORD.

B. Metodología

1. Preparación del material para el aislamiento de *E. thuringiensis*

- * Se tomaron muestras de tierra en bodegas de granos, mercados y en lugares cerrados donde hubiera polvo acumulado de muchos años, en el cual se pudieran encontrar esporas de *E. thuringiensis* que hubiesen infectado algún insecto dentro de las bodegas.
- * Con la brocha se introducían, aproximadamente, 5 gramos de tierra en las bolsas plásticas; se numeraron, identificaron y sellaron.
- * Se tomaron muestras de varias regiones, principalmente en la costa sur, en el oriente y en el antiplano del país.

2. Aislamiento de *E. thuringiensis* de las muestras de tierra.

- * A 2g de las muestras de tierra se adicionaron 30 ml de Medio Basal (MB). Se incubaron a 28°C por 4 horas, con agitación continua a 250 revoluciones por minuto (rpm). Esto permite el crecimiento y desarrollo vegetativo de todas las bacterias presentes en la muestra.
- * Después de 4 horas, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico: calentándolas en baño de maría a 80°C por 10 min. y luego bajando inmediatamente la temperatura a 5°C en un baño de hielo por 10 min. Esto causa la destrucción de las bacterias que no esporulan y permite la esporulación de las bacterias que sí lo hacen (*E. thuringiensis*).

- * Se tomó una alícuota de 1 ml. de cada una de las muestras tratadas, y se sembraron en cajas de Petri con 15 ml. de agar T3. Se incubaron por 4 días a 28°C.
- * Por medio de un microscopio estereoscópico se observaron las colonias resultantes. De acuerdo a su morfología, se hizo una primera separación, seleccionando las posibles colonias de *E. thuringiensis*. Las colonias escogidas se cultivaron en agar T3 de nuevo a 28° para obtener un mejor crecimiento y eliminar las colonias contaminantes.
- * Después de 3 días de incubación, se hicieron preparaciones en porta objetos para observar las colonias bajo el microscopio; se utilizó la coloración Azul de Coomasie por 3 min. para teñir los cristales. La presencia del cristal parasporal fue la base de identificación de una cepa como *E. thuringiensis*.

3. Separación del Cristal

- * Se preparó un cultivo madre, haciendo crecer el microorganismo en frascos agitados con Medio Basal (MB), a 200 revoluciones / min y a 28°C. Un enturbiamiento del medio indica buen crecimiento de la bacteria. Luego, se observó el medio bajo el microscopio para verificar si hubo buena producción de cristales.
- * Para separar la biomasa (células, vegetativas, esporas y cristales) del medio de cultivo, se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 15 min.
- * Si la esporulación y la producción de los cristales no es suficiente, se

traspasa la pella resultante a frascos provistos de tabiques internos con agua destilada estéril para inducir la esporulación. Se incuba a las mismas condiciones por 2 días (hasta lograr completa esporulación de las células) y, por ende, una buena producción de la toxina. Se centrifuga de nuevo a 10,000 revoluciones / min. por 10 min. y se descarta el sobrenadante. La pella resultante se resuspende en agua destilada estéril para formar una suspensión concentrada de esporas y cristales.

- * Esta suspensión fue sometida a un proceso de ultra sonido al 70% por 10 min. Esto elimina cualquier célula vegetativa contaminante que pudiera estar presente en el medio. La suspensión resultante se guarda en el congelador.

4. Preparación del gradiente de densidad (8)

- * Se hizo una solución acuosa de Urografina al 100% como se describió anteriormente.
- * En un tubo de centrifuga se colocaron 4 ml. de la solución de Urografina 100% y sobre ella 4 ml. de la solución de esporas y cristales diluida (1:3) con agua destilada estéril y 1 o 2 gotas de TWEEN 80. Se centrifugó a 4°C por 90 min.
- * Al finalizar la centrifugación, se producen en la interfase de 2 a 4 capas, una de precipitado. Se separan con una jeringa, se filtran y se observan bajo el microscopio. Se guarda la capa que contiene la mayoría de los cristales. Si es necesario, hay que volver a centrifugar 90 min. para obtener una mejor separación.

- * La concentración de la solución de cristales se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm.
5. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS - PAGE)
- * Se solubilizaron los cristales en una solución 1% (peso / vol) dodecil sulfato de sodio (SDS); 2% (vol / vol) de B-mercaptoetanol (ME); y 6M Urea en buffer de fosfatos (0.01 M) pH 7.2
 - * La electroforesis se llevó a cabo en geles de SDS - poliacrilamida al 7.5%, utilizando un amperaje de 30 a 60 mAmps por 30 min. Los marcadores electroforéticos utilizados fueron Fosforilasa B (97,400 d), Albúmina Bovina (68,000 d), Ovalbúmina (43,000 d), Inhibidor de Tripsina (30,000 d), Anhidrasa Carbónica (20,000 d) y alfa-Lactalbúmina (14,400 d) de PHARMACIA Chemical Co.
 - * Los geles se tiñeron 1 hora en solución de azul de Coomasie : metanol : ácido acético (0.25%:40%:10%). Luego permanecieron en solución destañadora (metanol 40% : ácido acético 10%) 24 horas .
 - * Para obtener una mejor resolución de las bandas, se hizo la tinción con nitrato de plata como se describe a continuación.

6. Tinción con nitrato de plata

- * Solución A: 2 g. de AgNO_3 en 10 ml de agua (dura 10 min)
 - * Solución B: 52.5 ml. NaOH 0.36% + 5 ml. de NH_4OH 14.8 M
 - * Solución C: Se adiciona la solución A gota a gota a la solución B, con agitación fuerte. Aforar a 250 ml.
 - * Solución D: 2.5 ml. de ácido cítrico 1% + 0.25 ml. formaldehído. Aforar a 500 ml.
-
- * Los geles se lavaron en las siguientes soluciones con agitación constante:
 1. 1 hora en metanol 50% formaldehído 0.1%.
 2. 1 hora en agua destilada desionizada.
 3. 30 min. en solución de glutaraldehído 10%.
 4. 1 hora en agua destilada, con cambios de agua cada 15 min.
 5. 15 min. con solución C.
 6. 5 min. con agua destilada
 7. 3-5 min. con solución D hasta que aparezcan las bandas.
 8. El revelado se paró con una solución de metanol 50% por 15 minutos.
 - * Para secar los geles, se pusieron en una solución estabilizadora (metanol 40%, ácido acético 10%, glicerol 3%) por 1 hora. Luego se fijaron sobre papel celofán dentro del secador de geles por 30 min.

7. Bioensayos

- * Para cada bioensayo se utilizaron 3 recipientes plásticos conteniendo 1 x 1 pulgadas de dieta.
- * A cada dieta se le adicionó 1 ml. de la solución de cristales de las cepas seleccionadas con una concentración de (0.30 mg / ml). Para que la adición fuera homogénea, la suspensión se echó gota a gota, a modo de formar una cruz de 5 puntos sobre el área total de la dieta.
- * Después de 2 horas, se pusieron 10 larvas del tercer instar de *S. surina* en cada recipiente.
- * Se reportó la mortalidad de las larvas durante 10 días. Esto se hizo 3 veces.

VII. RESULTADOS

A. Primera Parte: Aislamiento de B.T. de las muestras de Tierra

Se analizaron un total de 160 muestras de tierra recolectadas en 25 lugares distintos del país: en el antiplano, en el oriente, y la costa sur. (Ver Anexo # 1).

Con el método de aislamiento desarrollado en esta investigación, se aislaron un total de 78 colonias de *E. thuringiensis* en 14 de los lugares de recolección. La base de identificación de una colonia como B.T. fue la presencia de cristales bien definidos al observar las colonias bajo el microscopio a 1000 X. (Ver Anexo # 2).

