



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TOXICIDAD DE MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER)
SOBRE LARVAS EN PRIMER INSTAR DE *Manduca sexta* (LINNEO).

Por:

Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniera Agrónoma Fitotecnista



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA



TOXICIDAD DE MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER)
SOBRE LARVAS EN PRIMER INSTAR DE *Manduca sexta* (LINNEO).

Por:

Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniera Agrónoma Fitotecnista

Asesor:

Dr. Ovidio Díaz Gómez

Revisores:

M. C. Clara Teresa Monreal Vargas

M.C. Carlos Villar Morales

Asesor externo:

Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón

El trabajo titulado “TOXICIDAD DE MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) SOBRE LARVAS EN PRIMER INSTAR DE *Manduca sexta* (LINNEO)” fue realizado por: “Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López” como requisito parcial para obtener el título de “Ingeniera Agrónoma Fitotecnista” y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

Dr. Ovidio Díaz Gómez

Asesor

M.C. Clara Teresa Monreal Vargas
Revisor

M.C. Carlos Villar Morales
Revisor

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 19 días del mes de agosto de 2011.

DEDICATORIA

Porque las buenas obras producen algo espléndido, y la sabiduría es un árbol que siempre da frutos. (Sabiduría 3,15).

Con todo mi amor y cariño dedico este logro a los grandes guerreros que me han precedido y a los que con su día a día siguen en la batalla.

A mi abuelo el Sr. Blas López Araujo (q.e.p.d.) quien con todo su amor, me brindo la mejor infancia que pude haber deseado y tenido.

A mi madre la Sra. Luz Victoria López Ramos (q.e.p.d.) que con todo su esfuerzo y amor me guió y alentó para iniciarme en la carrera.

A mi Abuela la Sra. Belem Ramos Vargas que con toda su paciencia y amor me acogió durante esta etapa de mi vida.

A mis tíos Verónica López Ramos y Carlos Alejandro Flores Sifuentes por ayudarme en esta gran etapa, apoyarme y creer siempre en mí.

A mis hermanos Arturo de Jesús y Luis Ángel con quienes he compartido muchísimas aventuras y dichas, los amo, gracias por estar ahí conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, mi alma mater, y a la Facultad de Agronomía por ser el semillero para mi formación profesional.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Irapuato, por la beca otorgada para la realización de la tesis, y por permitirme formar parte del equipo de trabajo del Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón y realizar el trabajo en el Laboratorio de Bioinsecticidas en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología.

Al Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón por la confianza y apoyo durante la realización del proyecto.

Al Dr. Ovidio Díaz Gómez por su apoyo, orientación y paciencia para la realización del trabajo de tesis.

A mis revisores la MC. Clara Teresa Monreal Vargas y el MC. Carlos Villar Morales por la dedicación a este trabajo.

Al Ing. Javier Luevano Borroel por el soporte técnico en el mantenimiento y crianza de la colonia de *M. sexta*.

A la MC. Regina Basurto Ríos por toda su ayuda y colaboración para las técnicas de laboratorio, así como sus consejos y amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioinsecticidas por hacer mi estancia más grata; por su gran apoyo y amistad, Margarita Rodríguez Mireles, Lizette Chávez Meza, Addy Guzmán Chávez, Katia Teresa Flores Camarillo, Patricia, Sandra, Alejandra, Dr. Pedro Antonio Noguera Díaz-López, Oscar Jesús Ortiz Arrazola, Oscar Gerardo y Juan Reyes Delgado Gamboa, los quiero.

A mis amigos y compañeros de la Facultad de Agronomía por todo el cariño y amistad que me han brindado a lo largo de esta etapa de mi vida; Lucia Espinoza Villanueva, Emma Rodríguez Narváez, Zenia Idalith Zumaya Escobedo, Rita Lagunas, Jalil Saldaña Rodarte, Jaime Valenciano, muchas gracias por estar a mi lado.

A la Familia Pérez Pastrana por su hospitalidad, cariño, apoyo y confianza durante mi estancia en la ciudad de Irapuato, Gto.

A mi novio, amigo, confidente y compañero Jacobo Pérez Pastrana por el aliento en los momentos difíciles, el apoyo incondicional, todo su amor y cariño. Te amo corazón.

A mi familia, en especial a mi abuela Belem Ramos Vargas, a mis tíos Verónica López Ramos y Carlos Alejandro Flores Sifuentes por creer siempre en mí y apoyarme. A mis hermanos por tenerme la mayor de las paciencias y ser mi aliento e inspiración. Los AMO

A mi abuelo quién forjo los cimientos de la persona que he llegado a ser con una maravillosa infancia.

Un especial agradecimiento a mi madre la Sra. Luz Victoria López Ramos quien me dio la vida en todos los sentidos, quien siempre creyó en mí y me alentó en cuanto proyecto me propuse. Muchas gracias mamá TE AMO.

A Dios por darme la vida y permitirme llegar a este feliz momento y compartirlo con mis seres queridos.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Objetivo principal.....	2
Objetivos específicos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Control Biológico de Plagas.....	4
Control Microbiano.....	4
Origen e Historia de la Patología de Insectos.....	5
Características de la Bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Ciclo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
Germinación y fase vegetativa.....	8
Fase estacionaria: esporulación.....	9
Ventajas y Desventajas de <i>Bacillus thuringiensis</i> como Agente de Control Biológico.....	9
Modo de acción de Bt.....	10
Bioensayo.....	12
Producción y Formulación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
Microencapsulación.....	14
Historia de la Microencapsulación.....	14
Microencapsulado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15

Características de <i>Manduca sexta</i> (Linneo).....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Localización y Características del Sitio Experimental.....	19
Microencapsulados.....	19
Diseño Experimental.....	19
Ciclo de <i>Manduca sexta</i>	19
Bioensayos.....	21
Re-suspensión de Microencapsulado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE (PAA).....	23
Crecimiento y esporulación en medio líquido.....	24
Purificación de los cristales paraesporales en gradiente de bromuro de sodio (NaBr).....	24
Obtención de perfiles proteicos.....	26
Preparación del gel de electroforesis.....	27
Elaboración del gel.....	28
Electroforesis del Microencapsulado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Electroforesis de Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Separación de las proteínas.....	30
Revelado de las bandas proteicas.....	31
Análisis estadístico.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Cuantificación de Microencapsulados.....	34
Toxicidad de Microencapsulados.....	37
Toxicidad de Microencapsulado de Bt.....	40
Toxicidad de Microencapsulados irradiados.....	42
CONCLUSIONES.....	48
LITERATURA CITADA.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tipo de coberturas utilizadas en la encapsulación.	15
2	Reactivos para preparar gel de Corrida SDS-PAGE a diferentes concentraciones.....	28
3	Reactivos para preparar un gel concentrador SDS-PAGE.....	28
4	Relación entre la muestra del cristal purificado y el microencapsulado con el buffer de carga.....	30
5	Inocuidad del alginato en comparación con Tween 80 y el encapsulado con complejo espora-cristal.....	38
6	Análisis estadístico con la prueba Honesta según Tukey que determina la inocuidad del alginato en comparación con el Tween 80 y el microencapsulado de Bt.....	39
7	Estimación de la CL ₅₀ para microencapsulado con alginato de Bt, en <i>Manduca sexta</i>	41
8	Estimación de la CL ₅₀ de los microencapsulados irradiados y del microencapsulado de Bt.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Microscopía electrónica de transmisión de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en estado de esporangio. C) cristal parasporal; S) espora.	6
2	Estadios del ciclo de <i>M. sexta</i> : A) Huevecillos, B) Larva, C) Pupa y D) Adulto.....	21
3	Fases del bioensayo para evaluar los microencapsulados de alginato. A) Larvas neonatas de <i>Manduca sexta</i> , B) Placas de dieta artificial, C) Mesa giratoria (Inoculating Turntable), D) Placas inoculadas con rejillas divisorias, E) Caja Petri con dieta artificial, inoculada para Bioensayo y con larvas de 1er instar de <i>M. sexta</i>	23
4	Proceso de purificación de los cristales paraesporales en gradientes discontinuos de NaBr A) y B): Formación de gradientes de NaBr.....	25
5	Cámara de electroforesis y gel de poliacrilamida con muestras de microencapsulado.....	27
6	Separación de la espora cristal del alginato en los microencapsulados. A) Microencapsulado de Bt observado en microscopio óptico compuesto (100x),B) Liberación del complejo espora-cristal del alginato de sodio.....	29
7	Electroforesis en geles para la determinación de la concentración de la proteína cristal en el Microencapsulado con relación en la cepa HD-1 A) y B) corresponden a dos ensayos que muestran las bandas respectivas a tres concentraciones del microencapsulado y de la cepa HD-.....	35
8	Transformación de las bandas de proteína a pixel/mm ² A) y B) Dos ensayos que muestran el análisis de las bandas obtenidas en los geles con el programa Quantity One ®.....	36
9	Determinación de la concentración de proteína en las muestras de ME Bt y HD-1. Relación lineal obtenida entre pixeles/mm ² cuantificados en las bandas obtenidas por electroforesis y	

	concentraciones de proteína.....	37
10	Análisis estadístico de los datos de inocuidad del alginato con la prueba Honesta según Tukey. A) Testigo (Tween 80 al 0.02%), B) Alginato puro y C) Microencapsulado.....	39
11	Efecto de la radiación UV de diferentes longitudes de onda y tiempo de exposición en los microencapsulados de alginato de Bt.....	45

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es considerada uno de los insecticidas más seguros para el manejo de plagas de importancia agrícola, forestal y de salud pública, autorizándose su empleo sobre los más diversos cultivos, incluso sin imposición de plazo de seguridad. Sin embargo, su uso a nivel de campo está restringido por la inestabilidad de las deltaendotoxinas a la luz ultravioleta. Por lo tanto, el desarrollo de formulaciones más específicas a las necesidades del agricultor y que aseguren el mejor rendimiento de la bacteria, es una necesidad urgente. El objetivo principal del trabajo fue probar la toxicidad y determinar la CL_{50} mediante bioensayos con *Manduca sexta* de los microencapsulados de alginato en base a *Bacillus thuringiensis* serovariedad *kurstaki* HD-1; además de realizar la cuantificación del cristal del microencapsulado de alginato con el complejo espора-cristal. Para la determinación de la CL_{50} se realizó la cuantificación del microencapsulado por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE, ello aunado a un programa cuantificador Quantity One®. Los bioensayos para el microencapsulado en comparación con el alginato de sodio puro mostraron una clara diferencia significativa (Tukey $\alpha 0.05$). Al comprobarse la inocuidad del alginato, se probaron las 5 muestras del microencapsulado 1) Microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* (ME Bt), 2) Microencapsulado de Bt Irradiado 1 (MEI 1), 3) Microencapsulado Irradiado 2 (MEI 2), 4) Microencapsulado de Bt Irradiado 20 (MEI 20), 5) Microencapsulado de Bt Irradiado 24 (MEI 24), encontrándose una reducción en la acción tóxica de la proteína insecticida en los encapsulados. La CL_{50} obtenida para los microencapsulados irradiados fue elevada en comparación con valores de la cepa estándar e incluso con el encapsulado sin irradiar revelando una CL_{50} media de 101.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y aun cuando se registró un menor valor para el microencapsulado no irradiado, este fue afectado, calculándose su CL_{50} en 23.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

SUMMARY

Bacillus thuringiensis is considered one of the safest insecticides for managing pests of agriculture; forestry and public health, authorizing its use on many different crops, even without the imposition of term safety. However, their use at field level is restricted by the instability of deltaendotoxins to ultraviolet light. Therefore, the development of specific formulations to the needs of farmers and ensure the best performance of the bacteria, is an urgent need. The main objective of the study was to test the toxicity and determine the CL₅₀ bioassays with *Manduca sexta* the alginate microcapsules based on *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki HD-1, in addition to the quantification of alginate microencapsulated crystal the complex spore-crystal. To determinate the CL₅₀ was performed to quantify the microencapsulated gel electrophoresis polyacrylamide denaturing SDS-PAGE, this coupled with a quantifier Quantity One® program. Bioassays for the microencapsulated compared to the pure sodium alginate showed a clear significant difference (Tukey α 0.05). By checking the safety of alginate were tested five samples of microencapsulated 1) Microencapsulation of *Bacillus thuringiensis* (Bt ME), 2) Bt Microencapsulated Irradiated 1 (MEI 1), 3) Microencapsulated Irradiated 2 (MEI 2), 4) Microencapsulation of Bt 20 (MEI 20), 5) Bt Microencapsulated Irradiated 24 (MEI 24) found a reduction in the toxic action of the insecticidal protein in the capsule. The CL₅₀ obtained for the microencapsulated irradiated was high compared with values from the standard strain and even the package without irradiation revealed an CL₅₀ average 101.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and although there was a lower value for the microencapsulated not irradiated, it was affected, calculating the CL₅₀ in 23.66 $\mu\text{g}/\text{cm}$

INTRODUCCIÓN

El concepto plaga define a todo organismo que causa pérdidas económicas a los cultivos de importancia agrícola, forestal y agropecuaria; se aplica a los seres vivos no deseados en la agricultura y la ganadería, zonas rurales, urbanas o suburbanas que causa problemas o malestares a cierta población (Gallegos *et al.*, 2003). A partir de la Segunda Guerra Mundial, el control de plagas con insecticidas químicos se vuelve el método más utilizado para su combate. Estos insecticidas han sido muy exitosos dentro del mercado y han contribuido a la producción de alimentos y fibras, así como al control de problemas médicos y veterinarios transmitidos por insectos, especialmente por mosquitos y jejenes. A pesar de estos beneficios, el uso de insecticidas químicos no está exento de inconvenientes; entre los más importantes se encuentra el desarrollo de altos niveles de resistencia de las plagas, y la mortalidad elevada de insectos benéficos, contaminación del ambiente; particularmente los suministros de agua. Debido a ello, la comunidad científica, el gobierno y la industria han puesto un gran esfuerzo durante las últimas décadas fomentando activamente el cuidado del ambiente con productos y métodos menos contaminantes. Uno de los mejores métodos para el manejo de plagas, libre de plaguicidas químicos, es el control microbiano, basado en patógenos que provocan un daño al insecto (Navon y Ascher, 2000). *Bacillus thuringiensis* es considerado uno de los insecticidas microbianos más seguros y se ha autorizado su aplicación sobre diversos cultivos, incluso sin imposición de plazo de seguridad.

La gran aportación que simboliza la bacteria *B. thuringiensis*, aunado a su aptitud para una multiplicación sencilla *in vitro*, ha llevado a la industria y a la ciencia a su producción como insecticida bacteriano, manteniendo en constante cambio y perfeccionamiento las formulaciones lanzadas al mercado; las cuales van desde la inclusión de cepas nuevas y cada vez más activas o con nuevas especificidades, desarrollo de formulaciones más asequibles con características acordes a las necesidades del agricultor y efectividad elevada de la bacteria. No obstante, el empleo incorrecto de estos productos genera un rápido descenso en la efectividad en las aplicaciones foliares, debido a varios factores como la incidencia de la radiación ultravioleta (UV), la temperatura y el pH del agua utilizada en las aplicaciones de *Bacillus thuringiensis*

israelensis (*Bti*), entre otros (Mulla, 1990; Becker *et al.*, 1992; Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2001 citado por Delgado-Puchi, 2005).

Actualmente *B. thuringiensis* representa más de 90% de las ventas de insecticidas microbianos para el control de ciertos gusanos, moscas o escarabajos plaga que afectan a la agricultura. La propiedad insecticida de la bacteria radica en una proteína cristalina que se crea durante el proceso esporulación; las nuevas formulaciones implican la protección del complejo espora-cristal a base de distintos soportes como los microencapsulados de alginato (West *et al.*, 1984).

En el estudio de un insecticida de origen biológico se utilizan cepas estándar como punto de comparación con la cepa que está en prueba, una de estas cepas estándar en los formulados es *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 S-80 (Navon y Ascher, 2000). El efecto de *B. thuringiensis* (Bt) sobre los insectos susceptibles sólo se puede medir cuantitativamente a través de bioensayos en condiciones de laboratorio o mediante diseños experimentales en parcelas de campo, los cuales determinan el poder o potencia de una sustancia (toxicidad) por la respuesta de un organismo vivo (Ronco *et al.*, 2004). En el primer caso, el objetivo principal de un bioensayo con Bt es la estimación de la concentración letal cincuenta (CL₅₀) que se define como la cantidad de toxina o sustancia tóxica a la cual se somete un grupo de individuos y que se estima letal para 50% de los organismos a prueba en un determinado tiempo (Ronco *et al.*, 2004). Representa el nivel de toxicidad de la preparación probada por lo que para esta clase de proyecto se somete a una población de insectos estándar como *Manduca sexta*, a la acción de un tóxico (Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001). La unidad de evaluación para estos bioensayos es CL₅₀.

