



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis*, Berliner A NIVEL DE
LABORATORIO”**

TESIS DE GRADO

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
DOCTORA EN BIOQUÍMICA FARMACIA**

MARÍA DE LOURDES CARRERA CABEZAS

RIOBAMBA – ECUADOR

2009

DEDICATORIA

A mi Dios por darme la vida

A mis padres por su apoyo incondicional

A mí querida hija por ser la motivación

Para la culminación de mis estudios

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, de manera especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por la formación académica brindada

A la Dra. Magdy Echeverría su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis

A la Ing. Rosa Castro y Dr. Francisco Portero Miembros del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo

Al personal que labora en el Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH en especial a la Dra. Marcia Pesántez y a la Tecnóloga Melba Castro por el apoyo brindado en la realización del trabajo investigativo

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Edmundo Caluña DECANO FAC. CIENCIAS	_____	_____
Dr. Luis Guevara DIRECTOR ESC. BIOQUÍMICA Y FARMACIA	_____	_____
Dra. Magdy Echeverría DIRECTORA DE TESIS	_____	_____
Dr. Francisco Portero MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Ing. Rosa Casto MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Sr. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo, María de Lourdes Carrera Cabezas, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

MARÍA DE LOURDES CARRERA CABEZAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grados Celsius
DCA	Diseño Complementario al Azar
g	Gramos
kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Luria Bertani
Log	Logaritmo
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
pH	Potencial de hidrógeno
R1	Primera Repetición
R2	Segunda Repetición
R3	Tercera Repetición
T	Tratamiento
UFC	Unidad formadora de colonia

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	PARTE TEÓRICA.....	1
1.1	Control biológico.....	1
1.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2
1.3	Origen de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
1.4	Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.5	Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
1.5.1	El cristal paraesporal.....	7
1.5.2	Factores de virulencia producidos por <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.5.3	Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.6	Clasificación taxonómica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.7	Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
1.8	Habitat de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
1.9	Aislamiento e identificación <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.10	Caracterización de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.11	Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> : Ventajas y limitaciones	16
1.12	Nutrientes que requieren los microorganismo.....	18

1.12.1	Detección y medida del crecimiento.....	19
1.12.2	Ciclo de crecimiento de poblaciones.....	20
1.12.3	Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento bacteriano.....	21
1.13	Producción industrial de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
1.14	Perspectivas de la investigación de bioinsecticidas con base en <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
1.15	Fermentación líquida.....	24
1.15.1	Fases de la fermentación.....	25
1.16	Aspectos relacionados con la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
1.17	Condiciones de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> para la formación del complejo espora-cristal	28
2.	PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1	Lugar de investigación.....	30
2.2	Materiales, Equipos y Reactivos.....	30
2.2.1	Material Biológico.....	30
2.2.2	Equipos.....	30
2.2.3	Materiales de laboratorio y otros.....	30
2.2.4	Reactivos.....	31
2.2.4.1	Medios de cultivo.....	31
2.2.4.2	Reactivos varios.....	32
2.2.4.3	Metodología.....	32
2.3.1	Fase de campo.....	32
2.3.2	Fase de laboratorio.....	33
2.4	Procedimiento.....	33
2.4.1	Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
2.4.2	Identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34

2.4.2.1	Prueba de la fermentación de la glucosa.....	34
2.4.2.2	Prueba de De Voges-Proskawer.....	34
2.4.2.3	Prueba de hidrólisis del almidón.....	35
2.4.2.4	Presencia del cristal paraesporal.....	35
2.4.3	Fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
2.4.4	Cuantificación de esporas del bioformulado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
2.4.5	Diseño Experimental.....	37
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1	Aislamiento e identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
3.1.1	Características morfológicas.....	39
3.1.2	Tinción Gram de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
3.1.3	Pruebas bioquímicas.....	41
3.2	Curva de crecimiento del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
3.2.1	Curva de crecimiento del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 1.....	43
3.2.2	Curva de crecimiento del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 2.....	44
3.2.3	Curva de crecimiento del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí medio de cultivo 1.....	45
3.2.4	Curva de crecimiento del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí medio de cultivo 2.....	46
3.3	Determinación del pH del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i>	47
3.3.1	Determinación del pH del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 1	47
3.3.2	Determinación del pH del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 2.....	48
3.3.3	Determinación del pH del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí medio de cultivo 1	49
3.3.4	Determinación del pH del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí medio de cultivo 2.....	50