Los cristales encontrados, en algunos casos, eran de mayor tamaño que los cristales producidos por la cepa de referencia *E. thuringiensis var. kurstaki* (HD-1); estos cristales eran similares a los producidos por la *var. morisoni* (B-4049) y se les denominó como grandes (ver Cuadro # 7.1.1).

B. Segunda Parte: Bioensayos contra *Spodoptera sunia*

Los bioensayos se hicieron utilizando 4 de las colonias aisladas de B.T. en Guatemala, la cepa B-4049 (*E. thuringiensis var. morisoni*) y como blanco, se hizo el bioensayo sin adicionarle nada a la dieta normal de las larvas.

La concentración de la suspensión de cristales utilizada en cada ensayo fue de 0.30 mg/ml.

Las cepas escogidas para los ensayos fueron:

1. Cepa # 82: Aislada en la Aldea San Jorge, Zacapa
Tamaño de los cristales: Normal
2. Cepa # 96: Aislada en bodega de Granos "Chacón", Zacapa
Tamaño de los cristales: Grandes
3. Cepa # 155: Aislada en San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos
Tamaño de los cristales: Grandes
4. Cepa # 164: Aislada en Indeca, Ciudad de Guatemala
Tamaño de los cristales: Grandes
5. Cepa B.T. var. morisoni : Traída del U,S Department of Agriculture
Brpwnsville T.X. Octubre de 1989.
Tamaño de los cristales: Grandes

Las figuras #7.2.1. a la #7.2.6. muestran la mortalidad de las larvas al cabo de 10 días y el número de larvas que murieron por día, según la cepa de *E. thuringiensis*. Estas gráficas se elaboraron con base en la sumatoria de los resultados obtenidos de los tres bioensayos que se hicieron para cada cepa.

La Figura # 7.3.1. es una comparación de la efectividad de las cepas estudiadas contra el *S. sunia*, y muestra la mortalidad de las larvas al cabo de 10 días.

C. Tercera Parte: Electroforesis de los cristales

La electroforesis de los cristales separados de las 5 cepas estudiadas se muestran en la Figura # 7.4.1 y Anexo # 6. En cada celda se adicionaron 25 ul de proteína.

Cuadro 7.1.1

Lugar de aislamiento de *E. thuringiensis* en Guatemala
y tamaño del cristal encontrado en cada lugar

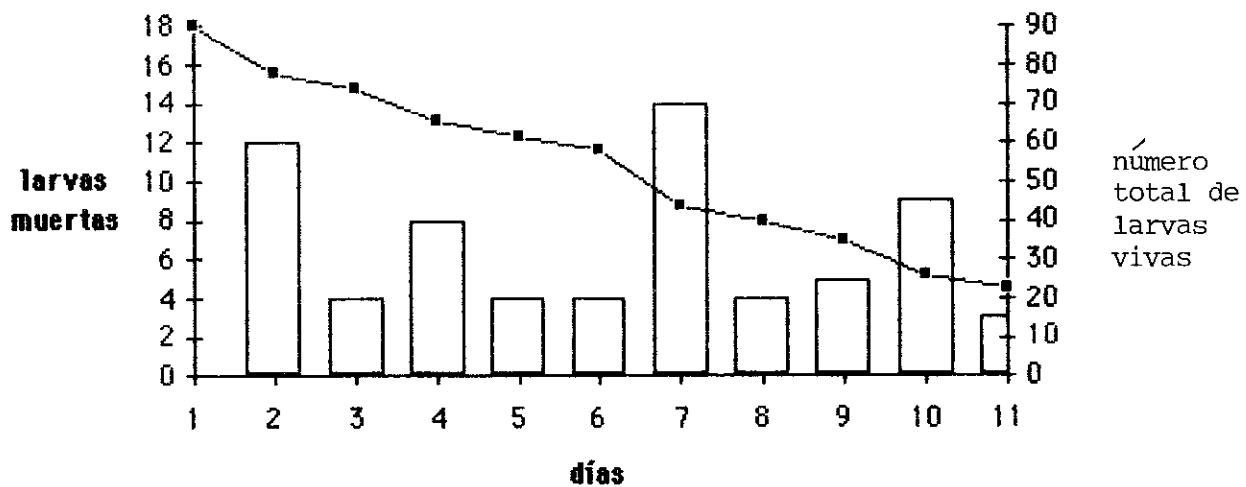
LUGAR DE RECOLECCION DE MUESTRA		TAMAÑO DEL CRISTAL	
1.	Ciudad de Guatemala	G	N
2.	Palín	G	N
3.	Escuintla	G	
4.	La Gomera	G	
5.	Zacapa	G	N
6.	Mazatenango	G	
7.	San rafael pie de la Cuesta		
	San Marcos	G	
8.	Patzicía	G	N
9.	Los Encuentros		N
10.	Sololá		N
11.	Totonicapán		N
12.	Quetzaltenango		N
13.	San Francisco el Alto		N
14.	Huehuetenango		N