Objetivos

Objetivo principal

Evaluar la toxicidad y determinar la CL₅₀ mediante bioensayos con *Manduca sexta* de los microencapsulados de alginato en base a *Bacillus thuringiensis* serovariedad *kurstaki* HD-1; además de realizar la cuantificación del cristal del microencapsulado de alginato con el complejo espora-cristal.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar la inocuidad del microencapsulado de alginato sin contenido de complejo espora-cristal
- 2) Evaluar la toxicidad del microencapsulado de alginato conteniendo el complejo espora-cristal.
- 3) Evaluar el efecto del tiempo de exposición a la luz UV sobre la toxicidad de los microencapsulados de alginato con complejo espora-cristal.
- 4) Purificar el cristal (tóxico) de la cepa HD-1 obtenida del cepario del Laboratorio de Bioinsecticidas.
- 5) Realizar la liberación del complejo espora-cristal del microencapsulado de alginato
- 6) Cuantificar las proteínas Cry de Bt en los formulados microencapsulados en geles de poliacrilamida (PAA).

REVISIÓN DE LITERATURA

Control Biológico de Plagas

El término control biológico surgió tiempo después del inicio del empleo de la técnica en que se utilizan recursos biológicos como parasitoides y otros enemigos naturales para el control de poblaciones plaga, desde malezas hasta insectos (Barrera, 2007). El control biológico se define como la destrucción de insectos indeseables por macro y microorganismos mediante su introducción, o favoreciendo sus poblaciones naturales en un agroecosistema (Alatorre-Rosas, 2008).

Control Microbiano

La interacción entre macro y microorganismos acontece de forma natural y en diversas ocasiones los microorganismos benéficos se presentan con alta incidencia, causando una significativa reducción en la población de los insectos plaga, hasta llevarlos a niveles por debajo de los umbrales de daño. La explotación de estos microorganismos y su aplicación como plaguicidas biológicos o bioinsecticidas se llama “control microbiano”. El control microbiano es una opción más para afrontar los problemas de plagas debido a que puede complementar la acción de otras estrategias de control (Alatorre-Rosas, 2007).

Los plaguicidas microbianos fueron adquiriendo reconocimiento como factor importante en la protección forestal y de cultivos debido a la alta incidencia de problemas generados por la constante aplicaciones de insecticidas químicos. Algunos de los microorganismos que se emplean son virus, bacterias y hongos. Estos plaguicidas además de ser naturales son dañinos sólo para grupos específicos de plagas (Khetan, 2001).

El control microbiano es una herramienta que se emplea con el fin de realizar un control no contaminante de insectos plaga, lo cual se ha convertido en una necesidad mundial (Gallegos *et. al.*, 2003). Se pueden usar bacterias, virus, nemátodos, protozoarios y hongos que no causan fitotoxicidad a ningún cultivo agrícola, no originan ningún problema a los ecosistemas, no contaminan el aire, agua o suelo; son inocuos a la

fauna y a organismos benéficos; son capaz de autodiseminarse en el ambiente, lo que provoca epizootias naturales sobre las plagas (Rojas, 2003).

Debido a las ventajas que representa el control biológico sobre el control químico de plagas, es muy importante la búsqueda, identificación y clasificación de microorganismos entomopatógenos, lo cual tiene por objeto conocer la diversidad e interacciones naturales y promover la investigación sobre mecanismos y rango de acción, así como la aplicabilidad de estos microorganismos (Gallegos *et al.*, 2003).

Origen e Historia de la Patología de Insectos

Hoy en día se ha vuelto muy importante el tema del control biológico de plagas; sin embargo, el empleo de entomopatógenos data de mucho tiempo atrás, desde el descubrimiento de las enfermedades en las colonias de *Bombix mori* (Ibarra, 2007). Pero no fue sino hasta la época de Louis Pasteur, alrededor del 1865, que se pudo confirmar la teoría infectiva de los microorganismos en los insectos. No obstante, el descubrimiento de Agostino Bassi de Lodi fue el punto de partida, al identificar la enfermedad causada por la muscardina blanca a los gusanos de seda y por ello se le atribuyó el nombre de Padre de la Patología de Insectos.

En el siglo XX se dieron los primeros casos del control de insectos con bacterias. En 1945 Smith establece un laboratorio de Patología de Insectos en Berkeley, California; en donde deja a su cargo a Steinhaus, quién para 1949 introduce el uso de virus y demuestra la efectividad de Bt para el control de numerosas plagas, promoviendo su producción masiva (Steinhaus, 1951).

Características de la Bacteria *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es sin duda la bacteria más importante y de mayor empleo dentro del control biológico. Se caracteriza por ser bacilo gram positivo, aerobio, y desarrollar una endospora central. Se distingue porque durante el proceso de esporulación forma uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la espora y de diversas formas (rómnicos, esféricos, etc.) como se muestra en la Figura 1. Estos cuerpos cristalinos tienen actividad insecticida, se conocen como proteínas Cry y actúan como veneno estomacal en una gran variedad de insectos (Gallegos *et al.*, 2003).

Algunos de estos cristales paraesporales son tóxicos para ciertas especies de insectos, propiedad que les confiere especificidad y por ello se pueden incluir en formulados de alta eficacia contra ciertas plagas. También son rápidamente biodegradables y por ello de bajo impacto sobre el medio ambiente (Bulla *et al.*, 1985; Alatorre-Rosas, 2007).

Esta bacteria fue descrita por primera vez por Berliner en 1915 (Gallegos *et al.*, 2003). A partir de entonces se han clasificado miles de cepas pertenecientes a 84 serotipos (Rodríguez *et al.*, 1991).

Aunque la capacidad de Bt para eliminar larvas de insectos se conoce desde comienzos del siglo XX, su comercialización como insecticida se lleva a cabo desde hace 51 años. Dentro de la especie de Bt se encuentran diferentes subespecies y patotipos, los cuales tienen un poder de control mucho mayor gracias a la especificidad que poseen para ciertas especies de plagas (Rechigl y Rechigl, 1998). También se conoce su amplio espectro, principalmente contra larvas de lepidópteros (Gallegos *et al.*, 2003).

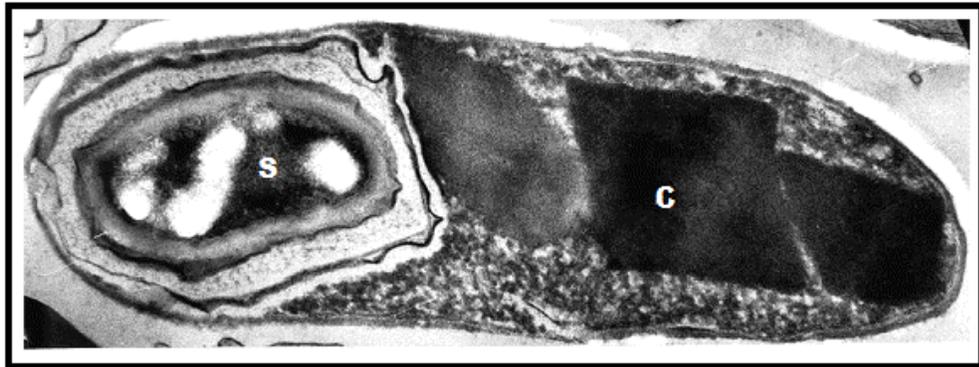


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en estado de esporangio. C) cristal parasporal; S) espora. (http://microgen.ouhsc.edu/b_thuring/b_thuringiensis_home.htm 22/Mayo/2011).

Historia de *Bacillus thuringiensis*

El primer registro de Bt ocurrió hacia el año 1901 cuando Ishiwata realizó la descripción más antigua que se tiene de la bacteria, en Japón; quién la llama sotto bacillus (sotto = muerte súbita) (Milner, 1994; Khetan, 2001). Sin clasificar formalmente a la bacteria, Ishiwata dejó en manos de sus estudiantes la secuencia de este trabajo.

La bacteria causante de innumerables muertes de larvas de lepidópteros fue aislada de la polilla *Anagasta kuehniella* por Berliner en el año de 1911, y descrita por él, alrededor de 1915 en la provincia de Thuringia, Alemania; y fue denominada *Bacillus thuringiensis*, de ahí viene el precedente de su nomenclatura (Milner, 1994; Khetan, 2001).

Huz aisló lo que sería una cepa de Bt de *Ephestia* en 1928, la probó contra el barrenador del maíz en Europa, y prácticamente fue el primer caso de la aplicación tangible de Bt, a partir de este trabajo comenzaron a aparecer varios reportes sobre el barrenador europeo del maíz que podía ser controlado con *B. thuringiensis*. Esto sería el antecedente para producir el primer producto utilizado para control biológico a base de Bt, llamado “Sporeine”, tanto en Francia como en Checoslovaquia (Milner, 1994; Khetan, 2001; Rowe y Margaritis, 1987). Fue Steinhaus en los años 50 quien corroboró que la toxicidad de Bt provenía de cepas autolisadas y estas podrían ser utilizadas contra larvas. Algunos estudios realizados por Hannay en 1953, ya referían un segundo cuerpo en el esporangio (observado anteriormente por Berliner y Mattes), especulando que la inclusión paraesporal juega un papel en la patogenicidad de la bacteria. Angus en 1954 comenzó estudios al respecto y para 1956 junto con Heimpel, investigó el papel del cristal paraesporal, llegando a la conclusión de que es el cristal el que tiene la actividad tóxica, confirmado de esta forma que el cristal paraesporal es el responsable de la toxicidad y que las esporas por sí solas no tienen efecto y que el sobrenadante dializado de los cristales disueltos por álcali, tuvieron el mismo efecto tóxico que el complejo espora cristal cuando fue ingerido por larvas de *B. mori* (Heimpel y Angus, 1959 citado por Reyes-Ramírez y Ibarra, 2008).

Antes de la década de los 60s no se comercializaban formulaciones a base de Bt (Aragón, 2003). A partir de 1959 en Estados Unidos de América, una compañía produjo Bt para aplicar como control biológico; iniciando de esta manera la producción comercial de Bt por fermentación sumergida en medio líquido. También se demostró que la toxicidad varía dependiendo del medio líquido, desarrollando así varias técnicas para la producción de Bt a gran escala (Milner, 1994). En 1962, Bonnefoi y de Barjac desarrollaron la técnica de serotipificación para hacer la clasificación de todas las cepas de *B. thuringiensis* (Milner, 1994). En el mismo año, Kurtak aisló de la palomilla de

harina del Mediterráneo una subespecie de *Bacillus* denominada *Bacillus thuringiensis* kurstaki.

Hall en 1963 realizó breves descripciones de formulaciones sobre la producción de Bt, usando el serotipo HD-1, donde incluye productos como Bactosporeine, Biospor, Entobacterin y Sporeine; seguido por Ignoffo y Anderson en 1979, quienes publicaron una lista más completa de productos manufacturados, donde el ingrediente activo fuera Bt (Couch y Ross, 1980).

Antes de los 70s, los productos de Bt fueron estandarizados a base del conteo de esporas como potencia en términos de DL_{50} (dosis letal media). Esta dosis debe matar a 50% de las larvas a probar. Dulmage y colaboradores en 1971 legitimaron la utilización del bioensayo, que se basa en las unidades internacionales de toxicidad (IUT) de la preparación estándar, lo que inició una nueva técnica de cuantificación de la toxicidad. Muy pronto se adoptó el estándar HD-1-S-1971, que es un aislado de la variedad *kurstaki* (HD-1). Esta técnica mostró una efectividad muy alta y se aceptó en Norte América y otros países. Otro estándar Francés se designó como E-61, basado en la variedad *thuringiensis*. Desde entonces se han publicado diversas exposiciones detalladas sobre métodos de bioensayos, porque Bt actúa principalmente en el aparato digestivo del insecto, los bioensayos se basan en la incorporación de varios niveles de la preparación a probar en la dieta de las larvas de insectos. Los datos obtenidos hasta ahora han sido usados para la determinación de la CL_{50} , que representa la concentración en microgramo por gramo de dieta, que mata a 50% de las larvas (Rowe y Margaritis, 1987).

Ciclo de *Bacillus thuringiensis*

Germinación y fase vegetativa

El inicio del ciclo de *B. thuringiensis* se considera que es la germinación de la espора de resistencia (Wilson y Benoit, 1993). La célula vegetativa crece en el medio de cultivo, reproduciéndose por fisión binaria (Fast, 1981). Si bien puede crecer a temperaturas extremas, la óptima es de 26 a 30 °C. En relación al pH, no es especialmente exigente y crece en diversos sitios sin problema, se puede decir que es cosmopolita por la multitud de sitios de los cuales es aislada (Ibarra, 2007)

Fase estacionaria: esporulación

La esporulación normalmente está inducida por el empobrecimiento del cultivo y coincide con el cambio de fase de crecimiento exponencial a fase estacionaria. En la fase estacionaria tiene lugar simultáneamente la formación de la endoespora (conjunto de célula con espora) de resistencia y la del cristal paraesporal (Ibarra, 2007). En condiciones de baja tensión de oxígeno o altos niveles de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo, la esporulación puede llegar a inhibirse completamente (Bucher, 1981).

La formación de la espora se puede dividir en siete fases (Bechtel y Bulla, 1976; Sneath, 1986). El material genético (ADN, ácido desoxirribonucleico) de la bacteria se dispone longitudinalmente, posteriormente se forma un septo transversal que va de un extremo a otro de la bacteria dando lugar a dos partes asimétricas encerrando en cada una, parte de la copia del material genético. La membrana de la célula de mayor tamaño crece rodeando a la menor, la cual queda en el citoplasma de la primera, esto es la preespora, que se define como una porción de citoplasma rodeada de dos membranas celulares. El espacio comprendido entre las dos membranas, llamado córtex se llena de peptidoglucano, y alrededor de la membrana externa se acumulan proteínas altamente resistentes a disolventes, que se convierten después en la cubierta de la espora. Posteriormente la espora se rodea de una capa más delgada o fina llamada exosporio, y por último madura acumulando iones Ca^{2+} y ácido dipicolínico, lo que le confiere la propiedad de resistencia a altas temperaturas (Gould y Hurts, 1969).

La forma de la espora es elipsoidal y ocupa una posición subterminal dentro de la célula vegetativa. Resiste temperaturas muy extremas, desecación y una amplia variedad de productos desinfectantes, inclusive al etanol a 95%, por lo cual adquiere una gran longevidad de hasta 100 años (Sneath, 1986). A pesar de todo ello, las esporas no son eximidas al daño y a ser sensibles a la radiación ultravioleta, debido a que pierden viabilidad en menos de 24 horas, por exposición a luz del sol.

Ventajas y Desventajas de *Bacillus thuringiensis* Como Agente de Control Biológico

Bt es el patógeno con mayor éxito y potencial como agente de control biológico. Los bioplaguicidas basados en la bacteria tienen grandes ventajas sobre los plaguicidas químicos; una de ellas es su inocuidad en otros insectos benéficos como los parasitoides

o predadores que en general no son afectados por la acción patogénica de esta bacteria; debido a que es altamente tóxica para plagas específicas. Además para otros vertebrados, otros tipos de vida silvestre, el hombre y cultivos resulta inofensiva, pues no persiste en el ambiente. Su manipulación y utilización es segura aun hasta la fecha de la cosecha, lo que la hace apropiada para las aplicaciones en frutales, hortalizas y otros cultivos agrícolas. Se puede producir en grandes cantidades mediante procesos de fermentación y sus beneficios se ven incrementados por ingeniería genética (Rodríguez *et al.*, 1991; Hoyle, 1992; Khetan, 2001).