3.4	Máximo crecimiento del bioformulado de <i>Bacillus thuringiensis</i> de los aislamientos de Chambo y Alausí en los dos medios de cultivo..	51
4	CONCLUSIONES.....	54
5	RECOMENDACIONES.....	56
6	RESUMEN.....	57
7	SUMMARY.....	58
8	BIBLIOGRAFÍA.....	59
9	ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Componentes de los medios de cultivo.....	35
CUADRO No. 2	Códigos y descripción de los tratamientos realizados en el aislamiento e identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
CUADRO No. 3	Códigos y descripción de los tratamientos realizados en la fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i> a nivel de matraz...	38
CUADRO No. 4	Resultados de la identificación morfológica.....	39
CUADRO No. 5	Resultados de la tinción Gram de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
CUADRO No. 6	Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	41
CUADRO No. 7	Análisis de varianza máximo crecimiento del bioformulado de <i>Bacillus thuringiensis</i> de los aislamientos de Chambo y Alausí en dos medios de cultivo	51
CUADRO No. 8	Prueba de Tukey al 5% máximo crecimiento del bioformulado de <i>Bacillus thuringiensis</i> de los aislamientos de Chambo y Alausí en dos medios de cultivo.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Diferentes cultivos y plagas que pueden ser controladas utilizando cristales producidos por <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
TABLA No. 2	Tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima.....	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Curva de crecimiento del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 1.....	43
GRÁFICO No. 2	Curva de crecimiento del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 2.....	44
GRÁFICO No. 3	Curva de crecimiento del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí medio de cultivo 1.....	45
GRÁFICO No. 4	Curva de crecimiento del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí medio de cultivo 2.....	46
GRÁFICO No. 5	Determinación del pH del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo medio de cultivo 1.....	47
GRÁFICO No. 6	Determinación del pH del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo Medio de cultivo 2.....	48
GRÁFICO No. 7	Determinación del pH del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí Medio de cultivo 1.....	49
GRÁFICO No. 8	Determinación del pH del bioformulado liquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí Medio de cultivo 2.....	50
GRÁFICO No. 9	Máximo crecimiento del bioformulado líquido de <i>Bacillus thuringiensis</i> de los aislamientos de Chambo y Alausí en dos medios de cultivo a las 40horas	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 2 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*..... 13

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Vista de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el microscopio de contraste de fase.	9
FOTOGRAFÍA No. 2	Tinción Gram de <i>Bacillus thuringiensis</i> aislado de suelos de Chambo y Alausí.....	41
FOTOGRAFÍA No. 3	Cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	41

ÍNDICE ANEXOS

ANEXO No 1	Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> del aislamiento de Chambo medio de cultivo 1.....	62
ANEXO No 2	Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> del aislamiento de Chambo en el medio de cultivo 2.....	63
ANEXO No 3	Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> del aislamiento de Alausí en el medio de Cultivo 1.....	64
ANEXO No 4	Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> del aislamiento de Alausí en el Medio de Cultivo 2.....	65
ANEXO No 5	Determinación del pH de la fermentación en matraz del aislamiento Chambo en el medio de cultivo 1.....	66
ANEXO No 6	Determinación del pH de la fermentación en matraz del aislamiento Chambo en el medio de cultivo 2.....	66
ANEXO No7	Determinación del pH de la fermentación en matraz del aislamiento Alausí en el medio de cultivo 1.....	66
ANEXO No 8	Determinación del pH de la fermentación en matraz del aislamiento Alausí en el medio de cultivo 2.....	66
ANEXO No 9	Cultivo mixto de bacterias.....	67
ANEXO No 10	Resiembras sucesivas para la obtención de cultivo puro	67
ANEXONo11	Cultivo puro de <i>Bacillus thuringiensis</i> prodedente de Chambo agar nutritivo y Luria Bertani.....	68
ANEXONo12	Cultivo puro en agar nutritivo y luria bertani de <i>Bacillus thuringiensis</i> procedente de Alausí.....	68
ANEXONo13	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> . (Fermentación de la glucosa, Voges-proskawer e hidrólisis del almidón).....	69
ANEXO No14	Fermentación a nivel de matraz de <i>Bacillus thuringiensis</i> en dos medios de cultivo	69