G: cristales grandes

N: cristales de tamaño normal

Figura # 7.2.1

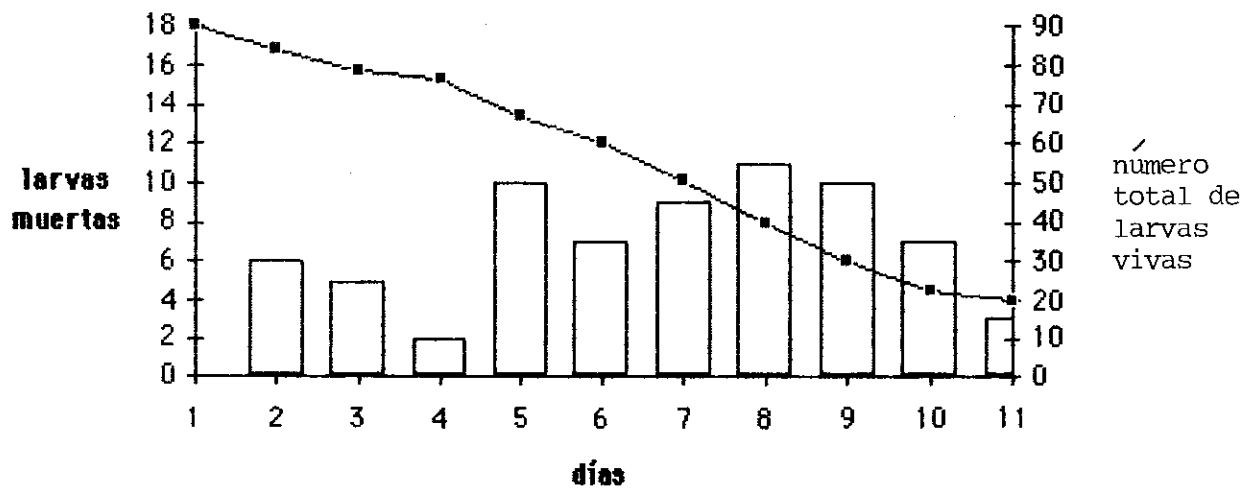
CEPA # 82 : Larvas muertas por día



% de larvas muertas 74%

Figura # 7.2.2

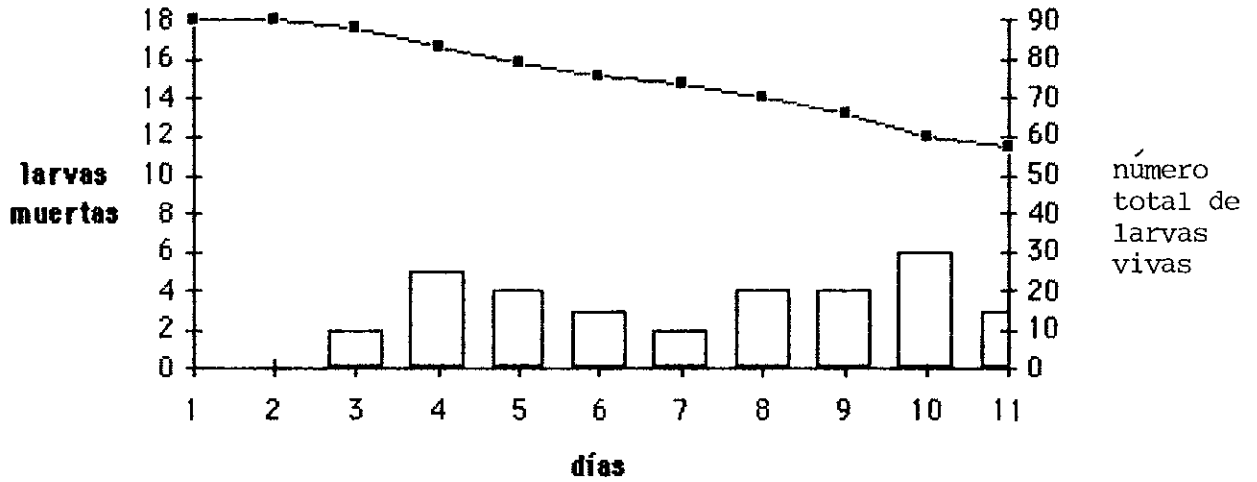
CEPA # 96: Larvas muertas por día



% de larvas muertas 78%

Figura # 7.2.3

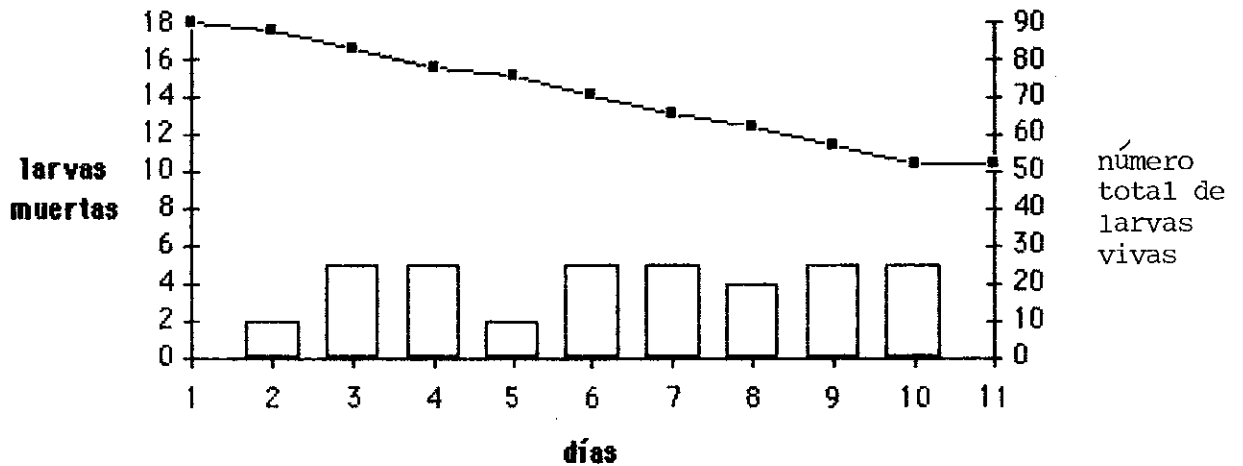
CEPA # 155: Larvas muertas por día



% de larvas muertas 37%

Figura # 7.2.4

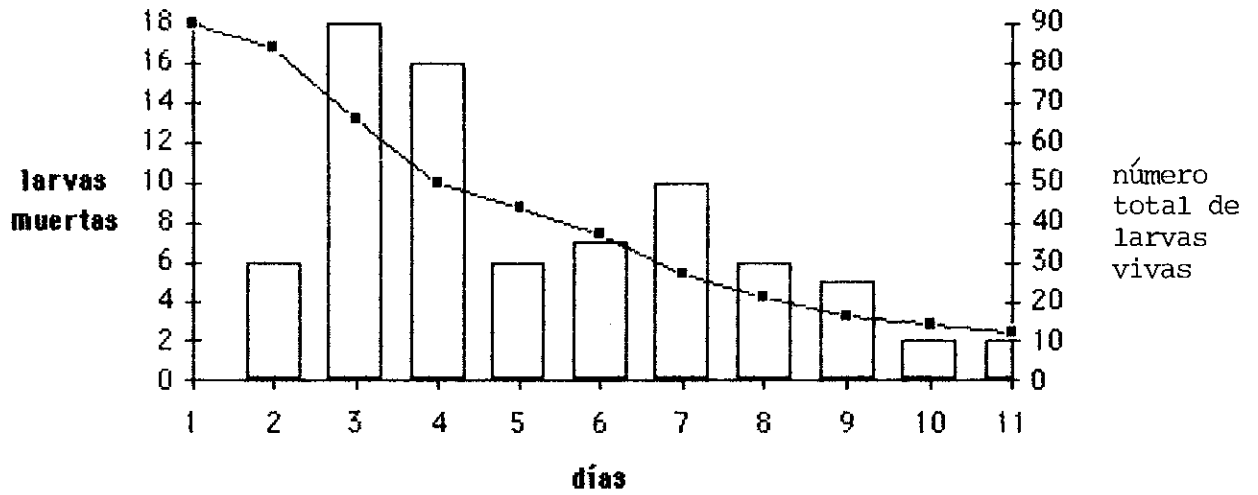
CEPA # 164 : Larvas muertas por día



% de larvas muertas 42%

Figura # 7.2.5

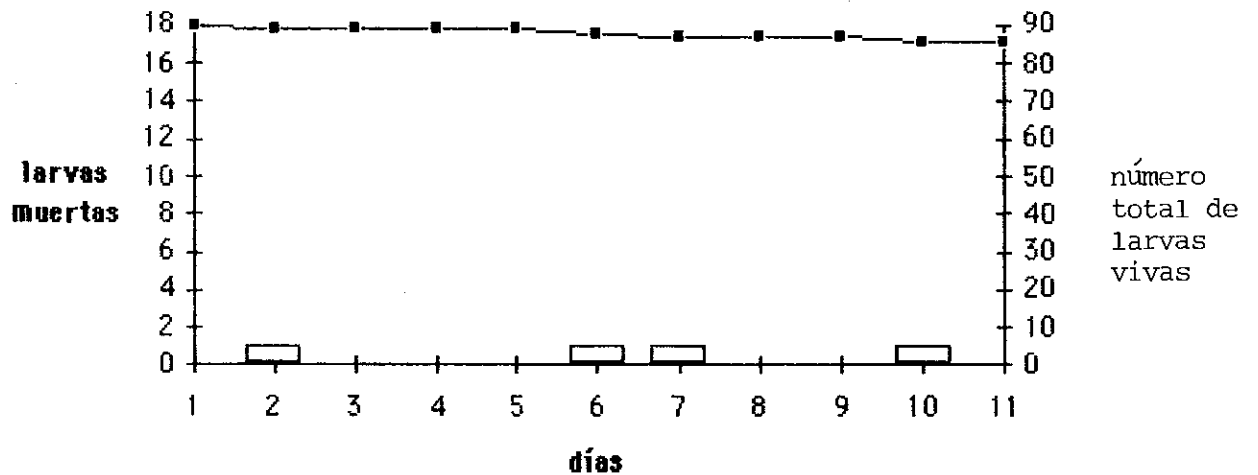
Cepa BT var. morrisoni: Larvas muertas por día