Existen algunos inconvenientes que han impedido hacer de *B. thuringiensis* un producto predominante en el ámbito del control de plagas, uno de ellos es su reducido espectro insecticida, evidente ventaja ecológica que lo hace compatible con el uso de enemigos naturales, pero que es una característica indeseable desde el punto de vista comercial. Por otro lado, al actuar sólo por ingestión, sus aplicaciones prácticas se ven limitadas. No todos los estados y estadios de desarrollo son igualmente susceptibles a la acción tóxica de la bacteria, por lo que se requiere conocimiento sobre los ciclos biológicos de las plagas para su correcta aplicación. Tiene poca persistencia, ya que las mezclas de cristales y esporas son fácilmente lavadas por la lluvia e inactivadas con rapidez por la luz ultravioleta. No se transmite de unos animales susceptibles a otros, habiéndose descrito escasas epizootias en la naturaleza (Iriarte y Caballero, 2001).

Modo de Acción de Bt

Las bacterias entomopatógenas actúan por ingestión, la bacteria por sí misma no tiene efecto tóxico ya que el complejo espora cristal es el que actúa en el intestino de los insectos susceptibles (Khetan, 2001).

El cristal debe ser ingerido por la larva y pasar por el estomodeo, solubilizándose en el mesenterón por acción de la alta alcalinidad del medio, que en su mayoría es de pH 9.5 (Escriche y Ferré, 2001), una vez que esto sucede, ocurre la proteólisis, es decir, la digestión de las proteínas del cristal gracias a las proteasas del insecto, de esta forma queda una proteína de 60-70 kDa (Khetan, 2001). La digestión va del extremo terminal carboxilo hacia el extremo terminal amino, aun así, hay cierta digestión de este último extremo El producto se denomina δ -endotoxina activada. (Escriche y Ferré, 2001). La δ -

endotoxina activada atraviesa la membrana peritrófica y la nueva conformación tridimensional le confiere especificidad absoluta para acoplarse a la membrana de las células epiteliales, al encajar en el componente glicoproteico o “receptor” (Gill *et al.*, 1992; Escriche y Ferré, 2001). De este paso, sigue la oligomerización de la toxina, lo que desencadena un desequilibrio en la estructura de la membrana, al abrir diversos poros que permiten la introducción de iones Na^+ y K^+ seguidos de agua (Escriche y Ferré, 2001), lo que a su vez provoca un incremento en el volumen del citoplasma, y que las células epiteliales alcancen su nivel máximo de distensión y estallen por el exceso de presión sobre ellas. Debido al daño provocado en el tejido intestinal, las larvas no logran asimilar y retener los compuestos en él (Knowles y Dow, 1993). Además, el contenido del mesenterón, el cual es altamente alcalino, se mueve hacia la hemolinfa y viceversa, lo que conlleva al aumento del pH de la hemolinfa con lo que la conducción nerviosa se detiene y paraliza al insecto, lo que deriva en el cese de cualquier actividad, incluyendo la alimentación, lo que es buena señal para el cese de daño a la planta atacada. La muerte llega por consecuencia en días. Por otra parte, el aumento del pH del intestino lo convierte en el ideal para la germinación de las esporas, iniciando con ello una septicemia (Gill *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998). Sin embargo, aun cuando las larvas muertas contengan en su intestino esporas y cristales de Bt estas no son un foco de infección para otros individuos de su especie, es decir no provocan epizootias.

Se considera que otras bacterias oportunistas saprofitas en su mayoría llegan al cadáver y son las que compiten con Bt por el espacio y alimento. En reportes recientes se ha publicado que son las bacterias del tracto digestivo las que en realidad provocan la septicemia y muerte del insecto, dejando así en entredicho la función de Bt como patógeno verdadero.

Cabe hacer la aclaración que en la literatura se habla en general de “la δ -endotoxina de *B. thuringiensis*” aun cuando en realidad se han reportado más de 500 diferentes δ -endotoxinas clasificadas como proteínas Cry de la 1 a la 67, las cuales a su vez se subdividen en grupos más específicos. La clasificación se basa en el grado de homología que se encuentra entre las cepas con relación a nivel de la secuencia de aminoácidos. Se ha comprobado asimismo que hay cepas que producen varias proteínas Cry relacionadas o no lo cual amplía su rango de acción. De la misma manera una especie de insecto

puede ser susceptible a más de una proteína Cry (Höfte y Whiteley, 1989; Crickmore *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998; Broderick *et al.*, 2006).

Bioensayo

El bioensayo se puede definir como “cualquier método que mida alguna propiedad de un factor, en términos de respuesta biológica”. Es decir, el bioensayo toma a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad, longevidad, fertilidad, crecimiento, atracción, etc.) para relacionar el factor causal con el efecto sobre el organismo. En el aspecto toxicológico, el factor causal es siempre un agente deletéreo y el efecto normalmente es la mortalidad o algún otro daño biológico (Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001).

Producción y Formulación de *Bacillus thuringiensis*

La formulación biológica se define como la combinación correcta de sustancias de tal manera que el ingrediente activo, junto con otros componentes, formen un producto estable, seguro y fácil de aplicar (Sawicka y Couch, 2002).

Es un hecho que la mayoría de los insecticidas microbianos son elaborados en base a la bacteria *B. thuringiensis*, la cual, para obtener resultados favorables como plaguicida debe ser ingerida por los insectos. En vista de esta premisa, se utilizan estados larvarios para probar su efectividad. La mayoría de los productos contienen esporas y toxinas (cristales) producidos por la bacteria de forma relativamente estable, siendo formulados como polvos humectables o líquidos ya que se requiere que se encuentre disponible el producto para realizar aspersiones acuosas sobre el follaje; algunos otros utilizan gránulos de almidón entre otros materiales para encapsular las esporas u otros aditivos como adherentes, protectores contra la luz ultravioleta o estimulantes de alimentación. Por otra parte, los genes de *Bacillus thuringiensis* han sido introducidos a cultivos de importancia comercial y alimenticia como lo son el algodón y maíz, ocasionando la producción de las toxinas por el follaje de las plantas haciendo la protección de estas de una forma directa (Van Driesche *et al.*, 1996). Las décadas de los 20 y 30 fueron los pioneros para la industrialización de lo que hoy conocemos como agentes de control biológico. En 1928 se realizó un proyecto en Europa con preparaciones de complejo

espora-cristal para el control del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*). Se desarrolló para el año de 1938 la primera producción comercial de Bt por los laboratorios Libec en Francia, con un producto llamado Sporeine, lo cual cesó con el inicio de la segunda Guerra Mundial. Aun así para el año de 1951 Jacobs fue uno de los primeros en reportar la efectividad de Sporeine para el control de *A. kuniella* (Beegle y Yamamoto, 1992, citado por Reyes-Ramírez y Ibarra, 2008).

En 1957, Pacific Yeast Products produce un formulado a base de Bt llamándolo Thuricide, iniciando el uso comercial en los Estados Unidos y en años posteriores diversifica el mercado en este País y en Europa con formulaciones y presentaciones variadas (Beegle y Yamamoto, 1992, citado por Reyes-Ramírez y Ibarra, 2008).

Hall en 1963 realizó breves descripciones de formulaciones en la producción de Bt usando el serotipo HD-1, donde incluye productos como Bactosporeine, Biospor, Entobacterin y Sporeine; seguido por Ignoffo y Anderson en 1979, quienes publicaron una lista más completa de productos manufacturados, donde el ingrediente activo fuera Bt (Couch y Ross, 1980). Se estima que en la década de 1990 el valor de las ventas mundiales anuales de las diferentes formulaciones de *B. thuringiensis* alcanzaron a 105 millones de dólares en EUA, mientras los insecticidas químicos llegaba a los 7.600 millones (Aragón, 2003).

La situación del control biológico cambió cuando se logró transferir los genes de *B. thuringiensis* que codifican las protoxinas Bt al genoma de las plantas, las cuales pueden ahora producir las proteínas Bt en sus tejidos. Actualmente se dispone de numerosos cultivares con resistencia a insectos con toxinas Bt (algodón, maíz, tomate y papa). En el cultivo de maíz se introdujeron inicialmente genes que producen toxinas específicas para dos barrenadores de gran importancia económica: el barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*) y el barrenador del Sur (*Diatraea grandiosella*) (Aragón, 2003).

La mayoría de los primeros productos comerciales estuvieron basados en Bt variedad *thuringiensis*, con el tiempo y el descubrimiento de las diversas cepas con que se cuenta ahora se fueron desarrollando formulaciones en presentaciones como pastas sólidas, líquidos y polvos que se mezclan con agua o algún surfactante (Ibarra, 1986). Las formulaciones para los agentes de control biológico deben ser desarrolladas de acuerdo con un objetivo primordial, el cual es proporcionar estabilidad a los agentes microbianos

durante la distribución y el almacenamiento, facilitar el manejo y la aplicación del producto, además de proteger a los microorganismos de los factores ambientales adversos. Su composición debe ser inocua al ambiente para poder seguir la premisa de control biológico. Por ello estas formulaciones han tenido que ser ampliamente mejoradas y sobre todo porque el comportamiento de los insectos es un fenómeno complejo (Rhodes, 1993).

Se han hecho esfuerzos para aumentar la efectividad de los insecticidas microbianos en campo y estos avances tienden a enfatizar el uso de materiales o métodos específicos, entre ellos se utilizan los adyuvantes, que son un tipo de sustancias empleadas para atrapar a los agentes microbianos de control; son desarrollados para ser un agente protector y además fungir como una estimulación, atracción del insecto y así alcanzar el efecto deseado (Dethier *et al.*, 1960; Ignoffo *et al.*, 1976).

Microencapsulación

La encapsulación es un proceso por el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidos en una matriz o sistema pared constituida por materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño microscópico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”; todos ellos presentan como característica común el tamaño de partícula, el cual es siempre inferior a 1mm. El recubrimiento se realiza con el objetivo de impedir la pérdida de la sustancia bioactiva, es decir, se ha aplicado para preservar y/o proteger numerosos ingredientes e impedir que sufran cambios por causa de la acción de la luz y el oxígeno. La gran ventaja que representa este proceso de encapsulación es la liberación continua y gradual del compuesto englobado (Chen *et al.*, 1988; Vila Jato, 2001; Yañez *et al.*, 2002).

Historia de la Microencapsulación

El origen de la microencapsulación data del año 1931, en el que se publicó un trabajo dirigido por la National Cash Register que describía la formación de microcápsulas de gelatina según un procedimiento que en aquel momento recibió la denominación de “coacervación” para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina. La técnica

fue objeto de múltiples variaciones, siendo su aplicación más importante dirigida a la encapsulación de colorantes para la elaboración del papel de calco. Años más tarde, la microencapsulación encontró aplicaciones interesantes en el campo de la alimentación, por ejemplo para la encapsulación de aromas, vitaminas, la eliminación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas y en la agricultura, especialmente para la encapsulación de plaguicidas y fertilizantes (Vila Jato, 2001; Yañez *et al.*, 2002). Uno de los agentes más exitosos para la encapsulación de *Bacillus thuringiensis* es el almidón de maíz (Tamez-Guerra *et al.*, 1996), se utiliza principalmente como soporte debido a las ventajas de protección que proporciona al principio activo y de adherencia que presenta sobre otros soportes como las partículas de maíz quebrado, de arcilla o de salvado de trigo (Gillespie *et al.*, 1994). Sin embargo, la arcilla ha resultado de gran utilidad en las formulaciones de *Beauveria bassiana* (Studdert y Kaya, 1990), al igual que la parafina en este mismo agente (Feng *et al.*, 2004). Otros soportes que han demostrado ser efectivos son la harina de maíz (McGuire *et al.*, 1996), la gelatina y la pectina (Morales-Ramos *et al.*, 2000), la quitina y el alginato (Morales-Ramos *et al.*, 1998), y la harina de maíz nixtamalizada (Tamez-Guerra *et al.*, 1998). En el Cuadro 1 se presentan diversos materiales microencapsulantes agrupados por tipo de material.

Cuadro 1. Tipo de coberturas utilizadas en la encapsulación.

Tipo de Cobertura	Cobertura específica
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas
Proteínas	Gluten, caseína, grenetina, albúmina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

Fuente: Yañez *et al.* (2002).

Microencapsulado de *Bacillus thuringiensis*

La finalidad de elaborar encapsulaciones de agentes de control microbiano como lo es *B. thuringiensis* se fundamenta en realizar un mejor control sobre el insecto plaga de interés, haciendo efectiva y menos compleja la liberación al medio de este agente de

control. Diversos trabajos muestran la evaluación de más de un tipo de agente embebedor o encapsulante. Torres-Ortega *et al.* (2006) diseñaron y elaboraron formulados granulares a base de polímeros biodegradables como Capsul®, pectina, gelatina y componentes naturales de plantas como grano de maíz, espata (hoja que recubre al elote) y olote, utilizando como principio activo el complejo espora-cristal de la cepa HD-125 de *B. thuringiensis*. Se observó que las formulaciones desarrolladas fueron tan eficientes como el bioinsecticida comercial Dipel®, a pesar de que este se encuentra formulado a una concentración de 20%, mientras que las formulaciones elaboradas para este trabajo fueron de 3 a 10%, siendo el de 3% tan efectivo como el comercial, lo que indica una reducción significativa del principio activo con una capacidad toxica igual o superior. Este trabajo demuestra la alta efectividad de una formulación cuando se conjuntan el soporte y el principio activo adecuados.

Son diversas las causas para justificar la búsqueda de una nueva formulación que ayude en la mejora de los productos comerciales a base de entomopatógenos, como lo es buscar una aplicación uniforme, una forma más sencilla de manejo, el aumento de la vida de anaquel y la conservación, o potencialización de las propiedades del agente de control por un periodo más corto. Delgado-Puchi (2005) evaluó la eficacia y persistencia de cuatro formulaciones en base a *B. thuringiensis* serovar *israelensis* contra larvas de *Anopheles aquasalis* en donde se obtuvo la CL₅₀ y TL₅₀ (tiempo letal cincuenta) de tres productos comerciales y un microencapsulado como formulación en prueba, siendo este el que obtuvo las CL₅₀ y CL₉₅ más bajas con respecto a los formulados comerciales (de 0.006 y 0.05 ppm, respectivamente); no obstante, para el TL₅₀ el microencapsulado obtuvo el valor más alto. Es en este punto donde se demuestra otra propiedad sumamente buscada al realizar formulaciones con encapsulados como es la liberación gradual del efecto y la protección prolongada del Bt, la cual queda mostrada en este trabajo, al presentar el TL medio superior al mostrado por las formulaciones comerciales.

A pesar de que en la mayoría de las formulaciones tanto para bacterias como para hongos se utiliza el microorganismo completo, en algunos casos se ha buscado realizar la encapsulación únicamente del agente toxicológico como lo es el cristal de *B. thuringiensis*. Ramos-Gutiérrez *et al.* (2004) probaron la susceptibilidad de *Helicoverpa*

armiguera (Hübner) y de *Earias insulana* a la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*, utilizando un formulado comercial en base a la microencapsulación de cristales con 17.9% de la δ -endotoxina Cry1Ac procedente de *Bt* subespecie *kurstaki*. Para *E. insulana* la CL₅₀ fue 1,83 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que es 9 veces más susceptible a Cry1Ac que *H. armígera*, con una CL₅₀ = 16,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los autores comprueban la susceptibilidad de ambas especies a la toxina encapsulada en larvas neonatas.

Algunos trabajos sobre formulación de *Bacillus* profundizan para probar el efecto sobre la viabilidad. Bregni *et al.* (2000) desarrollaron y probaron un microencapsulado con alginato de sodio en base a la bacteria *Bacillus subtilis*, preparada mediante el método de coacervación-separación de fases, utilizando una etapa intermedia de emulsión múltiple. Las condiciones de preparación fueron lo suficientemente benignas para no producir cambios en las propiedades biológicas generales del sistema pero con la protección que le otorga la matriz del hidrogel, la cual evita la directa comunicación con el medio externo. La viabilidad demostrada por las microesferas con las formas esporuladas (2% w/w) fue significativamente superior a las de las formas vegetativas (2% w/w). Se concluye que la protección que proporciona la matriz de alginato a las esporas de la bacteria ayuda en periodos posteriores a su germinación. Otros trabajos se enfocan en la adición de un surfactante o adherente, e incluso fagoestimulantes, Los estimulantes de la alimentación o fagoestimulantes permiten el uso de concentraciones reducidas del ingrediente activo en los insecticidas. Estos son factores muy importantes cuando el entomopatógeno tiene que ser ingerido para ser efectivo Rosas-García y De Luna-Santillana (2006) diseñaron matrices microencapsulantes a partir de compuestos naturales totalmente biodegradables, evaluando su actividad contra *Argyrotaenia* sp., un lepidóptero plaga del aguacate. Las matrices se prepararon en base a un encapsulante de almidón de maíz Capsul® en combinación con los adherentes goma de guar, goma arábiga y gelatina; y con los fagoestimulantes hoja de aguacate en polvo y la cascara de aguacate en polvo. Se encontró que la mejor combinación fue la encapsulación con almidón de maíz con el fagoestimulante hoja de aguacate en polvo y como adherente la goma arábiga. Los alginatos son compuestos que incluyen una variedad de productos constituidos por los ácidos D-manurónico y L-gulurónico, extraídos de algas pardas conocidas como Phaeophyta. No todos los alginatos gelifican pero son bien conocidos

por su capacidad para producir geles irreversibles en agua fría, y en presencia de iones Ca^+ (Pasquel, 2010).