ANEXO No15	Medición del ph de los bioformulados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	70
ANEXO No 16	Conteo en la cámara de Neubauer <i>Bacillus thuringiensis</i>	70

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONTROL BIOLÓGICO

Control Biológico es la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales; es decir mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos. Los parásitos de las plagas, llamados también parasitoides, son insectos que viven a expensas de otro insecto (hospedero) al que devoran progresivamente hasta causarle la muerte. Durante ese tiempo completan su propio desarrollo larval. Los predadores son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas (víctimas o presas) en forma más o menos rápida succionándoles la sangre o devorándolos.

Los patógenos son microorganismos: virus, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos, que causan enfermedades entre las plagas. De los tres grupos de enemigos naturales contraladores biológicos, los patógenos tienen características muy particulares.

El control biológico se considera natural, cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre; y se le denomina artificial o aplicado cuando, de alguna manera, es afectado o manipulado por el hombre.

Los insectos normalmente contienen un gran número de bacterias. La mayoría son saprofitas y comensales; y algunas son simbióticas. Ocasionalmente se presentan bacterias patógenas que son capaces de ocasionar enfermedades especialmente en larvas.

Las larvas enfermas se vuelven lentas, dejan de aumentarse y expulsan una sustancia líquida por la boca y el ano. Al morir se vuelven oscuras y negras, blandas, con los tejidos internos transformados en una masa viscosa, contenida dentro de la piel.

Desde el punto de vista de su utilización práctica, no parecen ser muchas las bacterias que presentan cualidades convenientes. Las bacterias esporógenas, es decir aquellas que forman esporas para resistir las condiciones adversas, son las más favorables. Las bacterias noesporógenas, aunque pueden ser muy patógenos, tienen el inconveniente de ser muy susceptibles a la desecación.

Un primer caso extraordinario de utilización exitosa de las bacterias fue la introducción del *Bacillus popilliae* y *Bacillus lentimorbus* contra el escarabajo japonés *Popillia japonica* en los Estados Unidos. Estos gérmenes causan la "enfermedad lechosa" de las larvas del escarabajo. Las larvas, subterráneas, se contaminan al ingerir las bacterias con el alimento y se vuelven de color blanco lechoso, llenas de *Bacillus* esporulados. Estos bacilos esporulados pueden mantenerse infectivos por más de cinco años. Existen formulaciones comerciales de *Bacillus popilliae*: Doom, Grub Attack, Milky Spore Powder y Japidemic, que se aplican contra diversos escarábidos. Ningún patógeno ha recibido tanta atención como el *Bacillus thuringiensis* Berliner. Después de haberse perfeccionado los métodos de su cultivo y haberse desarrollado diversas razas biológicas este patógeno se ha comercializado bajo diferentes formulaciones de polvos, aspersiones y gránulos con diversos nombres comerciales (2).

1.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva con la capacidad de esporular. Es muy semejante a otras especies del género *Bacillus*, como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, pero se diferencia de ellas por la formación de un cristal proteico en el momento de la esporulación.