% de larvas muertas 87%

Figura # 7.2.6

Blanco : Larvas muertas por día



% de larvas muertas 4.4%

Figura # 7.3.1: LARVAS MUERTAS POR CEPA

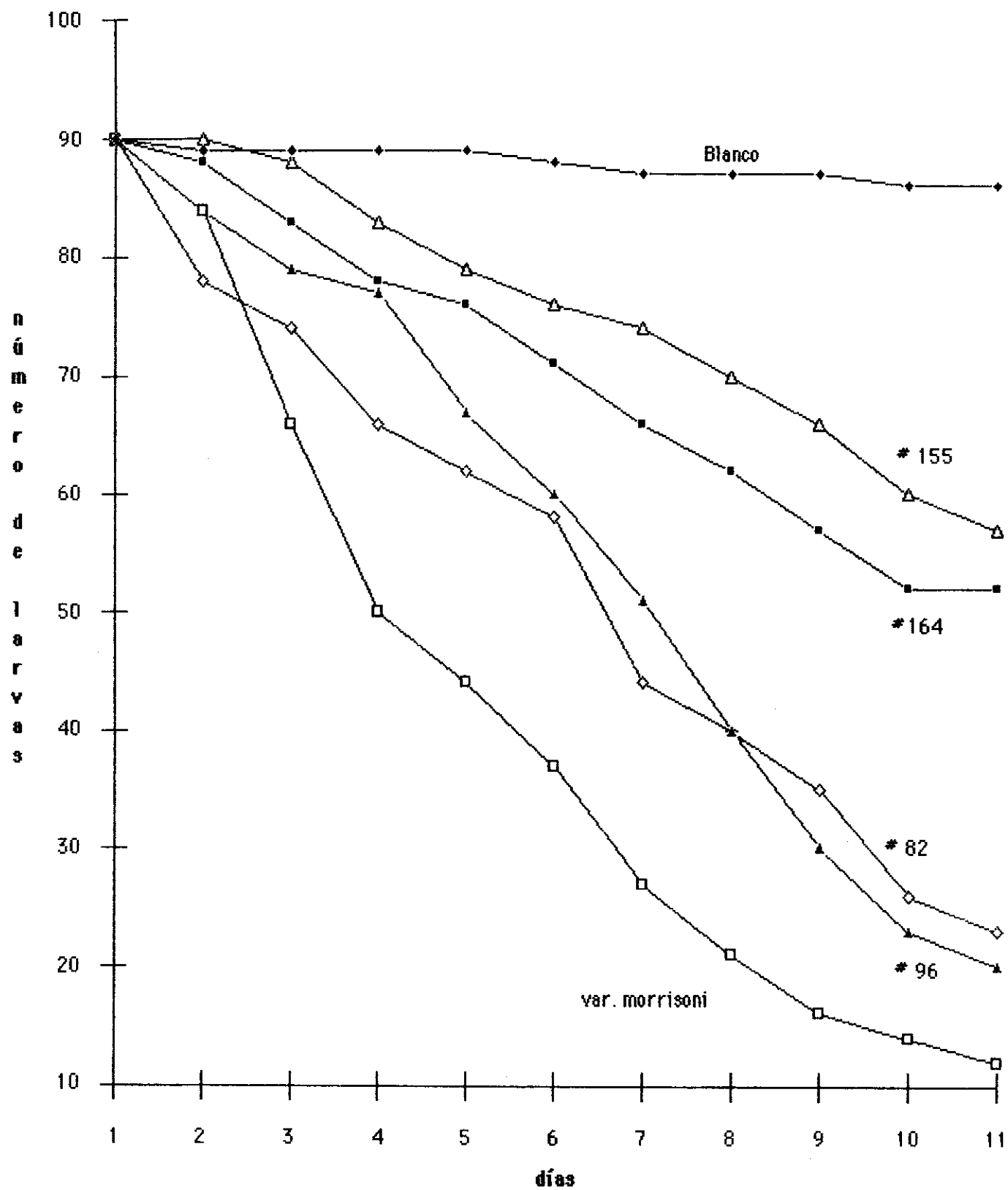


Figura # 7.4.1

ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) DE LOS
CRISTALES PURIFICADOS DE
B. thuringiensis



SDS-PAGE utilizando 7.5% de poliacrilamida/bisacrilamida

Columna # 1: Marcadores de peso molecular conocido

1.	Fosforilasa - b	97.4 kd
2.	Albumina serica bovina	68.0 kd
3.	Ovalbumina de huevo	43.0 kd
4.	Inhibidor de Tripsina	30.0 kd

Columna # 2: cepa # 82

Columna # 3: cepa # 96

Columna # 4: cepa # 155

Columna # 5: cepa # 164

Columna # 6: cepa B. thuringiensis var. morrisoni

Columna # 7: Nada

VIII. DISCUSIONES

A. Aislamiento de *B. thuringiensis* de muestras de tierra

Se encontró *B. thuringiensis* en 14 de los 25 lugares en donde se recolectaron las muestras (ver cuadro de resultados # 7.1.1 y Anexo #2). Los cristales encontrados, en algunos casos, eran de mayor tamaño que los cristales producidos por la cepa de referencia *B. thuringiensis var kurstaki*. A los de mayor tamaño se les denominó como grandes y se parecían mucho a los cristales producidos por el *B. thuringiensis var morrisoni*, con la cual se compararon en la electroforesis y en los bioensayos.

Las colonias de *B. thuringiensis* son de color beige, redondas, con el borde rugoso, y de textura algodonosa. Vistas bajo el microscopio de luz (1000X), utilizando la coloración con azul de Coomasie, se distinguen claramente los cristales, las esporas y las células vegetativas; algunas en proceso de esporulación. Todos los cristales se tiñen de color azul y tienen una forma bipiramidal o de diamante muy bien definida. Los cristales normales eran de menor tamaño que la mayoría de las esporas; los de mayor tamaño, en algunos casos, eran igual o más grandes que las esporas.

Parece haber una mayor incidencia de cristales grandes en las muestras recolectadas en la costa sur y occidente (ver cuadro # 7.1.1); no obstante, también se encontraron cristales normales. Hay que tomar en cuenta que las condiciones de crecimiento del bacilo en esos lugares se desconoce, y son estas condiciones las que afectan tanto la forma como el tamaño del cristal.

Debido a la presencia del cristal, las cepas encontradas fueron clasificadas efectivamente como *E. thuringiensis*, pero el tamaño y las características morfológicas del cristal pueden hacer que las cepas se clasifiquen como distintas subespecies del bacilo.

B. Bioensayos contra *Spodoptera sunia*

Para los bioensayos se escogieron 4 de las cepas de *E. thuringiensis* aisladas en Guatemala; éstas varían tanto en tamaño, así como en el lugar donde se recolectaron. La cepa de referencia utilizada fue el *E. thuringiensis var. morisoni*. Para probar la efectividad insecticida de las cepas, se observó la mortalidad de larvas de *S. sunia* durante 10 días, luego de haber sido expuestas a la bacteria.

Las larvas que iban muriendo se tornaban flácidas y pálidas. Su crecimiento era más lento de lo normal, especialmente a lo ancho. Se observó también que la dieta de las larvas que contenía las cepas más tóxicas no estaba tan comida como la dieta de las larvas con cepas menos efectivas. La dieta del blanco al final de los diez días se acabó toda. Esto demuestra que las larvas perdían apetito en algún punto del ensayo, síntoma común en larvas afectadas por *E. thuringiensis*.

En las gráficas de resultados # 7.2.1 a la # 7.2.6 se muestran las curvas de mortalidad de las larvas según la cepa de *E. thuringiensis* utilizada. Estas se hicieron con base en la sumatoria de los resultados obtenidos de los tres bioensayos hechos por cada cepa. Las barras muestran el número de larvas que se murió en determinado día, y utilizan la escala izquierda del gráfico; la escala

a la derecha indica el número de gusanos vivos, comenzando con un total de 90 larvas el primer día.