La técnica de microencapsulación de cepas de *B. thuringiensis* con alginato ha resultado muy recomendada, ya que este material cumple con la función protectora hacia el microorganismo entomopatógeno del daño posiblemente originado por los rayos UV por un periodo prolongado.

Características de *Manduca sexta* (Linneo)

El adulto del gusano cuerno del tabaco, como suelen llamarle a *Manduca sexta* L. tiene una extensión alar de 10 a 12 cm., alas anteriores mucho más grandes que las posteriores, con el cuerpo robusto en forma de huso y cilíndrico, proboscis muy larga y enrollada, antenas con su parte distal en forma de gancho, la coloración es grisácea con seis manchas anaranjadas a los lados del abdomen. Las hembras ovipositan en el envés de las hojas o sobre los frutos situados en la parte media de la planta, el período de incubación es de cuatro a seis días. El estado larval dura tres a cuatro semanas y pasa por cinco instares, es de color verde claro a verde oscuro, mide de 7.5 a 10 cm de longitud con siete líneas blancas oblicuas en cada lado y con puntuaciones negras en el borde anterior de tales líneas, poseen un cuerno en el octavo segmento abdominal. Las larvas se alimentan del follaje, tanto en almácigos como en terrenos de cultivo; cuando las infestaciones son elevadas pueden ocasionar fuertes daños al fruto (Anaya y Romero, 1999). Al término de este estado larval se introducen al suelo a una profundidad de 7 a 10 cm para pupar dentro de una celda de tierra, durante tres o cuatro semanas.

Los estados de México más afectados por esta especie son Sonora, Chihuahua, Nayarit, Colima, Veracruz, y Puebla; en lugares donde se cultiva jitomate, tomate de cascara, tabaco, y posiblemente otras solanáceas silvestres. *Manduca sexta* es un insecto modelo de estudio en diversos trabajos por su alta susceptibilidad a las toxinas insecticidas de la familia Cry1, al igual que varias familias del orden Lepidoptera (Alzate *et al.*, 2009; Praça *et al.*, 2004), Entre estas toxinas se encuentra la proteína Cry1Ac de la cepa HD-1, misma que se utilizó para formar la encapsulación con alginato de sodio de este proyecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y Características del Sitio Experimental

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioinsecticidas del departamento de Bioquímica y Biotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, en el estado de Guanajuato.

Microencapsulados

Se recibieron seis muestras de microencapsulados del laboratorio de la Dra. Josefina Barrera, del CINVESTAV México. La primera fue el microencapsulado sin *Bacillus thuringiensis* y sin irradiar (Alginato), microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* sin irradiar (ME), microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* irradiado uno (MEI 1) irradiación a 254 nm (Luz UV-C), microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* irradiado dos (MEI 2) irradiación a 354 nm (Luz UV-B), microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* irradiado 20 minutos (MEI 20) 354 nm, microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* irradiado 24 horas (MEI 24) 354 nm (García-Gutiérrez *et al.*, 2011).

Diseño Experimental

Utilizando la técnica de plaqueado, se realizaron como mínimo 3 repeticiones de los bioensayos con larvas de primer instar de *M. sexta* por muestra de microencapsulado. Se realizó la preparación de la dieta, incorporando a ésta los microencapsulados de *B. thuringiensis* en diferentes concentraciones. Se probó el grado de toxicidad teniendo como parámetro comparativo la CL_{50} de la cepa HD-1 sin formular.

Para cada uno de los bioensayos se utilizaron 20 larvas por repetición constando de 2 placas con 10 larvas cada una, además del testigo, revisando éstos cada 24 h, hasta llegar al quinto día, donde se realizó la cuantificación de la mortalidad.

Ciclo de *Manduca sexta*

Entre las principales características por las cuales se elige trabajar con esta especie de insecto es que pertenece al orden Lepidóptera, ya que la cepa HD-1 que sirvió como

base para realizar la formulación de Bt ha demostrado ser tóxica contra insectos de este orden. Se considera una especie por demás estudiada y se encuentra perfectamente establecida en colonias de forma controlada en diversos laboratorios e insectarios, lo cual facilita la obtención de material biológico para los bioensayos, fácil de manipular y con rangos de mortalidad establecidos que sirven de referencia en cuanto a la reacción y obtención de resultados, así como en el análisis de estos mismos.

Las larvas de primer estadio larvario de *M. sexta* que se utilizaron como sujeto de prueba, se obtuvieron de una colonia que se mantuvo en distintos estadios larvarios y adultos (Figura 2 B y D). En primera instancia se obtuvieron huevecillos de *M. sexta* (Figura 2 A), de adultos provenientes del insectario del CINVESTAV Unidad Irapuato. Éstos se colocaron en una caja Petri y se incubaron en una cámara ambiental Scorpion Scientific con condiciones controladas de temperatura (28 °C) y humedad relativa $70\pm 10\%$ por un periodo de 2 a 3 días. Una vez que eclosionaron los huevecillos, se procedió a cambiar las larvas a una placa de dieta artificial en cajas petri de tres divisiones. Conforme se presentó el desarrollo de las larvas estas se cambiaron de caja y se aislaron cada vez más, hasta colocarse de forma individual en cajas petri de 18 mm de altura.

En cuanto las larvas alcanzaron el estado de pre-pupa, es decir; cuando comenzó a notarse a simple vista el corazón, se preparó una charola de plástico con vermiculita, la cual se humedeció con agua destilada (Figura 2 C). Las larvas se lavaron y se introdujeron en las charolas. Dichas charolas se colocaron en la misma cámara de crecimiento. Después las pupas se pasaron a las jaulas y se esperó hasta que completaran su metamorfosis. Una vez emergidos los adultos, éstos se cambiaron a una jaula más amplia en donde se alimentaron con solución de miel al 20%. En la misma jaula se colocó una planta de tabaquillo (*Nicotiana glauca*) con la finalidad de que ovipositarán en ella, una vez que lo hicieron, se retiró y se reemplazó por una nueva. Los huevecillos se retiraron de la planta y el material obtenido se sometió a refrigeración (12 °C) por un periodo no mayor a 5 días, con la finalidad de obtener material a distintos días (desfasados) en un período corto de tiempo. Después de este lapso de tiempo, primero se colocaron las larvas a temperatura ambiente y luego se pasaron a la cámara de crecimiento y se repitió el ciclo nuevamente.



Figura 2. Estadios del ciclo de *M. sexta*: A) Huevecillos, B) Larva, C) Pupa y D) Adulto

Bioensayos

Para la realización de los bioensayos se utilizó la técnica de plaqueado (Gutierrez-Agustin, 2008) la cual consiste en vaciar una alícuota o dosis sobre una placa de dieta artificial y esparcirlo de manera uniforme sobre la superficie de ésta, con una varilla metalizada, ayudado de una mesa giratoria. Se prepararon placas de dieta artificial para *M. sexta* en cajas Petri en el insectario (Figura 3 A). La dieta se cortó en pedazos uniformes con una espátula y se depositó en un vaso de precipitado de 500 mL. Se agregó una pequeña fracción de agua destilada (para compensar la pérdida de humedad en el proceso) y se fundió en un horno de microondas. Una vez fundida la dieta se vertió en cajas de Petri, tratando que las placas quedaran totalmente lisas en su superficie para facilitar el plaqueado y procurando que no se formarán burbujas en la superficie (Figura 3 B). Las placas gelificadas y libres de humedad en la tapa, se colocaron sobre un plaqueador (Figura 3 C) (Turntable) y se les agregó una alícuota de 200 μ L a determinada concentración del microencapsulado de la cepa HD-1 de *Bt kurstaki* diluida en el surfactante Tween 80 con una micropipeta. Con ayuda de una varilla metalizada de platino se extendió y difundió homogéneamente en toda la superficie de la placa (esterilizando la varilla entre el término y el inicio de cada plaqueado en distinta caja y

enfriándola en etanol al 96%). Una vez difundida toda la suspensión, se dejó secar la placa (las cuales fueron rotuladas previamente con nombre del tratamiento y fecha). El vaciado y plaqueado de la dieta se realizó dentro de una campana de flujo laminar VECO.

Al término de este proceso a las cajas se les colocó una rejilla plástica (previa desinfección en cloro, lavadas en agua destilada y expuestas a luz UV por un período mínimo de 12 horas) (Figura 3 D) y en cada celda se colocó una larva de primer instar (de una edad \leq 24 horas) (Figura 3 E), hasta un total de 10 larvas por cada caja. Estas se incubaron en la cámara ambiental por 5 días a 28 °C y 70 \pm 10% de humedad relativa. Se hicieron las observaciones respectivas y se registraron datos cada 24 horas, hasta un período final de 120 horas.

Para los bioensayos se obtuvieron concentraciones de diverso factor de dilución entre sí, y visualizar los límites fiduciales de acción en el formulado del complejo espora cristal por microencapsulación en alginato. Los primeros bioensayos se realizaron para comprobar la inocuidad del alginato en los insectos. Después se procedió a utilizar la formulación del complejo espora-cristal la cual se tomó como solución madre (SM) y se realizaron una serie de diluciones, tanto para esta muestra como para las muestras del microencapsulado irradiado con diversos tiempos de exposición a luz ultravioleta.

Re-suspensión de microencapsulado de *Bacillus thuringiensis*.

Al efectuar las diluciones del microencapsulado de Bt sin irradiar se presentaron en un principio contratiempos debido a que se formaban grumos y estos se precipitaban, lo que hacía difícil su homogeneización para realizar las diluciones y manejar la muestra con la técnica de plaqueado. Se infiere que se pudo deber a la diferencia de diámetro presente en las esferas de alginato, por lo que los primeros bioensayos resultaron con una variación sumamente grande. Ante este problema, se optó por hacer una homogeneización del microencapsulado y tomar una alícuota de la muestra antes de que precipitara por completo, y finalmente resuspender ésta en 8 mL de agua destilada. En la resuspensión se midió la concentración con respecto a la muestra original por medio del espectrofotómetro Diode Array Biowave S2100, teniendo como testigo agua destilada, y comparando con una alícuota del microencapsulado antes de re-suspender.

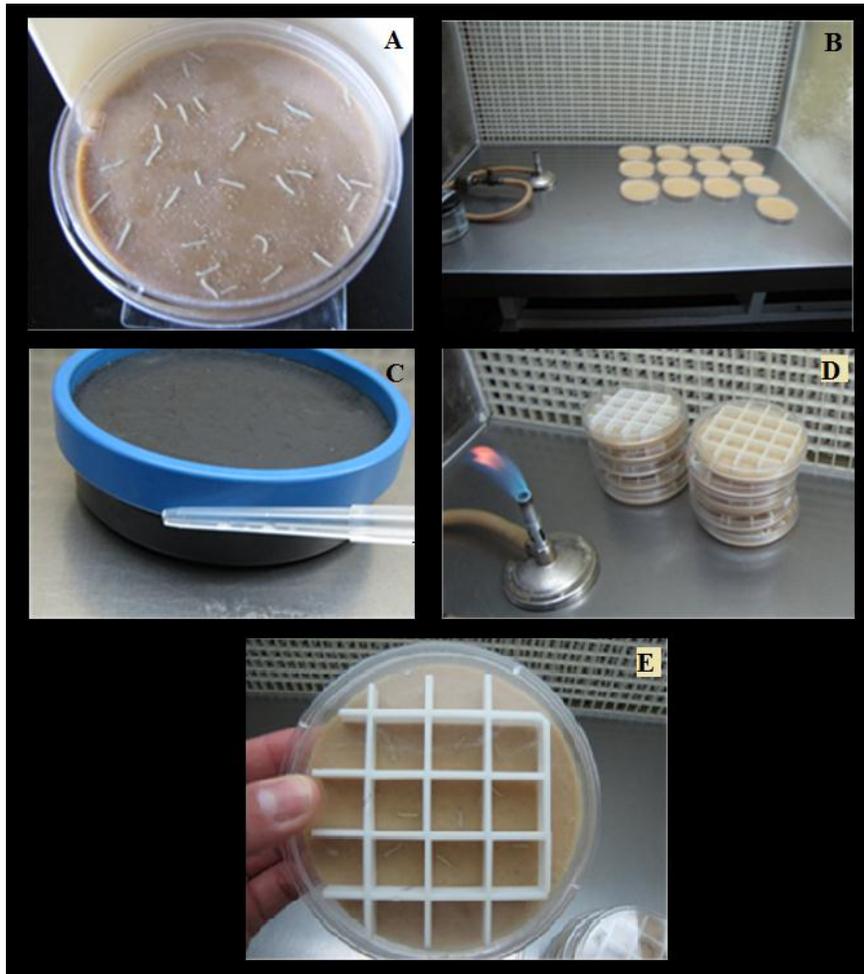


Figura 3. Fases del bioensayo para evaluar los microencapsulados de alginato. A) Larvas neonatas de *Manduca sexta*, B) Placas de dieta artificial, C) Mesa giratoria (Inoculating Turntable), D) Placas inoculadas con rejillas divisorias, E) Caja Petri con dieta artificial, inoculada para bioensayo y con larvas de 1er instar de *M. sexta*.

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE (PAA)

Para estimar la concentración inicial del complejo espora cristal dentro del microencapsulado y poder determinar la CL_{50} , se optó por realizar una cuantificación por comparación de masas en geles de poliacrilamida, para ello se llevó un proceso de crecimiento, purificación y cuantificación de cepas estándar, así como del microencapsulado.

Crecimiento y esporulación en medio líquido

Las cepas estándar utilizadas para la comparación del microencapsulado fueron: HD-1, HD-73 y LBIT-454 de Bt y se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV. Se adquirió de cada una un stock almacenado a -70 °C, y se utilizaron como blanco o estándar en la prueba de electroforesis.

Se crecieron las cepas a partir del stock por siembra en cajas Petri con medio agar LB (Luria Bertani) de la marca Bioxon, a excepción de la cepa LBIT-454 que es resistente a eritromicina y por ello se sembró en LB impregnado con el antibiótico eritromicina, posteriormente se obtuvieron cultivos en medio líquido y se procedió a la purificación de cristal proteico. Las cajas se colocaron dentro de una incubadora con agitación a 28 °C hasta la fase de autólisis, la cual fue en aproximadamente 48 h. A partir del crecimiento en medio sólido, se procedió al crecimiento de las cepas hasta autólisis en medio LB líquido, para ello se tomó el inóculo con un palillo estéril y éste se depositó en un matraz con 50 ml de medio líquido estéril. Para la cepa LBIT-454 se adicionó antibiótico eritromicina en una proporción de 1 mL⁻¹. Los matraces se incubaron a 28 °C por 48 a 72 h con agitación a 250 rpm, con objeto de asegurar la buena oxigenación del medio ya que no debe sobrepasar 25% de la capacidad total del frasco.

Una vez que se alcanzó el estado de autólisis en 80%, y después de su comprobación con el microscopio de contraste de fases, además de corroborar la ausencia de contaminación, se procedió a eliminar el medio por centrifugación (centrifuga Biofuge Stratos Heraeus) a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se efectuaron tres lavados con agua destilada y eliminación de la misma también por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C. En cada lavado se resuspendió la pastilla para el mejor lavado con agua destilada. Hasta esta fase se obtuvo el complejo espora cristal (Stewart *et al.*, 1981).