El cristal está compuesto por proteínas, algunas de las cuales son extremadamente tóxicas contra insectos, principalmente de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*; mientras que los mamíferos, incluido el hombre, no se ven afectados. Cabe destacar que gran parte de las plagas agrícolas y forestales son provocadas por insectos de los órdenes *Lepidoptera* y *Coleoptera*, y que la mayoría de los vectores de enfermedades humanas son del orden *Diptera*. Además, estas proteínas son biodegradables, por lo que no contaminan suelos ni aguas. Por estos motivos, esta bacteria está siendo utilizada como una alternativa ecológicamente sostenible a los insecticidas químicos para controlar plagas agrícolas, plagas forestales y vectores de enfermedades (6).

1.3 ORIGEN DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis fue aislado por primera vez en Japón por Ishiwata en 1901 como patógeno del gusano de seda, *Bombyx mori* (*Lepidoptera*, *Bombycidae*), causándole la enfermedad de sotto.

En 1911 Berliner, en Alemania, aisló la misma bacteria a partir de larvas del lepidóptero *Anagasta kuehniella* (*Lepidoptera*, *Pyralidae*), la palomilla de la harina del Mediterráneo, e hizo una descripción formal de esta bacteria: bacilo Gram positivo, que presenta un cristal paraesporal de naturaleza proteica, endospora y flagelos peritricos, en distintas fases de su ciclo de crecimiento. La denominó *Bacillus thuringiensis*, en honor a la región alemana de donde la aisló: Thuringia.

El uso de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos se inició en los años 30 contra el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera*, *Pyralidae*). El primer producto comercial salió en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporeine®; en EEUU se comercializó por primera vez en 1957, bajo el nombre de Thuricide®. Desde entonces se ha desarrollado la producción de forma masiva en varios países de todo el mundo.

En 1970 Dulmage descubrió la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* en EEUU a partir de larvas enfermas de lepidópteros. Esta serovariedad resultó ser entre 2 y 200 veces más tóxica que las variedades anteriormente utilizadas en la producción comercial de bioinsecticidas. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EEUU (EPA) la designó como estándar de potencia o unidad internacional de toxicidad. En 1977, dos entomólogos israelíes aislaron un bacilo de larvas del mosquito *Culex* sp., el cual se designó con el nombre de *Bacillus thuringiensis* serovar, *israeliensis*, y fue considerado útil en salud pública para el control de vectores de enfermedades tropicales por ser patógeno de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (*Diptera*, *Culicidae*), vector del dengue. En los años 80 fueron descritas otras cepas de *Bacillus thuringiensis* serovar. *Morrisoni* patovariedades *tenebrionis* y *san diego*, activos contra coleópteros. Las serovariedades de mayor impacto a nivel industrial han sido *kurstaki*, *israeliensis* y *morrisoni*, si bien no son las únicas. Desde el descubrimiento e identificación de *Bacillus thuringiensis*, el interés en esta bacteria ha sido cada vez mayor, tanto que a la fecha se han descrito 83 serovariedades distintas según su antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con nuevas actividades biológicas.

La mayoría de variedades estudiadas actualmente son activas contra larvas de diferentes grupos de lepidópteros, y algunas de ellas también lo son contra dípteros y coleópteros. Algunos estudios han mostrado que *Bacillus thuringiensis* también podría ser utilizado contra insectos de otros órdenes (*Hymenoptera*, *Homoptera* y *Mallophaga*), nemátodos, ácaros y protozoos. En los últimos años se han desarrollado ampliamente técnicas moleculares que han permitido manipular genes de *Bacillus thuringiensis* para desarrollar bacterias acuáticas recombinantes que forman parte de la dieta de larvas de insectos, así como para generar plantas transgénicas para conferirles resistencia a los insectos plaga (6).

1.4 IMPORTANCIA DE *Bacillus thuringiensis*

El microorganismo más utilizado como bioinsecticida y extendido comercialmente en todo el mundo es *Bacillus thuringiensis* es la bacteria entomopatógena más ampliamente utilizada como biopesticida, sola o en combinación con pesticidas químicos su importancia radica en su toxicidad contra larvas de insectos-plaga de los órdenes Lepidoptera, Coleóptera, Díptera, Himenoptera, Homoptera, Ortóptera, y contra organismos como ácaros, platelmintos y nemátodos. Incluso ha mostrado actividad sobre células cancerígenas, leucémicas y contra protozoos de importancia médica como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghei*.