La cepa con mayor actividad insecticida fue la *E. thuringiensis* var. *morrisoni* (Fig # 7.2.5), que acabó con un 87% de las larvas y fue la que aniquiló la mayor cantidad de larvas en un día (18 larvas). De las cepas de *E. thuringiensis* aisladas en Guatemala, la # 96 (Fig. # 7.2.2) fue la más efectiva, acabando con un 78% de las larvas; luego le siguió la cepa # 82 (Fig. 7.2.1) con un 74 % de mortalidad. Las cepas # 155 (Fig # 7.2.3) y la # 164 (Fig # 7.2.4) fueron las menos efectivas, matando un 37% y un 42% de las larvas, respectivamente.

Se tomó como blanco el crecimiento de las larvas utilizando la misma dieta que en los ensayos anteriores, pero sin bacilo. De las 90 larvas, únicamente murieron 4 en los 10 días (Fig. # 7.2.6). Esto indica que un 4.4 % de las muertes no es causada por el *E. thuringiensis* en la dieta.

En la Fig. # 7.3.1 de los resultados, se observan las curvas de mortalidad de las larvas producidas por las 5 cepas de *E. thuringiensis* ensayadas. De nuevo se observa que la cepa con mayor actividad insecticida fue la *E. thuringiensis* var. *morrisoni*. Las cepas # 96 y # 82 tuvieron una toxicidad parecida, al igual que las cepas # 164 y la # 155, pero con un menor grado de toxicidad.

El análisis estadístico confirma los resultados gráficos de los bioensayos (ver Anexo # 3). Se hicieron 3 tipos de análisis: 1) análisis de varianza, 2) la prueba de Tukey de comparaciones múltiples y 3) la prueba de Kruskal - Wallis para datos no paramétricos. Se utilizó un nivel de confianza de 95%, en todas las pruebas.

El análisis de varianza establece que sí hubo una diferencia significativa entre las cepas ensayadas (ver Anexo # 3, cuadro 3.1.1) $0.00 < 0.05$; todas las cepas mostraron una actividad insecticida diferente. Establece también que hubo una diferencia significativa entre ensayos $0.015 < 0.05$, pero esta diferencia fue mínima.

Al analizar juntamente las cepas con sus respectivos ensayos, observamos que existe una interacción cepa / ensayo: no se demostró una diferencia significativa entre la cepa y los ensayos hechos para cada cepa ($0.394 > 0.05$ cuadro 3.1.1). Para poder cuantificar y eliminar esta influencia, recomiendo hacer más de tres bioensayos por cepa de *E. thuringiensis* analizada. De esta forma podría obtener una mayor cantidad de datos que reflejaran el comportamiento real de cada cepa en cuanto a su actividad insecticida.

Los resultados de la Prueba de Tukey se resumen en el cuadro 3.2.1 del Anexo # 3. Este análisis agrupa las cepas que fueron estadísticamente similares en cuanto a toxicidad, según los datos de mortalidad presentados. Las cepas *var. morisoni*, # 96 y # 82 fueron estadísticamente similares y las que tuvieron una mayor toxicidad. La cepa # 155 fue similar a la # 164 y ambas mostraron poca actividad insecticida.

La prueba de Kruskal - Wallis se utilizó para comparar las variables dependientes cepa y ensayo, contra el número de larvas muertas al final de los 10 días (ver Anexo # 3). La probabilidad obtenida en estas pruebas asume una distribución de chi-cuadrado con 10 grados de libertad.

La primera prueba de Kruskal - Wallis (cuadro # 3.3.1) nos hace una comparación entre cepas y nos indica que hay una probabilidad de 0.002 que las cepas estudiadas sean estadísticamente similares. Dado que $0.002 < 0.05$, sí existe una diferencia significativa entre cepas. Esto confirma los resultados obtenidos en el análisis de varianza: todas las cepas analizadas tuvieron distinta actividad insecticida.

La segunda prueba de Kruskal - Wallis (cuadro # 3.3.2) nos hace una comparación entre ensayos. Dado que $0.346 > 0.05$, no existe una diferencia significativa entre éstos. Lo anterior confirma que la diferencia entre ensayos que resultó en el análisis de varianza es en realidad mínima.

C. Electroforesis de los cristales

La Figura # 7.4.1 de los resultados y el Anexo # 6 muestran la electroforesis de los cristales purificados de las cepas utilizadas en los bioensayos. En la primera columna se encuentran los marcadores moleculares muy bien definidos (ver Anexo # 4).

La columna # 2 es de la cepa # 82 (ver Anexo # 5). Esta columna muestra una banda muy marcada de, aproximadamente, 75,000 d. Las bandas que le siguen son más tenues y van desde 45,000 d hasta 26,000 d.

La columna # 3 es de la cepa # 96 (ver Anexo # 5). Esta columna muestra una serie de bandas fuertes: dos de mayor peso molecular de, aproximadamente, 82,000d y de 73,000d. Algunas bandas intermedias: 56,000d 47,000d, 45,000d y 38,000d. Y dos bandas de menor peso molecular: 31,000d y 26,000d.

Las columnas # 4 y # 5 son de las cepas # 155 y # 164, respectivamente. Las bandas son más tenues, pero se puede observar claramente que hay una similitud en el patrón de las bandas para ambas cepas.

La columna # 6 es de la *var. morrisoni*. Esta columna tiene menos bandas que las demás. Hay una, aproximadamente, de 68,000d, otra intermedia de 54,000d, y una bien marcada de 33,000d.

En la columna # 7 se corrió la electroforesis de una formulación comercial de *E. thuringiensis* que utiliza la *var. kurstaki*. Debido a que esta muestra fue una prueba aislada y no tuvo el mismo tratamiento que las demás, no se tomó en cuenta en los resultados.

Por comparación de las bandas de las tres cepas con mayor toxicidad, no se puede determinar, exactamente, cual de las proteínas es la que produjo la muerte de las larvas. Hay que tomar en cuenta que la especificidad insecticida se puede deber a la secuencia única de los amino ácidos que forman la toxina, y estas cepas mostraron un gran número de proteínas en la electroforesis. Habría que separar estas proteínas, determinar la secuencia de amino ácidos y probar su actividad insecticida, individualmente.

Las cepas # 82 y # 96 tuvieron, en común, una banda fuerte cerca de 68,000 d; las proteínas de menor peso molecular que se observan pueden ser causa de una hidrólisis subsecuente de las proteínas de mayor peso molecular. Físicamente, los cristales de estas cepas eran de distinto tamaño: la cepa # 82 tenía cristales normales y la # 96 tenía cristales grandes. Debido a que ambas mostraron similitud en cuanto a toxicidad contra *S. surina* y el tamaño de sus cristales era diferente, no se puede decir que existe una relación entre la toxicidad de una cepa y el tamaño del cristal.

Las cepas # 155 y la # 164 fueron estadísticamente similares en relación a su toxicidad, su perfil electroforético fue muy parecido y las características morfológicas de sus cristales son iguales (grandes); estas cepas, aunque aisladas en distintas partes del país, es posible que sean de una misma subespecie de *E. thuringiensis*.

IX. CONCLUSIONES

- A. En Guatemala sí existen cepas de *E. thuringiensis* tóxicas a Lepidópteros.
- B. El método desarrollado en esta investigación para la separación de *E. thuringiensis* de las muestras de tierra es muy efectivo y altamente selectivo.
- C. Los cristales de las cepas aisladas fueron de 2 tamaños: grandes y normales (comparados con los cristales de *E. thuringiensis* var. *kurstaki*). El tamaño del cristal no está relacionado con la toxicidad del *E. thuringiensis*.
- D. De las 5 cepas de *E. thuringiensis* utilizadas para hacer los bioensayos, la más efectiva fue la var. *morrisoni* con un 87% de mortalidad. Luego fue la cepa # 96 con un 78% y la cepa # 82 con un 74%. No hay similitud entre el patrón de electroforesis mostrado por los cristales de estas cepas.
- E. Las cepas # 155 y la # 164, aunque aisladas en distintas partes del país, pueden ser la misma subespecie de *E. thuringiensis*, ya que su patrón de electroforesis, su toxicidad y las características de sus cristales son muy similares.