Purificación de los cristales paraesporales en gradientes de bromuro de sodio (NaBr)

El método para obtener cristal puro que se utilizó fue el de gradientes discontinuos con NaBr (Thomas y Ellar, 1983). La realización de bioensayos o de la determinación del perfil proteico puede realizarse a partir de suspensiones de esporas y cristales, o a partir de fracciones puras de cristales paraesporales. Sin embargo, para ciertas pruebas,

como por ejemplo la determinación de sinergismos de esporas y cristales, es necesario eliminar cualquier contribución debida a las esporas, por lo que se requiere la purificación de los cristales proteicos de *B thuringiensis*.

Tras el crecimiento y esporulación en medio líquido, las esporas y cristales se separaron por centrifugación en un gradiente discontinuo de bromuro de sodio (Figura 4).



Figura 4.Proceso de purificación de los cristales paraesporales en gradientes discontinuos de NaBr. A) y B): Formación de gradientes de NaBr.

El complejo espora cristal se mezcló con 5 mL de NaBr al 20% y se realizó el siguiente protocolo:

1. Se mezcló la suspensión en vortex Maxi Mix II durante 20s o hasta que se homogenizó la muestra.
2. Se depositó cuidadosamente la mezcla de cristales y esporas sobre la parte superior del tubo que contenía un gradiente discontinuo de NaBr (15 mL al 34% y 15 mL al 24%).
3. Se centrifugó a 200,000 rpm durante 1 h a 4 °C en la ultra centrífuga Beckman XL-90. Rotor de columpio SW-28.

4. Se recuperó la fracción de cristales precipitada en la interfase entre los gradientes de NaBr 34% y 24%. Las esporas quedaron en el fondo.
5. Se transfirió la fracción recuperada a un tubo de centrifuga de 50 mL y se completó el volumen con agua destilada hasta 50 mL. La adición de agua diluyó la muestra y facilitó la recuperación de los cristales.
6. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a 4 °C.
7. Se resuspendieron los cristales en 50 mL de agua destilada.
8. Se repitieron los pasos 7 y 8 dos veces.
9. Una vez más se repitió el paso 7.
10. Se verificó la pureza de los cristales observado una preparación del precipitado resuspendido en el microscopio óptico de contraste de fases Axioplan 2 imaging.
11. Se almacenaron los cristales a -20 °C
12. Se liofilizaron en un Liofilizador Labconco L4 pH Lock 4.5
13. El cristal liofilizado se almacenó a -4 °C

Obtención de perfiles proteicos

Una primera aproximación a la caracterización de los cristales de *B. thuringiensis* tanto en presencia de esporas como en su ausencia, se realiza con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En esta técnica, las proteínas son solubilizadas, disgregadas y desnaturalizadas, de tal forma que al ser analizadas en un campo eléctrico, su velocidad de migración depende exclusivamente de su tamaño. Se puede estimar el peso molecular de los fragmentos separados por comparación con la migración de marcadores de peso molecular conocido. En este trabajo se realizó la técnica de electroforesis para comparar la cepa HD-1 sin formular con la misma cepa formulada con el encapsulado de alginato de sodio, y se utilizó como parámetro de medición el grosor de las bandas que aparecieran en los geles de acuerdo a la concentración utilizada de cada una de las muestras mencionadas.

El presente protocolo fue preparado para el aparato Mighty Small (Hofer Scientific Instruments, USA) con geles de 8 X 10 cm y 0.5 de grosor, con peines y separadores de igual grosor. Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente (figura 5).

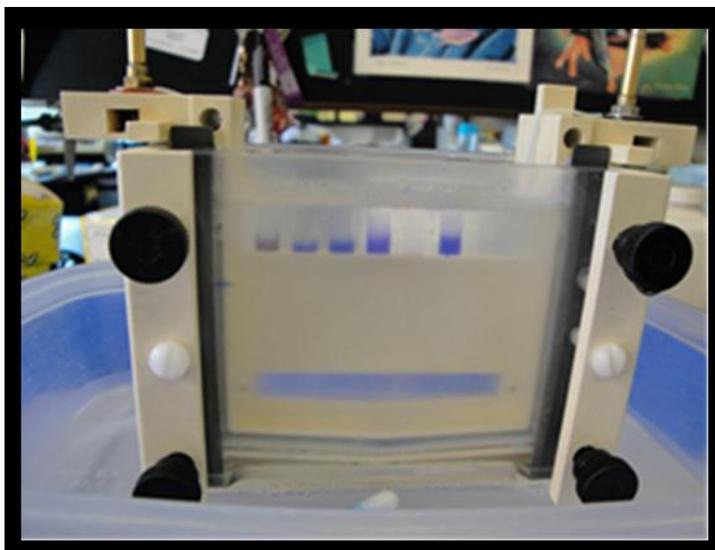


Figura 5. Cámara de electroforesis y gel de poliacrilamida con muestras de microencapsulado.

Preparación del gel de electroforesis

Reactivos que se utilizaron para elaborar el gel SDS-Poliacrilamida (SDS PAGE):

1. - 10% SDS (preparado con agua estéril)
2. - 1.0M Tris pH 8.8
3. - 1.25 M Tris -Cl pH 6.8
4. - 10% (peso / vol.) Persulfato de amonio (fresco o preparar una alícuota muy pequeña y guardarla a -20 °C).
5. - 40% Acrilamida – bisacrilamida (mezcla)
6. - Temed (Tetramethylethylenediamine)
7. - SDS (Dodecilsulfato de sodio) como Solución de disociación
8. - Solución Laemmli (Tris base 0.05M, Glicina 0.38M, SDS 0.1%)

Nota: El volumen de 20 mL sirve para dos geles de 8 X 10 cm de 1.5 de grueso. El volumen de 15 mL para dos geles de 8 X 10 de 0.5 de grosor

Procedimiento:

Se mezclaron los reactivos en las proporciones indicadas para obtener geles de diversas concentraciones porcentuales para los volúmenes indicados en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Reactivos para preparar gel de corrida SDS-PAGE a diferentes concentraciones.

Reactivos	Concentración 12%		Concentración 10%			Concentración 8%		
	15 mL	20 mL	15 mL	12 mL	20 mL	15 mL	12 mL	20 mL
H ₂ O	165	6.2	1.45	4.36	7.2	6.25	5	8.3
Acrilamida	4.5	6	3.75	3.0	5	3	2.4	4
Tris 1 M	5.6	7.4	5.6	4.48	7.4	5.6	4.48	7.4
SDS	0.15	0.2	0.15	0.12	0.2	0.15	0.12	0.2
Temed			0.005	0.004			0.004	
PSA			0.150	0.080			0.80	

Cuadro 3. Reactivos para preparar un gel concentrador SDS-PAGE

Reactivo	Cantidad/5ml
H ₂ O	1.725 mL
SDS	50 µl
Acrilamida	400 µl
Tris 1.25 M	500 µl
Temed	5 µl
Persulfato	50 µl

Elaboración del gel

Se siguió el siguiente procedimiento de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989):

1. Las dos placas de vidrio donde se montó el gel se manipularon con guantes e igualmente los reactivos. Estas placas se limpiaron exhaustivamente con agua jabonosa y posteriormente se aclararon con agua destilada y etanol al 96%.
2. Se ensamblaron las placas de vidrio con los separadores y se colocaron en conjunto en el soporte destinado al montaje de geles.
3. Se rellenó el espacio entre las placas con la solución al 10% para el gel de corrida hasta unos 5/6 de la altura total.
4. Se añadió una capa de etanol al 96% en la superficie superior para impedir el contacto de la acrilamida con el oxígeno y permitir la polimerización.

5. Se dejó polimerizar al menos una hora.
6. Se eliminó el etanol por decantación.
7. Se rellenó el espacio que quedaba entre las placas de vidrio con la solución para el gel de carga hasta que faltase aproximadamente 0,2 cm para su llenado total.
8. Se colocó el peine para dejarlo polimerizar al menos 1 hora.
9. Al término se guardó en refrigeración a -4 °C.

Electroforesis del Microencapsulado de *Bacillus thuringiensis*

Primero se liberó el complejo espora-cristal del alginato y para ello se tomó 1 mL del microencapsulado de Bt (Figura 6 A) al cual se le agregó 10 mL del citrato de sodio al 3.2% y se re suspendió agitando en el vortex. Una vez que se tuvo el complejo espora-cristal liberado del alginato (Figura 6 B), se tomaron 1.5 mL de esta muestra y se colocaron en un tubo eppendorf, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C; se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 500 µl de buffer de carga 2 β-mercaptoethanol para poder trabajar con la muestra y correr el gel.

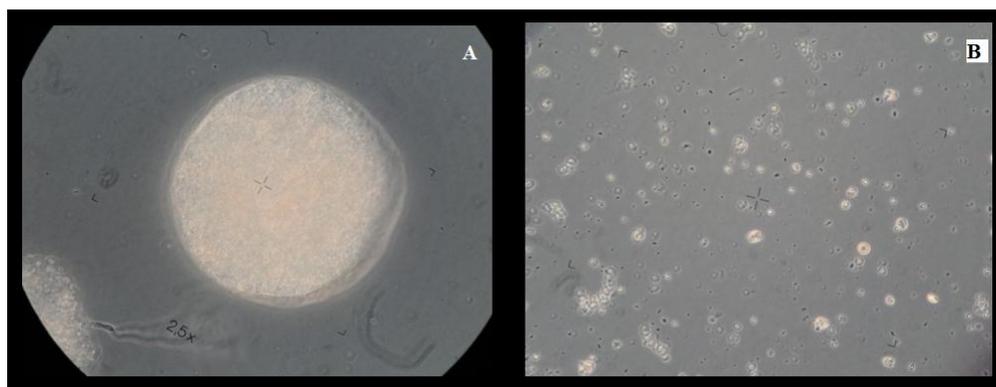


Figura 6. Separación de la espora-cristal del alginato en los microencapsulados .A) Microencapsulado de Bt observado en microscopio óptico compuesto (100x), B) Liberación del complejo espora-cristal del alginato de sodio observada con una amplificación 1000x

Electroforesis de cepas de *Bacillus thuringiensis*

Después de la liofilización de las cepas HD-1 de Bt serovar. *kurstaki* , se pesaron y se diluyeron en buffer de carga para electroforesis, en una proporción de 10 µg µl⁻¹ de

buffer. Se obtuvieron 8.6 mg de la cepa HD-1, 31.6 mg de HD-73 y 15.3 mg de la cepa LBIT-454.

Para correr el gel de comparación entre la cepa estándar y la del microencapsulado se estandarizó la cantidad de muestra de cada cepa que se debe depositar dentro de los pocillos, por lo cual se realizaron cinco diluciones y dos concentraciones partiendo de la muestra mencionada de $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de buffer, la relación muestra: buffer se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 4. Relación entre la muestra del cristal purificado y el microencapsulado con el buffer de carga.

Muestra	Muestra $10 \mu\text{g} / \mu\text{l}$	Buffer de carga
M1	40 μl	0
M2	20 μl	0
M3	10 μl	0
M4	5 μl	5 μl
M5	2.5 μl	7.5 μl
M6	1.25 μl	8.75 μl
M7	0.625 μl	9.375 μl

Las muestras y sus diluciones se colocaron en baño maría para hervir la muestra durante 5 min., esto con la finalidad de ayudar a la desnaturalización de las proteínas.

Separación de las proteínas

1. El gel previamente preparado se montó en el soporte de electroforesis y se retiraron los peines de ambos lados. Resultó muy útil marcar la forma de los pocillos en el cristal con un rotulador para tener una guía de dónde se encuentran localizados.
2. Se añadió una solución tampón de electroforesis a las cubetas superior e inferior, dejando que se llenen los pocillos del gel.
3. Se introdujo una muestra en cada pocillo evitando que sobresaliera por los bordes y contaminará los pocillos contiguos.
4. Se conectó el soporte de electroforesis al generador de campo eléctrico (fuente de alimentación) utilizando una intensidad constante de 20 mA y cambiar a 90 mA al llegar al gel de corrida. Se siguió el progreso de la separación, observando la

migración del frente coloreado constituido por el azul de bromofenol presente en las muestras (Figura 5).

5. Se finalizó la electroforesis momentos después de que el frente alcanzó la parte inferior del gel y la muestra salía.

Revelado de las bandas proteicas

1. Al término de la electroforesis se desmontaron las placas para extraer el gel.
2. Se sumergió el gel en la solución de tinción azul de Comassie R, y se incubó con agitación a 50 rpm durante 30 min.
3. Se eliminó la solución de tinción por decantación y se añadió la solución decolorante hasta cubrir bien el gel colocando además unas esponjas que absorbieran el exceso de colorante.
4. Se incubó el gel con agitación a 50 rpm toda una noche (8 h) hasta que se obtuvo un fondo de gel transparente en el que resaltan las bandas proteicas teñidas de azul.

Análisis Estadístico

El análisis Probit se basa en la estimación de una serie de parámetros para determinar la concentración letal media, estos son: el valor de ji-cuadrado (x^2) y la pendiente de la recta de regresión. Existen diversos requerimientos estadísticos del análisis Probit para los bioensayos con *Bacillus thuringiensis*:

- 1) La mortalidad natural en los individuos testigo debe ser igual o menor al 10%.
- 2) El valor de la x^2 (ji-cuadrada) en un bioensayo de 6 dosis debe ser menor o igual a 5.
- 3) De una serie de 6 dosis probadas, el valor de la CL_{50} estimada debe estar contenido entre la segunda y la cuarta dosis.
- 4) Por lo menos 4 de un total de 6 dosis probadas deben causar una mortalidad entre 10 y 90%.
- 5) El valor de la pendiente de la línea de regresión debe ser de 1.5 a 6.
- 6) El cociente entre el límite fiducial mayor y el menor ($P=0.95$) debe ser menor o igual a 2.
- 7) Debe realizarse por lo menos 3 repeticiones válidas, por separado.

- 8) El coeficiente de variación (CV) de la CL_{50} media (estimada a partir de las repeticiones) debe ser igual o menor a 20% (Ibarra y Federici, 1987).

Se deben prever la estandarización de ciertas condiciones en los bioensayos de manera que, aun cuando los organismos en prueba sean muy similares (especie, edad, peso, etc.) no exista una gran variación:

- 1) Modo de suministro y provisión del material tóxico.
- 2) La edad del insecto sobre el que se prueba el material tóxico
- 3) La técnica para integrar el material tóxico si se suministra sobre una dieta natural o artificial,
- 4) El número de insectos utilizados por repetición y el número de dosis probadas.
- 5) El tiempo de exposición, factores físicos ambientales (temperatura, humedad, fotoperiodo); entre otros (Ibarra y Del Rincón-Castro, 2001).

En el caso de un bioensayo con Bt en el que se desconoce el rango de actividad de la preparación por valorar, como es la caracterización toxicológica de una formulación del complejo espora-cristal, es recomendable iniciar los bioensayos con 2 o 3 dosis altas cuyo factor de dilución entre ellas sea de 0.1. Este tipo de bioensayos nos ayudó a demostrar de forma cualitativa si el producto es tóxico, es decir, si tiene o no actividad contra el insecto *M sexta*. Además determinó el intervalo de actividad o “ventana biológica” del producto que se evaluó. El siguiente paso consistió en probar el producto en una forma cuantitativa, utilizando 5 dosis con un factor de dilución de 0.5 entre ellas. Este tipo de bioensayo fue preliminar y aun no resultaba adecuado estimar los parámetros necesarios, mediante análisis Probit, sin embargo, nos dio una estimación burda de la CL_{50} , la cual se utilizó para calcular el intervalo de dosis del siguiente paso. Este consistió en una serie de bioensayos con un mínimo de 6 dosis con un factor de dilución entre 0.6 y 0.8 (dependiendo del comportamiento de los intervalos de dosis probados). Finalmente se utilizó una última serie de bioensayos con 6 dosis y un factor de dilución de 0.7. Todos estos bioensayos fueron para estimar los parámetros requeridos para el análisis Probit (Finney, 1971).