X. RECOMENDACIONES

- A. Teniendo las 78 cepas de *E. thuringiensis* aisladas propiamente en el país, se recomienda hacer estudios subsecuentes de toxicidad contra otros Lepidópteros e incluso insectos de distintos órdenes para probar no sólo la actividad insecticida de las cepas, sino que establecer un rango de posibles huéspedes que se pudieran combatir.

Se recomienda, también, hacer estudios bioquímicos sobre la composición química de las toxinas, estudios serológicos para determinar la clasificación taxonómica de las cepas en cuanto a su antígeno flagelar H, y en algún futuro, estudios de ingeniería genética para el mejoramiento de las cepas ya existentes.

- B. Con la técnica desarrollada aquí para el aislamiento de *E. thuringiensis* de las muestras de tierra, se podría buscar *E. thuringiensis* específicamente para un determinado huésped, analizando muestras de tierra donde habita comúnmente el insecto de interés.
- C. Para eliminar cualquier interacción que pueda existir entre una cepa y sus ensayos, recomiendo hacer más de tres ensayos por cepa. Con esto se contará con un mayor número de datos que reflejen el comportamiento real de toxicidad por cepa.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Andrews, R.; R. Faust, H. Wabiko y K. Raymond. "The biotechnology
1987 of *Bacillus thuringiensis*". CRC Critical reviews in biotechnology ; 6 (2): 163-232.
2. Bulla, L.A.; D. B. Bechtel, K. J. Kramer, et. al. "Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*". CRC Critical reviews in microbiology; 8: 147-204.
3. Bulla, L. A.; K. Kramer y L. Davidson. "Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*". Journal of bacteriology ; 130 (1): 375-383.
4. Bulla, L. A.; K. Kramer, D. Cox, B. Jones, L. Davidson y G. Lookhart.
1981 "Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*". Journal of biological chemistry; 256 (6): 3000-3004.
5. Couch, T. L.; D. A. Ross. "Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*". Biotechnology and bioengineering; 22: 1297-1304.
6. Dancon, J. W. "Microbial control of pests: use of bacteria" en Microbial control of plant pests and diseases. Chicago, American Society of Microbiology. p. 8-18.
7. Dean, D.; "Biochemical genetics of the bacterial insect control agent
1984 *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospects for genetic engineering." Biotechnology and genetic engineering reviews ; 2: 341-363.
8. Mahillon, J.; J. Delcour. "A convenient procedure for the preparation
1984 of highly purified crystals of *Bacillus thuringiensis*". Journal of microbiological methods ; 3: 69-76.
9. Nickerson, K.; L. A. Bulla. "Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*". Applied microbiology; 28 (1): 124-128.

10. Nickerson, K. "Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal". Biotechnology and bioengineering; 1980 22:1305-1333.
11. Rowe, G.; A. Margaritis. "Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*". CRC Critical reviews in biotechnology; 1987 6 (1): 87-27.
12. Travers, R.; P.W. Martin y C. Reichelderfer. "Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp*". Applied and environmental microbiology ; 1987 53 (6): 1263 - 1266.
13. Tyrell, D.; L. A. Bulla, R. Andrews, et. al. "Comparative biochemistry of the entomocidal parasporal crystal of selected *Bacillus thuringiensis* strains". Journal of bacteriology ; 1981 145 (1): 1052-1062.
14. Whiteley, H.R.; E. Schnepf. "The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*". Annual reviews of microbiology ; 1986 40:549-576.

ANEXOS

ANEXO 1

LUGARES DE RECOLECCION DE MUESTRAS EN EL PAIS:

1. CIUDAD DE GUATEMALA
 - A. TERMINAL DE MAYOREO
 - B. INDECA
 - C. DEPOSITOS DE GRANOS INDEPENDIENTES
2. PALIN
 - A. DEPOSITOS DENTRO DEL MERCADO
 - B. DEPOSITOS INDIVIDUALES
3. ESCUINTLA
 - A. INDUSTRIA OLEAGINOSA DE ESCUINTLA
 - B. DEPOSITOS DE GRANOS EN MERCADO
 - C. DEPOSITOS INDIVIDUALES
4. SIQUINALA
 - A. MERCADO
5. LA DEMOCRACIA
 - A. DEPOSITOS INDIVIDUALES
 - B. CALLE ENFRENTA DE DEPOSITOS
6. ALDEA EL ARENAL (CAMINO A LA GOMERA)
 - A. ORILLA DE TIENDA Y VENTA DE GRANOS
7. LA GOMERA
 - A. DEPOSITOS INDIVIDUALES
8. SIPACATE
9. AYINTESA: ALMACEN DE MAICILLO, SOYA, MAIZ BLANCO Y AMARILLO
10. INGENIO GUADALUPE
11. DESMOTADORA SANTA INES
12. SANARATE

13. ZACAPA
 - A. BENEFICIO DE ARROZ
 - B. BODEGAS DE INDECA
 - C. FINCA EXPERIMENTAL EL OASIS (donde habían hecho ensayos con DIPEL¹ previamente)
 - D. ALDEA SAN JORGE (SILOS DENTRO DE CASAS DE CAMPESINOS)
 - E. MERCADO
 - F. DEPOSITOS INDIVIDUALES

14. CHIMALTENANGO
 - A. MERCADO
 - B. DEPOSITO DE GRANOS INDIVIDUALES

15. PATZICIA
 - A. MERCADO
 - B. CASA PARTICULAR, DONDE DESGRANAN MAZORCAS PARA EL PUEBLO

16. LOS ENCUENTROS
 - A. TIENDAS Y VENTAS DE GRANOS

17. SOLOLA
 - A. MERCADO
 - B. DEPOSITOS INDIVIDUALES

18. NAHUALA
 - A. MERCADO
 - B. DEPOSITOS INDIVIDUALES

19. SAN FRANCISCO EL ALTO

20. HUEHUETENANGO
 - A. MERCADO
 - B. DEPOSITOS INDIVIDUALES

21. TOTONICAPAN
 - A. MERCADO

22. QUETZALTENANGO
 - A. MERCADO
 - B. DEPOSITOS INDIVIDUALES

¹DIPEL es un bioinsecticida comercial, que utiliza el *B. thuringiensis* como base. Producido por Abbott Laboratories

23. RETALHULEU
 - A. MERCADO
 - B. DEPOSITOS INDIVIDUALES
 - C. INDECA

24. MAZATENANGO
 - A. MERCADO

25. SAN RAFAEL PIE DE LA CUESTA, SAN MARCOS: FINCA SANTA JULIA
 - A. BODEGAS DE FRIJOL Y MAIZ DENTRO DE FINCA
 - B. BENEFICIO DE CAFE

ANEXO 2

Lugares de aislamiento de las muestras y tamaño de los cristales aislados:

Lugar de obtención de las muestras	# muestras	# colonias aisladas por muestra	Características Cristales
CIUDAD GUATEMALA:			
1. TERMINAL, bodega de maíz	1.	1.a.	GRANDES
	2.	1.b.	GRANDES
	3.	1.c.	GRANDES
	4.	1.d.	GRANDES
	5.	1.e.	GRANDES
	6.	1.f.	GRANDES
2. Av. Bolívar y 21 calle: compra y venta de granos	7.	8.a.	NORMAL
3. INDECA: bodega de arroz y frijol	8.	10.a.	NORMAL
4. INDECA: orilla de bodega de arroz, frijol y maíz	9.	11.c.	NORMAL
5. INDECA: tierra cl gorgojos en esquina de almacén	10.	12.d.	GRANDES
6. INDECA: sorbo de maíz	11.	13.d.	NORMAL
7. ICAITI: restos del sorgo de un saco de maíz viejo	12.	17.d.	NORMAL
PALIN			
8. enfrente de "Carnicería GUAY" carnicería y tienda	13.	23.b.	GRANDES
	14.	23.c.	NORMAL