Normalmente, las pruebas toxicológicas de nuevas cepas y formulados, se llevan a cabo sobre larvas de insectos altamente susceptibles, de ahí que sea frecuente que las cepas del patotipo I se prueben contra el primer instar del gusano del cuerno del tabaco, *M. sexta*, las cuales se criaron sobre dieta artificial en condiciones de insectario (28 ± 2 °C, $70\pm 10\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo de 8:16 h oscuridad-luz). Se seleccionaron aquellas larvas que lograron adaptarse satisfactoriamente a la dieta, después de 24 h de haber eclosionado, eligiendo las más vigorosas y mejor desarrolladas. Se tomaron como unidad de muestra un número mínimo de 20 larvas por dosis, poniéndose un testigo negativo en cada prueba con Tween 80 y, de esta forma, se determinó el porcentaje de mortalidad natural mediante análisis Probit.

Análisis estadístico de concentración de cristal toxicológico de microencapsulado. Para poder realizar la comparación estadística de la concentración de cristal tóxico en la cepa HD-1 y la formulación del microencapsulado se tomaron fotografías a los geles PAGE con una cámara digital que tenía un filtro color rojo para eliminar el brillo y coloración azul. Estas se modificaron con el programa Adobe Photoshop 7.0 ® para cambiar el tono rojo de la fotografía por una escala de grises, después se analizaron con el programa Quantity One® versión 4.6.3 BIO-RAD (Díaz-Mendoza, 2006; Zhu *et al.*, 2005) para cuantificar los píxeles por mm^2 de cada banda. Los datos obtenidos se pasaron a un archivo en Excel® para transformarlos y analizarlos con una regresión lineal. Finalmente se realizó la conversión de $\text{píxeles}/\text{cm}^2$ a $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los datos de los bioensayos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de Microencapsulados por electroforesis en PAA

Con electroforesis en geles de PAA se logró determinar la concentración del cristal en el microencapsulado de Bt en el microencapsulado. Sin embargo, algunos autores sugieren realizar otro tipo de pruebas o ensayos para realizar esta determinación como lo es la prueba de Bradford en la cual se puede reconocer la concentración de la cantidad de proteína de cualquier dilución, o el método de Biuret en donde se realiza una coloración de la muestra, la lectura en espectrofotometría de masas, o alguna prueba similar (André *et al.*, 2008).

Uno de los aspectos por lo que se optó por la electroforesis fue la certidumbre del peso molecular de la proteína de la muestra, que a pesar de no ser totalmente pura, no influiría en el peso molecular de los cristales pero si detecta proteínas de otro peso molecular. La electroforesis con las 7 concentraciones ($40 \mu\text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{L}^{-1}$, $5 \mu\text{L}^{-1}$, $2.5 \mu\text{L}^{-1}$, $1.25 \mu\text{L}^{-1}$, $0.625 \mu\text{L}^{-1}$) mostraron que la cepas LBIT-454 y HD-73 no se encontraban purificadas debido a que se observaron más de 2 bandas en las muestras y a pesar de que esto no afecta la determinación del cristal, se descartaron ambas cepas como parámetros de comparación ya que podrían ocasionar confusión y valoraciones erróneas con el software utilizado. La cepa HD-1 dio un excelente bandeo y fue muy similar al mostrado por el microencapsulado (Figura 7), características deseada para realizar la interpolación y la cuantificación de la proteína embebida dentro del microencapsulado de alginato en la formulación, lo contrastante es una diferencia de grosor de las bandas directamente proporcional a la concentración. La cepa HD-1 posee genes cry que codifican proteínas de aproximadamente 133 KDa que forman inclusiones cristalinas bipiramidales y que son las observadas en el gel (Figura 7), estas se sintetizan como protoxinas y se activan por proteólisis en toxinas de 65KDa. Para la evaluación, se consideraron las diluciones que mostraron mayor nitidez y claridad en el bandeo y fueron 10, 5 y $2.5 \mu\text{L}$ de la preparación de la cepa HD-1 en buffer de carga con una concentración final $10\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$, y que corresponde a 100, 50 y 25 μg de proteína pura en los pozos. Para el microencapsulado se tomaron las mismas cantidades sin conocer la

concentración ya que fue nuestra incógnita en el proceso. El patrón de bandas obtenido se muestra en la Figura 7.

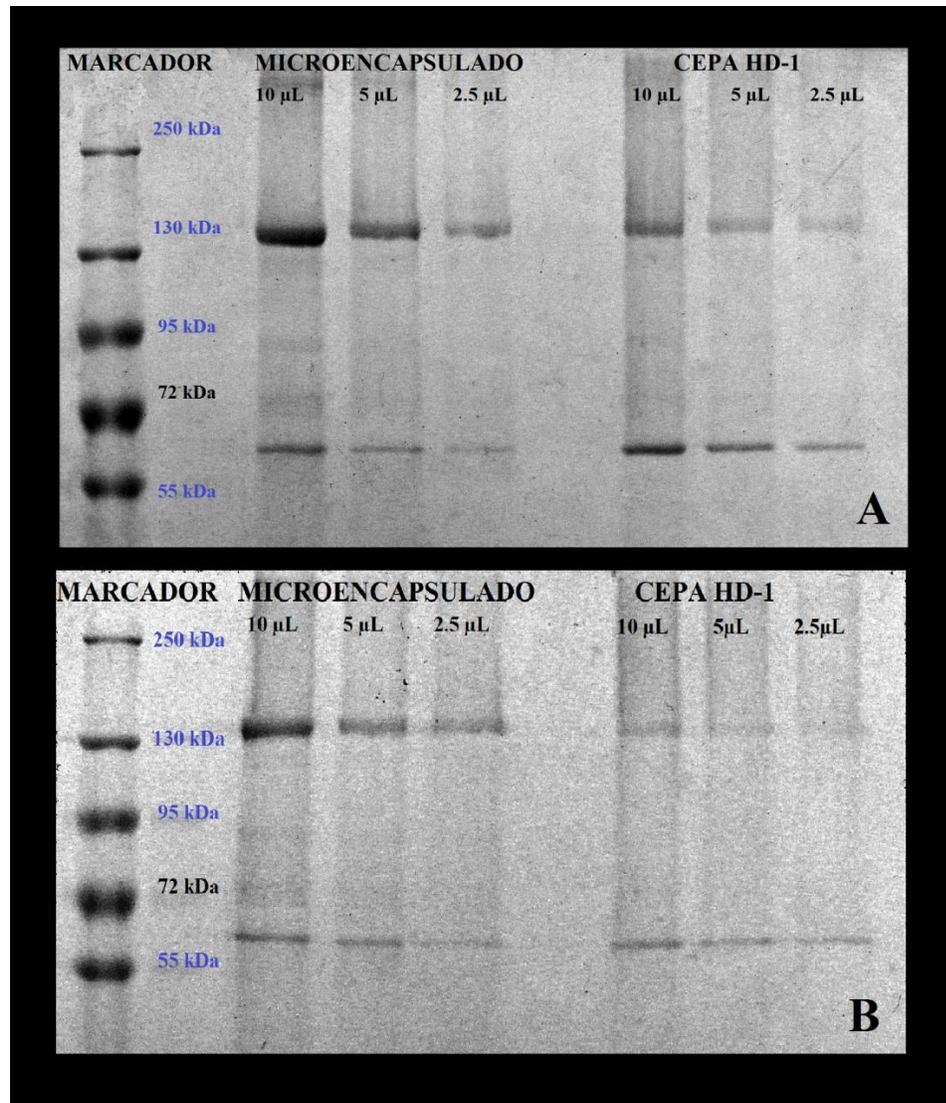


Figura 7. Electroforesis en Geles SDS-PAGE para la determinación de la concentración de la proteína cristal en el microencapsulado con relación a la cepa HD-1. A) y B) corresponden a dos ensayos que muestran las bandas respectivas a tres concentraciones del microencapsulado y de la cepa HD-1.

La cuantificación de las bandas con el programa Quantity One® se muestra en la Figura 8, tomando en cuenta el número de pixel/mm² arrojado para la cepa HD-1. Partiendo de estos datos se realizó el análisis de regresión lineal simple en donde se

interpolan las bandas incógnita que en este caso son los de las muestras del microencapsulado, tomando como referencia el grosor y peso de las bandas de la cepa estándar HD-1, la cual es la misma que se encuentra embebida dentro de la formulación de alginato. Se observó una relación completamente lineal (figura 9) entre los datos obtenidos tal y como se esperaba y se puede realizar la comparación entre estas dos rectas observando que es posible la interpolación.

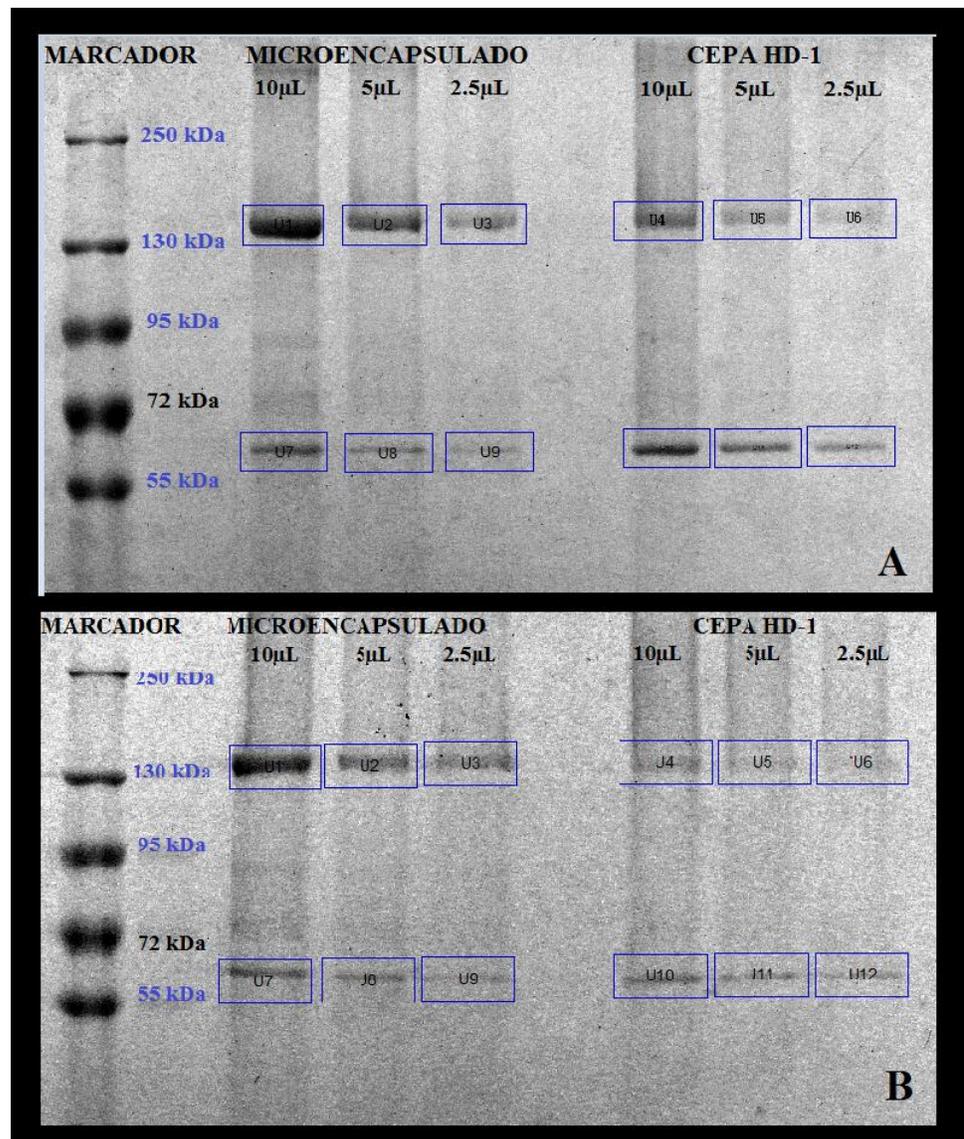


Figura 8. Transformación de las bandas de proteína a pixel/mm². A) y B) Dos ensayos que muestran el análisis de las bandas obtenidas en los gels con el programa Quantity One ®.

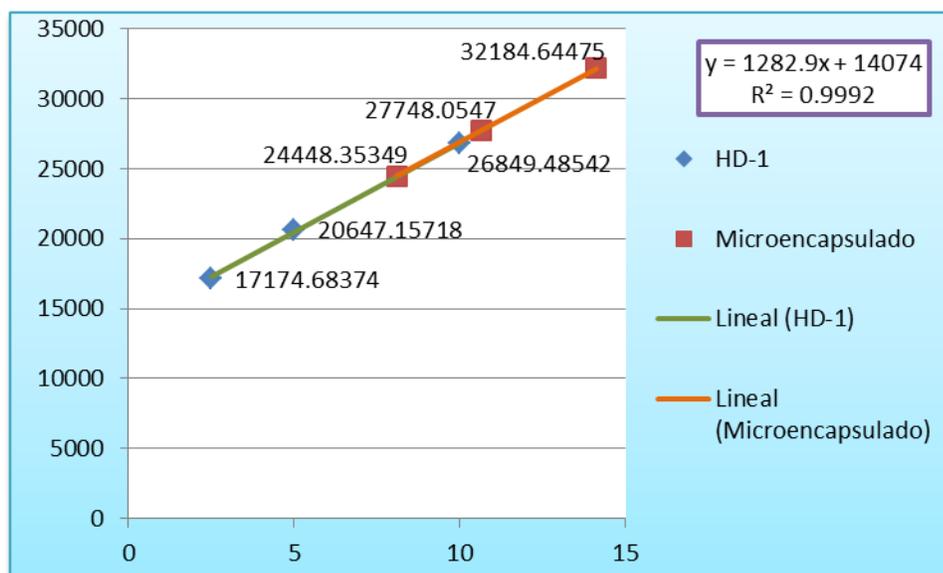


Figura 9. Determinación de la concentración de proteína en las muestras de ME Bt y HD-1. Relación lineal obtenida entre píxeles/mm² cuantificados en las bandas obtenidas por electroforesis y concentraciones de proteína.

Con las curvas de relación lineal se logró determinar la concentración de cristal puro en el microencapsulado de alginato con *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*, tomando para ello la media de las concentraciones estimadas en los cuatro análisis, que es de 22.2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, y por lo tanto la concentración para la solución madre, es decir, en la muestra original del microencapsulado de Bt es de 81.4 mgmL^{-1} de cristal puro.

Toxicidad de Microencapsulados

Pruebas de inocuidad del alginato: Antes de probar la formulación del complejo espора-cristal, se probó la inactividad del alginato. Se corroboró la inocuidad del alginato que es el agente embebedor del complejo espора-cristal comparándolo contra el surfactante Tween 80 al 0.02%, y al mismo tiempo se contrastó con una dosis alta del microencapsulado con Bt (280 $\mu\text{g/cm}^2$), realizando 4 repeticiones tanto del alginato como del Tween 80 y 3 repeticiones del microencapsulado. Las mortalidades con el alginato puro fueron inferiores a 10%, al igual que para el Tween 80, mientras que para el microencapsulado se obtuvieron mortalidades de 100% (Cuadro 5).

Cuadro 5. Inocuidad del alginato en comparación con Tween 80 y el encapsulado con complejo espора-сristal.

Repetición	Tratamiento	Dosis µg / cm ² de Bt	Indiv. Probados	Indiv. Muertos	% Mortalidad
1	Encapsulado Bt	280	20	20	100
	Alginato puro	0	19	1	5.3
	Tween 80	0	19	0	0
2	Encapsulado Bt	280	20	20	100
	Alginato puro	0	19	1	5.3
	Tween 80	0	18	2	11.1
3	Encapsulado Bt	280	20	20	100
	Alginato puro	0	20	0	0
	Tween 80	0	20	0	0
4	Alginato puro	0	20	2	10
	Tween 80	0	20	1	5
Totales	Encapsulado	280	60	60	100
	Alginato puro	0	80	4	5
	Tween 80	0	79	3	3.8

Con el objeto de corroborar la inocuidad del alginato, se corrió la prueba Honesta según Tukey en la cual se compararon los porcentajes de mortalidad de las muestras antes mencionadas (cuadro 6). No hubo diferencia significativa entre el surfactante Tween 80 y el alginato puro en toxicidad hacia larvas neonatas (Figura 9), resultados similares se han obtenido en otros trabajos donde se ha utilizado Tween 80 como testigo de bioensayos y se cumplió la premisa sobre la inactividad biológica que debe tener el agente encapsulante (Carballo, 1998). Por otro lado, se observó una diferencia significativa entre estas dos muestras y el microencapsulado con el complejo espора-сristal hacia la población de larvas de *M. sexta*. El análisis estadístico se corrió con un grado de significancia de 95%.