ESCUINTLA

9. Industria Oleaginosa de Escuintla	15.	27.a.	GRANDES
polvo de harina que sobra de la	16.	27.b.	GRANDES
semilla de algodón cuando se extrae el aceite			

LA GOMERA

10. Orilla de una tienda	17.	50.a.	GRANDE
--------------------------	-----	-------	--------

ZACAPA

11. Polvo de viga dentro de beneficio de arroz	18.	71.a.	NORMAL
12. Polvo tomado de un silo dentro de una casa particular en San Jorge, Zacapa	19.	82.a.	NORMAL
	20.	82.b.	NORMAL

Finca experimental El Oasis: muestras de tierra con tratamiento previo (15 días antes) de DIPEL.

13. Finca el Oasis	21.	91.a.	NORMAL
	22.	91.b.	NORMAL
	23.	91.c.	NORMAL
14. Bodega de Granos "Chacón" Zacapa	24.	96.a.	NORMAL
	25.	96.b.	GRANDES
	26.	96.c.	GRANDES
	27.	96.d.	GRANDES
	28.	96.e.	GRANDES
	29.	96.f.	GRANDES
	30.	96.g.	NORMAL
	31.	96.h.	NORMAL

PATZICIA

15. Sorgo de maíz tomado de una desgranadora de mazorcas en casa particular	32.	105.a.	NORMAL
	33.	105.b.	NORMAL
	34.	105.c.	GRANDES
	35.	105.d.	GRANDES
16. Muestra dentro del cuarto donde guardan la mazorca desgranada	36.	106.a.	GRANDES

LOS ENCUENTROS

17. Tienda, al lado de unos sacos de maíz	37.	108.a.	NORMAL
	38.	108.b.	NORMAL
	39.	108.c.	NORMAL
	40.	108.d.	NORMAL

SOLOLA:

18. Polvo obtenido de la ventana de una venta de granos: ajonjolí, arroz, achiote, etc.	41.	112.a.	NORMAL
19. Orilla de ventana en otra venta de granos, Sololá	42.	113.a.	NORMAL

SAN FRANCISCO EL ALTO:

20. Depósito de granos y fertilizantes	43.	120.a.	NORMAL
	44.	120.b.	NORMAL

HUEHUETENANGO:

21. Depósito de maíz	45.	124.a.	NORMAL
	46.	124.b.	NORMAL
	47.	124.c.	NORMAL
	48.	124.d.	NORMAL
	49.	124.e.	NORMAL
22. Depósito de maíz	50.	125.a.	GRANDE Y NORMAL
	51.	125.b.	NORMAL
	52.	125.c.	NORMAL
	53.	125.d.	NORMAL
	54.	125.e.	NORMAL
	55.	125.f.	NORMAL
	56.	125.g.	NORMAL
23. Muestra de sorgo en depósito de granos	57.	126.a.	NORMAL
	58.	126.b.	NORMAL
	59.	126.c.	NORMAL
	60.	126.d.	NORMAL

	61.	126.e.	NORMAL
	62.	126.f.	NORMAL
	63.	126.g.	NORMAL
24. Muestra obtenida de un callejón al lado de una casa vieja	64.	127.a.	GRANDES

TOTONICAPAN:

25. Venta de granos dentro del mercado	65.	131.a.	NORMAL
--	-----	--------	--------

QUETZALTENANGO:

26. Venta de granos dentro de mercado	66.	134.a.	NORMAL
	67.	134.b.	NORMAL
	68.	134.c.	NORMAL

27. Debajo del mostrador, en venta de granos, mercado	69.	137.a.	NORMAL
	70.	137.b.	NORMAL

28. Piso en venta de granos, mercado	71.	139.a.	NORMAL
--------------------------------------	-----	--------	--------

MAZATENANGO:

29. Esquina del mercado, al lado de venta de granos	72.	150.a.	NORMAL
---	-----	--------	--------

30. Restos que quedan en canastos donde han vendido maíz en el mercado	73.	153.a.	GRANDES
	74.	153.b.	GRANDES
	75.	153.c.	GRANDES

SAN RAFAEL PIE DE LA CUESTA, SAN MARCOS: FINCA SANTA JULIA:

31. Bodega donde se guarda el frijol en la finca	76.	155.a.	GRANDES
	77.	155.b.	GRANDES
	78.	155.c.	GRANDES

ANEXO 3
ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS
EN LOS BIOENSAYOS

3.1. ANALISIS DE VARIANZA: Larvas muertas al final de 10 días:

VARIABLES:

1. cepa: se estudió la toxicidad de 5 cepas de *E. thuringiensis* (#82, # 96, #155, #164, y *E. thur. var. morrisoni*) y se comparó contra un blanco.
2. ensayo: se hicieron 3 bioensayos de toxicidad por cada cepa.
3. muertos: el parámetro que se estudió fue la muerte de larvas de *S. sunia* en un término de 10 días.

Variable dependiente: muertas
 N: 54
 Nivel : 95% = 0.05

Cuadro # 3.1.1
ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE CUADRADOS	RAZON R	PROBABILIDAD (P)
1. Cepa	445.037	5	89.007	60.080	0.000
2. Ensayo	14.037	2	7.019	4.738	0.015
3. Cepa/ensayo	16.185	10	1.619	0.394	0.394
4. Error	53.333	36	1.481		

3.2. PRUEBA DE TUKEY : comparaciones multiples

F = 0.05

Nivel = 95%

Cuadro # 3.2.1

CLASIFICACION DE CEPAS POR ANALISIS DE TUKEY

=====	
1. <i>E. thur.</i> var. <i>morrisoni</i>	
2. #82	
3. #96	
4. #155	
5. #164	
6. blanco	•
=====	
- : cepas estadísticamente iguales en toxicidad	

3.3. PRUEBA DE KRUSKAL- WALLIS:

La Prueba de Kruskal - Wallis es un análisis unidireccional de varianza para datos no paramétricos. Se utilizó para comparar las variables dependientes cepa y ensayos contra el número de larvas muertas al final de los 10 días. La probabilidad obtenida en ambas pruebas asume una distribución de chi-cuadrado con 10 grados de libertad.

Cuadro * 3.3.1
Prueba de Kruskal - Wallis: Cepa / Muertos

Grupo	Conteo	Suma de Rangos
0.000	5	250.000
1.000	4	200.000
2.000	2	46.000
3.000	8	229.000
4.000	3	78.000
5.000	3	60.000
6.000	3	60.000
7.000	8	112.000
8.000	8	193.000
9.000	7	161.000
10.000	3	96.000

Variable dependiente: cepa
 Variable de grupo: muertas
 Grados de libertad: 10
 Nivel de F: 0.05

Estadístico de prueba Kruskal-Wallis: 27.846

Probabilidad = 0.002

Cuadro * 3.3.2
Prueba de Kruskal - Wallis: Ensayos / Muertas

Grupo	Conteo	Suma de Rangos
0.000	5	155.000
1.000	4	92.000
2.000	2	91.000
3.000	8	202.000
4.000	3	118.000
5.000	3	82.000
6.000	3	118.500
7.000	8	220.000
8.000	8	148.000
9.000	7	192.500
10.000	3	64.500

Variable dependiente: ensayos
 Variable de grupo: muertas
 Grados de libertad: 10
 Nivel de F: 0.05

Estadístico de Prueba Kruskal-Wallis: 11.152

Probabilidad = **0.346**

ANEXO 4

ANÁLISIS DE LA ELECTROFORESIS

Curva de Calibración: Primera Columna

Proteínas de Referencia	Distancia Migrada (cms)	Rf (%)	log P.M.	P.M. (kd)
1. Fosforilasa - b	1.00 cm.	20	1.99	97.400
2. Albúmina sérica bovina	1.60	32	1.83	68.000
3. Ovalbúmina de huevo	2.65	54	1.63	43.000
4. Inhibidor de tripsina	4.10	83	1.48	30.000

Datos Estadísticos:

Número de observaciones	4
Coefficiente de correlación lineal (r)	0.9826
Pendiente	-0.0081
Desviación de la pendiente	0.00108
Intercepto eje (y)	2.1117
Desviación standard del eje Y	0.0508

ecuación de la recta: $y = -0.0081 x + 2.1117$

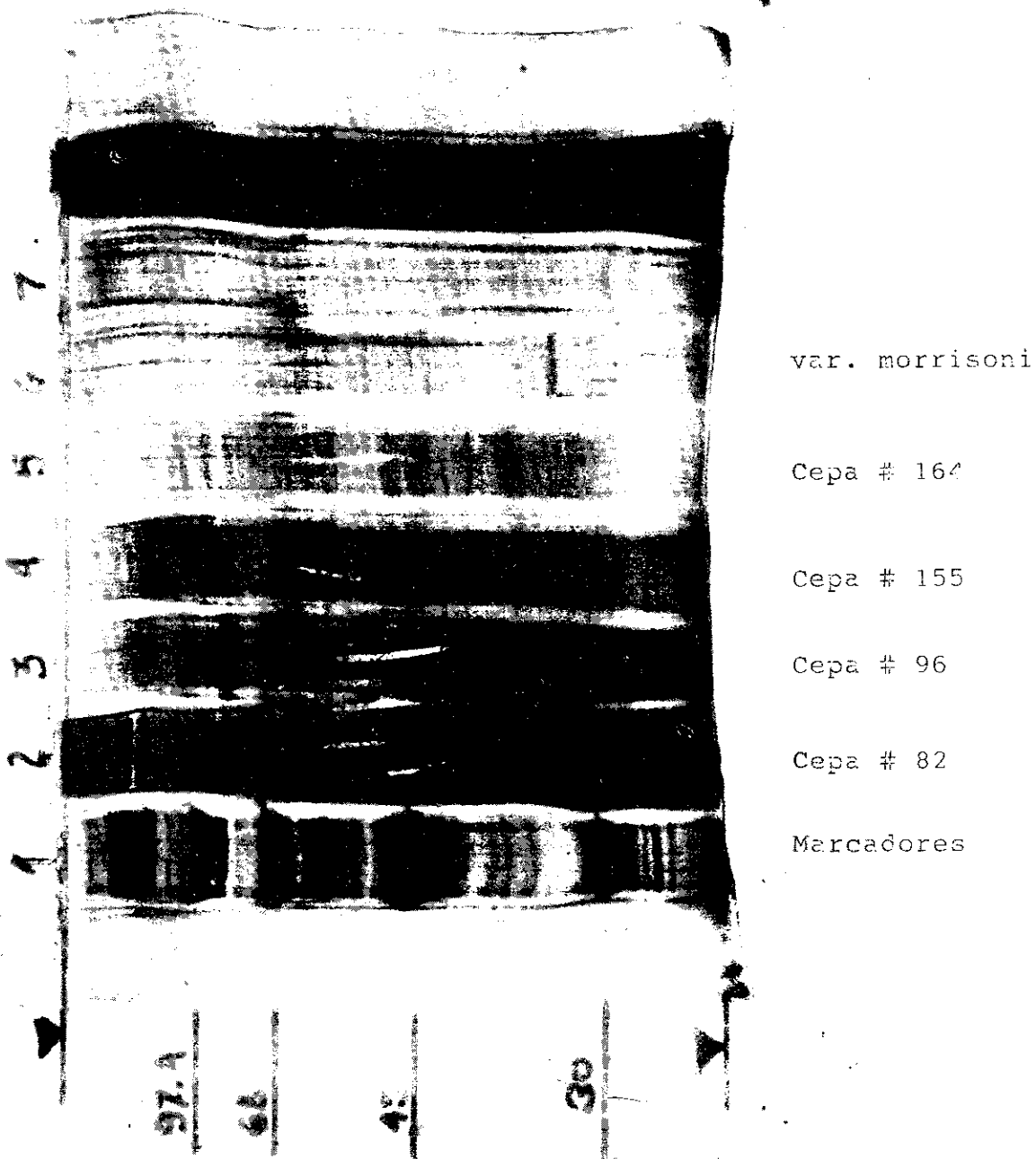
ANEXO 5

Proteínas encontradas en la electroforesis de los cristales
de las distintas cepas de *B. thuringiensis*

Numero de cepa	bandas de proteínas	Distancia Migrada (cms)	Rf (%)	log P.M.	P.M. (kd)
Columna # 2					
# 82	1.	0.60	12	2.012	102.9912
	2.	0.80	16	1.982	95.9400
	3.	1.45	29	1.875	75.0067
	4.	2.55	51	1.696	49.7622
	5.	2.80	56	1.656	45.3315
	6.	3.40	68	1.559	36.2410
	7.	4.00	80	1.462	28.9734
	8.	4.20	84	1.429	26.8905
Columna #3					
# 96	1.	0.60	12	2.012	102.9912
	2.	0.90	18	1.964	92.0874
	3.	1.20	24	1.915	82.3379
	4.	1.50	30	1.867	73.6207
	5.	1.75	35	1.826	67.0656
	6.	2.20	44	1.753	56.7022
	7.	2.70	54	1.672	47.0544
	8.	2.80	56	1.656	45.3315
	9.	3.25	65	1.583	38.3266
	10.	3.80	76	1.494	31.2176
	11.	4.20	84	1.429	26.8906
Columna #4					
# 155	1.	0.60	12	2.012	102.9912
	2.	1.20	24	1.915	82.3379
	3.	1.60	32	1.850	70.9251
	4.	2.00	40	1.786	61.0942
	5.	2.40	48	1.721	52.6260
	6.	2.60	52	1.688	48.8427
	7.	2.80	56	1.656	45.3315
	8.	3.00	60	1.624	42.0726
	9.	3.40	68	1.559	36.2410

Número de cepa	bandas de proteínas	Distancia Migrada (cms)	Rf (%)	log P.M.	P.M. (kd)
Columna # 5					
# 164	1.	0.60	12	2.012	102.9912
	2.	0.90	18	1.964	92.0874
	3.	1.50	30	1.867	73.6207
	4.	2.00	40	1.786	61.0942
	5.	2.40	48	1.721	52.6260
	6.	2.60	52	1.688	48.8427
	7.	3.00	60	1.624	42.0727
	8.	3.30	66	1.575	37.6184
Columna # 6					
<i>E. thuringiensis</i> <i>morrisoni</i>	1.	0.06	12	2.012	102.9912
	2.	1.80	36	1.818	65.8264
	3.	2.30	46	1.737	54.6261
	4.	3.60	72	1.526	33.6357

ANEXO # 6

Electroforesis de los Cristales
de B. thuringiensis

Pesos Moleculares en (kd)

ANEXO 7

Programas Utilizados:

1. Procesador de palabras: MacWrite. Claris Corporation. 1988.
Computadora Macintosh SE
2. Análisis Estadístico: SYSTAT Version 4.1. Copyright 1989. SYSTAT Inc.
Ing. Carlos Róiz. Centro de Estudios Científicos y
Tecnológicos. ICAITI.