Cuadro 6. Análisis estadístico con la prueba honesta según Tukey que determina la inocuidad del alginato en comparación con el Tween 80 y el microencapsulado de Bt.

Comparación	Diferencia de		
	Medias	Q	Valor P
Testigo vs Alginato	-1.125	0.5508	ns P>0.05
Testigo vs Encapsulado	-95.975	43.503	*** P>0.001
Alginato vs Encapsulado	-94.85	42.993	*** P>0.001

Comparación	Diferencia de Medias	95% Intervalo de Confianza	
		De	A
Testigo vs Alginato	-1.125	-9.379	7.129
Testigo vs Encapsulado	-95.975	-104.89	-87.060
Alginato vs Encapsulado	-94.85	-103.77	-85.935

Prueba de Comparación Múltiple de Tukey-Kramer

Si el valor de q es mayor a 4.04 el valor de P es menor a 0.05

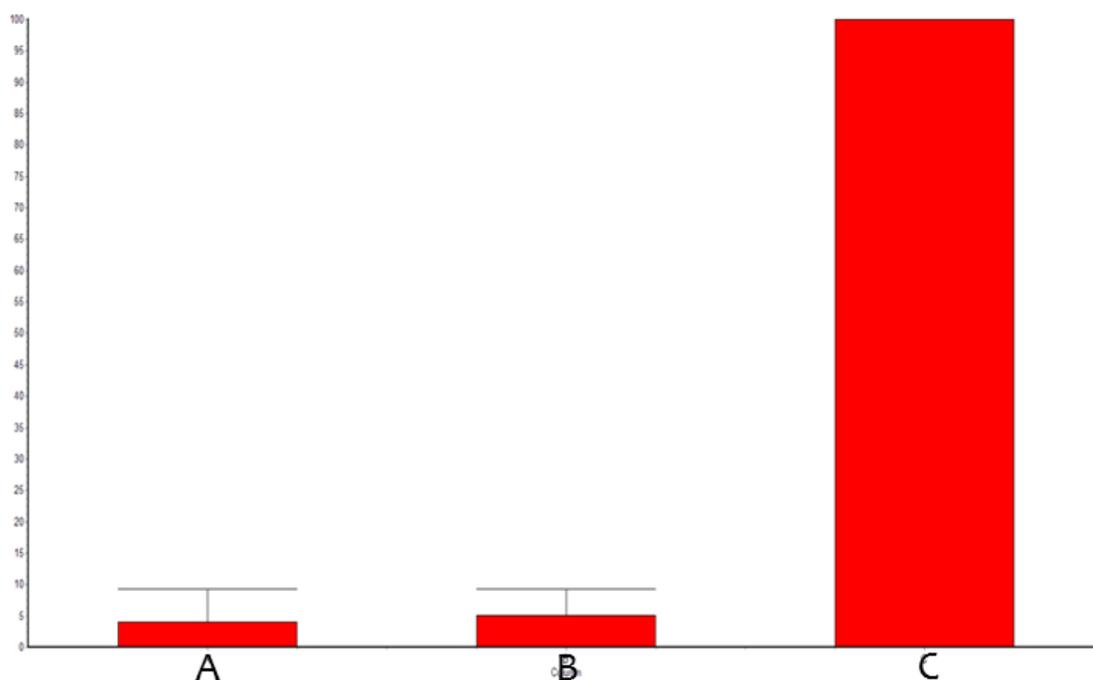


Figura 10. Análisis estadístico de los datos de inocuidad del alginato con la prueba Honesta según Tukey. Columna A) Testigo (Tween 80 al 0.02%), B) Alginato puro y C) Microencapsulado.

Toxicidad de microencapsulado de Bt

Después de corroborar la inocuidad del alginato, se realizaron los bioensayos con el microencapsulado de alginato con la cepa HD-1, y se utilizó como testigo una vez más Tween 80 al 0.02%. Al inicio se determinó de una forma burda el rango de mortalidad para la cepa HD-1 ya formulada. Se utilizaron cantidades partiendo de 81.4 mg mL^{-1} , realizando cinco diluciones hasta 0.407 mg mL^{-1} , empleando un factor de dilución (FD) de 0.10 a partir de la primer dilución con la cual se utilizó un FD de 0.05 partiendo de la solución madre o concentración inicial que fue el microencapsulado después de la resuspensión.

Una vez que se realizaron los primeros bioensayos, se determinó la CL_{50} a partir de 10 diluciones del microencapsulado resuspendido. Finalmente la última serie de bioensayos con una sucesión de seis concentraciones, constituyeron los bioensayos finos, los cuales se realizaron con un FD 0.3. En el cuadro 7 se muestran los resultados de los bioensayos con el microencapsulado de Bt. Se determinó una CL_{50} media de $23.6625 \mu\text{g/cm}^2$, la pendiente de la recta en los bioensayos 1 y 2 se muestran por debajo del parámetro indicado (1.5 a 6) y los bioensayos 3 y 4 a pesar de estar dentro del rango, los valores son bajos, revelando la necesidad de una mayor dosis para alcanzar mortalidades altas; asimismo los valores tan bajos de la pendiente nos dan muestra de la heterogeneidad de la acción toxicológica sobre la población de *Manduca sexta*. Se infiere por el valor de la desviación estándar y los límites fiduciales que este bajo nivel en la pendiente de la recta no es debida a la variabilidad en la población, sino al formulado ya que como explicamos anteriormente el microencapsulado no se disuelve homogéneamente y presenta precipitaciones y agregados; lo que dificultó la toma de alícuotas y aplicación sobre la dieta artificial en los bioensayos. El coeficiente de variación (CV) entre los cuatro bioensayos es muy aceptable, desvaneciendo duda sobre la variación entre las condiciones de los bioensayos, y apoya nuestra suposición. La mortalidad natural es un parámetro que muestra confiabilidad en la estandarización de las condiciones de los bioensayos ya que no se encuentra una mortalidad superior a 10%.

Respecto al valor de la ji-cuadrada, en los bioensayos 1, 2 y 4 se observa que son muy elevados, lo que indica fallas en la manipulación metodológica o heterogeneidad de la población.

Cuadro 7. Estimación de la CL₅₀ para microencapsulado con alginato de Bt, en *Manduca sexta*.

R	No.		CL ₅₀	Limites Fiduciales	CL ₉₅	Limites Fiduciales	Xi ²	Proporción	MAX/MIN	MN	PE	DM
	Larvas	P - σ	μg/cm ²	CL ₅₀ inf - sup	μg/cm ²	CL ₉₅ inf - sup		de toxicidad				
1	462	1.27 - 0.29	23.21	2.02- 49.73	454.64	187.08 - 11910.58	13.72	351.67	26.61	4%	C	A
2	195	1.17 - 0.23	22.76	10.47 - 49.45	569.7	249.92 - 1298.61	8.83	344.85	8.84	0%	C	A
3	200	1.66- 0.36	24.4	13.15 - 45.28	237.37	117.978 - 477.58	2.56	369.70	3.44	5%	C	A
4	200	1.56 - 0.49	24.28	0.15 - 57.83	273.8	107.96 - 181594.82	18.53	367.88	388.14	0%	C	R
MEDIA			S	CV								
23.6625			35.49	1.5								

R= repetición

P= pendiente de la recta de regresión, σ =desviación estándar

Xi² = ji-cuadrada

MAX/MIN= cociente de los limites fiduciales

MN= mortalidad natural del testigo

PE= punto de equilibrio de las dosis

DM= dosis media del bioensayo

A=aceptado, C= condicionado, R= rechazado

S= desviación estándar de las repeticiones

CV= coeficiente de variación de las repeticiones

Para la cepa HD-1 se ha estimado una CL₅₀ de 66.63 ng/cm² sin ser formulada y probada en condiciones de laboratorio (Maciel-Rosas *et al.*, 1994), por otra parte Rosas-García (2006), en dos formulaciones en base a biopolímeros, un granulado y un spray con una cepa de Btk, utilizando dosis de 30, 70 y 100 g/Kg en *Diatraea saccharalis* obtuvo una CL₅₀ de 33.21µg/L. Este valor es similar al obtenido en este trabajo. No obstante la mayor parte de los trabajos de encapsulación con polímeros y biopolímeros está dirigido hacia la cepa *Bacillus thuringiensis israelensis*, como es el caso de las investigaciones de Maldonado Blanco *et al.* (2002), quienes trabajaron con encapsulados de parafina y alginato de sodio, formulaciones que utilizaron contra larvas de *Aedes aegypti*, encontrando diferencia al comparar los resultados con el polvo sin formulación; siendo la CL₅₀ del formulado de 16µg/L y del polvo sin formular de 6.3µg/L. Para el año 2007 el equipo de Maldonado-Blanco utilizó formulados con goma de acacia y gelatina como polímeros probándolo con larvas de *A. aegypti*, resultando una CL₅₀ de 48 µg/L y el polvo sin formular de 8.6 µg/L; más tarde en otro estudio similar en 2008 (Maldonado-Blanco *et al.*, 2008), probaron formulaciones con polímeros naturales contra *Culex quinquefasciatus* el cual mostró una CL₅₀ un poco más alta de 66µg/L. Aguilar-Meza *et al.* (2010) probaron un encapsulado de Bti con aluminium-carboxymethylcelulosa obteniendo una CL₅₀ de 61.2µg/L probándolo en mosquitos de *A. egypti*. En este y en los trabajos revisados se evidencia una diferencia inferior en cuanto a CL₅₀ por parte de las formulaciones con polímeros en comparación al polvo puro lo que significa que la acción protectora de la formulación en parte interfiere en la eficacia de la proteína dentro del intestino del insecto. Por otra parte la metodología utilizada para la preparación del formulado no fue la mejor, esto se concluye de la observación en la deposición del material; al respecto Martínez *et al.* (2002) refieren que la optimización en la formulación se puede afectar al encontrar cualquier inconveniente como la deposición ya que cada formulación es específica para cada polímero y núcleo.

Toxicidad de microencapsulados irradiados

En el cuadro 8 se presentan los resultados de los bioensayos con el microencapsulado de Bt sin irradiar e irradiados con diferentes intensidades de UV y tiempos de exposición. La pendiente de la recta en los cuatro microencapsulados irradiados son

valores bajos, considerando que los tratamientos por muestra van de 11 a 15, lo que es importante considerar al preparar los microencapsulados y elevar la dosis con respecto al microencapsulado de Bt no irradiado. La desviación estándar y los límites fiduciales muestran que estos últimos se encuentran lejanos en comparación al valor de la CL_{50} , dado un amplio espectro de toxicidad de los encapsulados; de la misma manera la ji-cuadrada muestra, con niveles elevados fuera de lo esperado la inestabilidad de los encapsulados.

La mortalidad natural fue menor a 10% en la muestra del encapsulado de Bt sin irradiar, que difiere de la mostrada por las cuatro muestras irradiadas; ya que en estas se logra apreciar que la mortalidad superó el rango óptimo dejando entre ver que la manipulación en los bioensayos no fue la más adecuada.

Cuadro 8. Estimación de la CL₅₀ de los microencapsulados irradiados y del microencapsulado de Bt.

M	No.		CL ₅₀ μg/cm ²	Límites Fiduciales		CL ₉₅ μg/cm ²	Límites Fiduciales		Proporción			
	Larvas	P - σ		CL ₅₀ inf - sup	CL ₉₅ inf - sup		Xi ²	de toxicidad	MAX/MIN	MN	PE	DM
ME Bt	1057	1.42 ± 0.34	23.66	6.45 - 50.57	383.88	165.74 - 48820.40	10.91	358	44.1	2.25%	C	A
MEI 1	1921	1.30 ± 0.43	137.35	68.17 - 746.17	2 514.67	558.88 - 16 287 424.75	80.31	2081030.9	678.00	18%	A	A
MEI 2	1370	1.25 ± 0.26	71.79	44.13 - 147.71	1 488.03	458.63 - 35 706.05	24.51	1087664.8	103.58	11%	A	A
MEI 20	581	2.25 ± 0.67	67.29	30.93 - 117.01	360.24	17.42 - 9 438.43	19.60	1019585.8	86.08	16%	A	A
MEI 24	596	1.92 ± 0.75	229.36	111.60 - 141 405.6	1 651.90	408.20 - 4.03545E+12	21.85	3475147.0	141294	11%	C	A

P=pendiente de la recta de regresión

σ =desviación estándar

Xi² = ji-cuadrada

MAX/MIN= cociente de los límites fiduciales

MN= mortalidad natural del testigo

PE= punto de equilibrio de las dosis

DM= dosis media del bioensayo

A=aceptado

C= condicionado

ME Bt= Microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* con complejo espora-cristal

MEI 1,2, 20 Y 24= Microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* con complejo espora cristal irradiado 1, (254nm Luz UV-C); 2, (354nm Luz UV-B); 20, 20 min. expuesto (354nm Luz UV-B) y 24, 24 hr expuesto (Luz UV-B).

Podemos observar en la Figura 11 que los microencapsulados irradiados 1 y 24 (MEI 1, MEI 24) fueron más afectados por la exposición a radiación UV, se desconoce tiempo, dosis y forma de exposición a la radiación UV de los microencapsulados irradiados 1 y 2, únicamente conociéndose la longitud de la luz a la cual fueron sometidos (254nm y 354 nm respectivamente) por lo que se infiere que para estas muestras el proceso de irradiación fue diferente a la de las muestras de microencapsulado irradiados 20 min y 24 h (MEI 20 y MEI 24) las cuales al igual que el MEI 2 fueron irradiadas a una magnitud de 354nm, por la respuesta obtenida se ha reportado la radiación de luz UV B como de menor daño, y se sabe que la efectividad de la UV es inversamente proporcional a la distancia entre el punto de emisión de los rayos y el punto de contacto (González-Sprinberg y Rabin-Lema, 2011). Por lo cual se evidencia que aun siendo la radiación de un menor alcance, con una prolongación de tiempo de exposición el efecto de daño observado puede superar al de las ondas de mayor daño (254nm) de luz UV C.

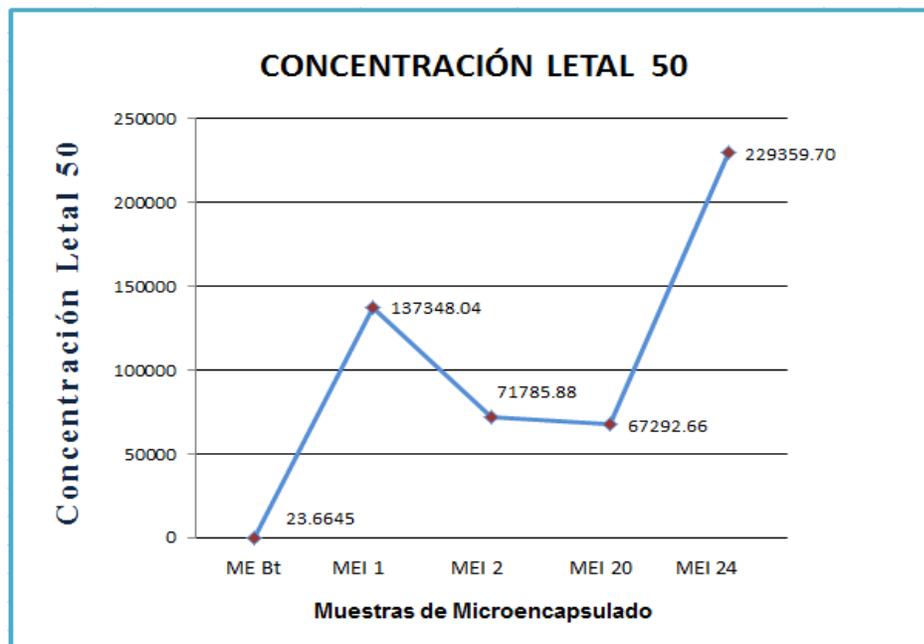


Figura 11. Efecto de la radiación UV de diferentes longitudes de onda y tiempo de exposición en los microencapsulados de alginato de Bt.

Por otra parte, la técnica de irradiación aplicada en forma inadecuada a las muestras en una etapa de formulación del complejo espóra-cristal provocó un daño severo en la toxicidad de la cepa a partir de un periodo corto de exposición (20 minutos); por lo que la exposición del encapsulado sugiere una dosis excesiva de la irradiación. Sin embargo, la toxicidad demostrada en el ME se encuentra en una menor toxicidad con respecto de la CL_{50} reportada para la cepa sin formulación, y ya que se ha comprobado la inocuidad del agente encapsulante, sólo se puede inferir que la toxicidad del cristal de *B. thuringiensis* puede deberse a un fallo en la formulación o manejo del producto. De ser así, se tienen muchas alternativas para mejorar el proceso. Esto es apenas una ventana de los alcances que se lograrían si se utiliza un agente encapsulante para los microorganismos utilizados en control biológico de insectos plaga.

CONCLUSIONES

Se corrobora que el alginato es un material inocuo y que se puede utilizar para elaborar los microencapsulados de *Bacillus thuringiensis*.

Con bioensayos cualitativos se corrobora el efecto tóxico del microencapsulado espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* que exhibió una mortalidad del 100% sobre *Manduca sexta*.

Se establece la cuantificación de los cristales proteicos tóxicos en el encapsulado con la técnica de electroforesis tipo SDS-PAGE, y se determinó que el microencapsulado utilizado en este trabajo contiene 81.4 mgmL^{-1} de cristal puro.

Con bioensayos cuantitativos se determina que la CL_{50} para el microencapsulado de *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki HD-1 en este trabajo es de $23.66 \mu\text{g/cm}^2$.

Se corrobora el efecto nocivo de los rayos ultravioleta sobre *Bacillus thuringiensis* provocando la reducción de su toxicidad hacia larvas neonatas de *Manduca sexta* en los tratamientos de microencapsulados irradiados 1 y 24.

Los tratamientos de microencapsulados irradiados 2 y 20 muestran parcial protección del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* contra la degradación por efecto de los rayos ultra violeta, por lo que pueden ser desarrollados como formulaciones.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Meza O., Ramírez-Suero M., Bernal J.S. y Ramírez-Lepe M. 2010. Field Evaluation Against *Aedes aegypti* Larvae of Aluminum-Carboxymethylcellulose-Encapsulated Spore-Toxin Complex Formulation of *Bacillus thuringiensis* Serovar israelensis. *Biol and Micro Cont.* 103: 570-576
- Alatorre-Rosas R. 2007. Hongos entomopatógenos. Ed. L.A. Rodríguez-del-Bosque y H.C. Arredondo-Bernal. *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C. México. pp. 127-143.
- Alatorre-Rosas R. 2008. Potencial de los agentes microbianos en el manejo de plagas de insectos. Taller: Teoría y práctica de las aplicaciones de insecticidas microbianos. Sociedad Mexicana de Control Biológico, A.C. Zacatecas, zac. pp. 1-11.
- Alzate O., Hemann C.F., Osorio C., Hille R., Dean D.H. 2009. Ser. 170 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin becomes anchored in a hydrophobic moiety upon insertion of this protein into *Manduca sexta* brush border membranes. *BMC Biochemistry.* 25: 1-10.
- Anaya R.S. y Romero N.J. 1999. Hortalizas, Plagas y Enfermedades. Ed. Trillas. pp. 270-271.
- André L.B., Terence C., Spencer A., Nekl E., Pusztai-Carey M., Moar W.J., Siegried D.B. 2008. Comparison and validation of methods to quantify Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* for Standardization of insect bioassays. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 74: 30-135.
- Aragón R. J. 2003. Plantas resistentes y su integración en el manejo de las plagas. Avances en el uso de maíz Bt. Adopción de área de refugio. Ed. Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez. Área Suelos y Producción Vegetal pp. 1-5.
- Barrera J. F. 2007. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. Eds L.A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal. *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. pp. 1-18.
- Bechtel D.B. y L.A. Jr. Bulla, 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127: 1472-1481.
- Becker N., Zgomba M., Ludwig M, Petric D, Retlich F., 1992. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments .*J Am Mosq Control Assoc.* 83: 285-289.

- Beegle C.C., y Yamamoto T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Cant. Ent.* 124: 587-616.
- Bregni C., Degrossi J., García R., Lamas M.C., Firestein R., D'Aquino M. 2000. Microesferas de alginato con *Bacillus subtilis* Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Ars Farmacéutica* 413: 245-248.
- Broderick N., Raffa K., y Handelsman J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS* 103: 15196–15199.
- Bucher G.E. 1981. Identificación de Bacteria found in insects. Ed. H.D. Burges. *Microbial control of pests and diseases 1970-1980*. Academic Press, London. pp. 7-33.
- Bulla L.A., Kramer K.J Jr., Cox, Jones B.L. y Goodman N. 1985. The molecular biology of the bacilli. Ed. D.A. Dubna. *Insecticidal bacilli*. Press New York. pp. 185-209.
- Carballo M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica 48: 1-4.
- Chen A.C., Veigra M.F. y Anthony B.R. 1988. Co-crystallization process. *Food Technology*. 42: 87-90.
- Couch T.L. y Ross D.A. 1980. Production and Utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 22: 1297-1304.
- Crickmore N., D.R. Zeigler, Faitelson, F. Schnepf, B. Lambert ,J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*62: 807-813.
- Delgado-Puchi N. 2005. Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Díptera: Culicidae) vector de malaria en Venezuela. *Entomotropica* 20: 213-233.
- Dethier V.G., Browne L.B. y Smith C.N. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects *J. Econ. Entomol.* 53: 134-136.
- Díaz-Mendoza M.M. 2006. Proteasas digestivas de tipo tripsina del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) Caracterización e Integración con la proteína insecticida Cry1Ab. Universidad Politécnica de Madrid Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología p. 149.
- Escriche B. y Ferré, J. 2001. Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Ed. P. Caballero y J. Ferré. Universidad Pública de Navarra, Phytoma. *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. España. pp. 88-102.

- Fast P.G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. Ed. H.D.Burges. Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980. Academic Press, London. pp. 223-248.
- Feng M.G., Pu X.P., Ying S.H. y Wang Y.G. 2004. Field trials of on oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid of control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. Crop Protect. 23: 489-496.
- Finney D. J. 1971. Probit analisis. 3rd ed. Cambridge University, Cambridge (UK) 153:261-262.
- Gallegos M.G.; Cepeda S.M. y Olayo P.R.P. 2003. Entomopatógenos. Ed. Trillas pp.1-148
- García-Gutiérrez K., Barrera C. J., Esparza-García F., Montes-Horcasitas M.C., Ibarra R. J.E., Valdez-Castro L. 2011. Microencapsulación de *Bt*-HD1 con alginato de sodio. Departamento de Bioquímica y Bioingeniería. Cinvestav Zacatenco. p. 46.
- Gill S.S., Cowles E.A. y Pietrantonio P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37: 615-636.
- Gillespie R.L., McGuire M.R. y Shasha B.S. 1994. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyralidae) J. Econ. Entomol. 87: 452-457.
- González-Sprinber, G., y Rabin-Lema, C. 2011. Para entender las radiaciones. Ed. Facultad de Ciencias. Universidad de la República de Uruguay. 90 p.
- Gould G.W. y Hurts A. 1969. The bacterial spore. Academic Press. New York pp.215-274.
- Gutierrez-Agustin A. 2008. Evaluación de la actividad tóxica de cepas atípicas de *Bacillus thuringiensis* hacia insectos de los ordenes: Lepidoptera, Díptera y Coleóptera. Tesis de licenciatura.Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” p. 31.
- Heimpel A.M. y Angus T.M. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Pathol. 1: 152-170.
- Höfte H. y Whiteley H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- Hoyle R. 1992. “Eating Biotechnology. Commentary on the environment”. Biol/technol. 10: 692.
- Ibarra J.E. 1986. Characterization of mosquitos larvicidal proteins in the parasporal body of *Bacillus thuringiensis*. Ph Tesis University of California, Riverside. pp. 128.

- Ibarra J.E. y B.A. Federici. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Ass.* 3: 187-192.
- Ibarra J.E. y Del Rincón-Castro Ma. C. 2001. Cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis*. Ed. P. Caballero y J. Ferré. Universidad Pública de Navarra, Phytoma. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. España. pp. 133-152.
- Ibarra J.E. 2007. Uso de Bacterias en el Control Biológico. Eds. L.A. Rodríguez-del-Bosque y H.C. Arredondo Bernal. Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C. México. pp. 144-159.
- Ignoffo C.M., Hostetter D.L. y Smith D.B. 1976. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. *J. Econ. Entomol.* 69: 207-210.
- Iriarte J. y Caballero P. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. Ed. P. Caballero y J. Ferré. Universidad Pública de Navarra, Phytoma. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. España. pp. 16-37.
- Khetan S.K. 2001. Bacterial Insecticides. Ed. Marcel Dekker, Inc. Microbial Pest Control. Pittsburgh, Pennsylvania. pp. 3-34.
- Knowles B.H. y Dow J.A.T.. 1993. The crystal endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 15: 469-476.
- Maciel-Rosas A.M., Juárez-Pérez V.M., Aguilar-Henonin L. y Ibarra J. E. 1994. Aislamiento y caracterización de una cepa nueva de *Bacillus thuringiensis*, esencialmente inmóvil y altamente tóxica a *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Vedalia* 1: 3-12.
- Maldonado-Blanco M.G, Galán-Wong L.J., Rodríguez-Padilla C. y Quiroz-Martínez H. 2002. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. *Journal of Mosq Cont Asoc.* 18:352-358.
- Maldonado-Blanco M.R., Martínez-Rodríguez S.A., Galán-Wong L.J. y Quiroz-Martínez H. 2007. Evaluación en Campo de Formulaciones de *Bacillus thuringiensis* Preparadas con Polímeros. *Southwestern Entomol Scient note.* 32: 181-184.
- Maldonado-Blanco M.R., Meléndez-López E.I., Galán-Wong L.J., Quiroz-Martínez H., Rodríguez-Castro A. y Elías-Santos M. 2008. Evaluación en campo de nuevos formulados de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* y polímeros naturales contra larvas de mosquitos. 47:1-8.
- Martínez F., Barbosa H. Martín L. y Vargas A. 2002. Estudio de las variables más relevantes de un proceso de microencapsulación por coacervación utilizando un

polímero derivado del ácido del ácido metacrílico. Rev. Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 31:19-28.

- McGuire M.R., Shasha B.S., Eastman C.E. y Oloum-Sadeghi H. 1996. Starch- and flour-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis* J. Econ. Entomol. 89: 863-869.
- Milner R.J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. CSIRO, Division of entomology , GPO Box 1700, Canberra, 2601 Australia ACT Agriculture, ecosystem and environment. 49: 9-13.
- Morales-Ramos L.H., McGuire M.R. y Galán-Wong L.J. 1998. Utilization of several biopolymers of granular formulations of *Bacillus thuringiensis* J. Econ. Entomol. 91: 1109-1113.
- Morales-Ramos L.H., McGuire M.R., Galán-Wong L.J. y Castro-Franco R. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomo. 25: 1 59-67.
- Mulla M. 1990. Activity, field efficacy and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes, In: Bacterial Control of Mosquitoes & Black flies. H. de Barjac and D. Suthertand Editors. Rutgers Univ. Press. pp. 134-160.
- Navon A. y Ascher K.R.S. 2000. Bioassays of entomopathogenic Microbes and Nematodes. Ed. CABI Publishing. New York. pp. 1-315.
- Pasquel A. 2010. Gomas: Una Aproximación a la Industria de Alimentos Ed. Mundo Alimentario. México. pp. 6-12.
- Praça L.B., Batista A.C., Martins E.S., Siqueira C.B., Dias D.G.S., Gomes A.C.M.M., Falcão R., Monnerat R.G. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efectivas contra insectos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39: 11-16.
- Ramos-Gutiérrez J., Ortiz J.F., Vargas-Osuna E. 2004 Susceptibilidad de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) a la delta-endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) Bol. San. Veg. Plagas. 30: 239-245.
- Rechcigl J.E. y Rechcigl. N. A. 1998. Biological and Biotechnological Control of Insects Pests. Lewis Publishers, Boca Raton pp. 37-42.
- Reyes-Ramírez A. y Ibarra J.E. 2008. Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Type Strains Applied and Environ. Microbiol. 74: 125-129.
- Rhodes D. 1993. Formulation of biological control agents. Exploitation of microorganisms. D.G. Jones Ed. Chapman and Hall. Londres. pp. 411-439.

- Rodríguez M.; De la Torre M.M. y Urquijo N.E. 1991. *Bacillus thuringiensis*: características biológicas y perspectivas de producción. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 33: 279-292.
- Rojas T. 2003. Hongos entomopatógenos: aliados del agricultor. CENIAP Mayo-Agosto 2003. Maracay, Aragua, Venezuela. ISSM: 2: 1690-411 7.
- Ronco A., Díaz B.M.C. y Pica G.Y. 2004. Conceptos generales. Ed. Gabriela Castillo. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México IMTA , pp. 17-22.
- Rosas-García, N.M. 2006. Laboratory and field test of spray-dried and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. Pest Manag Sci. 62: 855-861
- Rosas-García, N.M. y De Luna-Santillana E. J. 2006. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. Rev. Int. Contam. Ambient. 22 : 135-142.
- Rowe G.E. y Margaritis A. 1987. Bioprocess developments in the productions of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. Critical reviews in biotechnology. 6: 87-127.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual , 2nd. Edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York (USA) pp. 1659.
- Santiago-Álvarez C. y Quesada-Moraga E. 2001. Empleo de *Bacillus thuringiensis* en los sistemas agrícolas. Ed. P. Caballero y J. Ferré. Universidad Pública de Navarra, Phytoma. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. España. pp. 191-204.
- Sawicka E.M., y Couch T.L. 2002. Formulations of entomopathogens. Pesticides formulations and Application. System: Third Symposium, ASTM STP; Edited by Kaneko, T.M.; American Society for Testing and Materials; Philadelphia. pp. 5-11.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R. y Dean D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol, Microbial Biol. Revs. 62: 3 775-806.
- Sneath P.H.A. 1986. Endospore forming gram-positive rods and cocci. Ed. J.P. Butler Bergey's manual of systematic bacteriology. William y Wilkins Baltimore. pp. 1104-1207.
- Steinhaus E.A 1951. Posible use for *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar Ed. Hilgardia 20: 359-381.
- Stewart G.S.A., Johnstone K., Hagelberg E. y Ellar D.J. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of a trigger reaction. Biochem J. 1988: 101-106.

- Studdert J.P. y Kaya H.K. 1990. Water potential, temperature, and clay-coating of *Beauveria bassiana* conidia: effect on *Spodoptera exigua* pupal mortality in two soil types. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 327-336.
- Tamez-Guerra P., McGuire M.R., Medrano-Roldán H., Galán-Wong L.J., Shasha B.S. y Vega F.E. 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 1424-1430.
- Tamez-Guerra P., Castro-Franco R., Medrano-Roldán H., McGuire M.R., Galán-Wong L.J. y Luna-Olvera H.A. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera). *J. Econ. Entomol.* 91: 86-93.
- Thomas W.E. y Ellar D.J. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: Effects of insect and mammalian cells *in vivo* and *in vitro*. *J. Cell Sci.* 60: 181-197.
- Torres-Ortega J.A., Rosas-García N., Garza-Molina R., Leal-Castillo M. 2006. Diseño de una formulación insecticida biodegradable a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) Centro de Biotecnología Genómica- IPN Mexico. *Revista TuRevista Digi.U@t.* 5: 26.
- Van Driesche R.G., Hoddle M.S., Center T.D. 1996. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. USDA, US Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team. 24: 443-466.
- Vila Jato J.L. 2001. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Ed. Síntesis S.A. "Tecnología Farmacéutica" Madrid, España. Vol. 1:10 317-362.
- Wilson G.R. y Benoit T.G. 1993. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 87-69.
- West A, Burges H, White R, Wyborn C. 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *J Invertebr Pathol.* 44: 128-33.
- Yañez Fernández J, Salazar Montoya JA, Chaires Martínez L, Jiménez Hernández J, Márquez Robles M, y Ramos Ramírez E.G. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva.* 21: 313-319.
- Zhu K., Nguyen M., Strong W., Whitman-Gualiev C. 2005. Performance comparison of the Experion™ automated electrophoresis system and SDS-PAGE for protein analysis. Bio-Rad Laboratories, Inc. 6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547 EEUU. pp.1-6.