Preparaciones realizadas en base a *Bacillus thuringiensis* han sido usadas como insecticidas orgánicos o bioinsecticidas desde fines de la década del 30. En la actualidad se conocen más de 100 formulaciones en el mercado mundial, aplicándose alrededor de 10.000 toneladas anualmente en el planeta, siendo Dipel la marca más utilizada (12).

Los productos de este microorganismo presentan algunas características importantes como la ausencia de toxicidad en los seres humanos en muchos de los enemigos naturales de diversas plagas, en otros vertebrados y en las plantas, así como un espectro de acción reducido, lo que indica que puede ser altamente específico para una plaga determinada. Por tanto, estos bioinsecticidas pueden ser particularmente dirigidos para combatir a una plaga de interés sin perjudicar ni dañar el medio circundante.

El éxito de estas formulaciones se ha visto reflejado en la gran variedad de productos comerciales que existen, sólo las preparaciones para aspersión comprenden aproximadamente el 2% del mercado global de insecticidas y aunque no ha sido fácil su introducción en el mundo de la agricultura la aplicación de los cultivos con formulaciones tradicionales de *Bacillus thuringiensis* está constituyendo la estrategia de elección de los agricultores orgánicos, ya que gracias a las numerosas pruebas de seguridad y del impacto sobre la salud humana y del ambiente, se utilizan con mayor certeza de su inocuidad, para una producción agrícola más sana y de mayor calidad (6).

TABLA No 1 DIFERENTES CULTIVOS Y PLAGAS QUE PUEDEN SER CONTROLADAS UTILIZANDO CRISTALES PRODUCIDOS POR *Bacillus thuringiensis*

Planta o cultivo	Plaga de insectos
Spinacia oleracea , Brassica campestris Brassica oleracea, Lactuca sativa , Solanum tuberosum	<i>Pieris brassicae, Pieris rapae</i>
Citrullus vulgaris	<i>Spodoptera exigua</i>
Nicotiana tabacum , Gossypium herbaceum	<i>Heliothis zea. Heliothis virescens</i>
Hypericum perforatum	<i>Colias lesbia</i>
Musa ssp.	<i>Oequeticus sp. Phorbetron spp Oequeticus sp</i> <i>Sibine sp Opsiphanes sp</i>

REFERENCIA: http://www.biotechnolocus.com/articulos/bt/default.htm#_INTRODUCCIÓN

1.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *Bacillus thuringiensis* es un bacilo gram-positivo, flagelado y esporulado que se caracteriza por la formación de un cuerpo paraesporal o cristal de proteína, conocido como δ -endotoxina, estos cristales se forman durante la esporulación y tienen actividad tóxica para larvas de insectos.

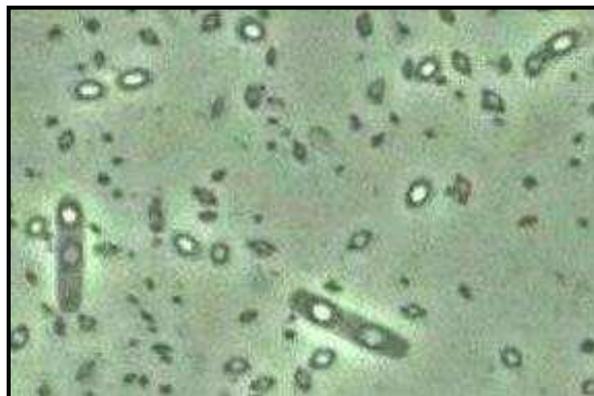
La δ -endotoxina puede variar en tamaño y en forma, ya que según la variedad de *Bacillus thuringiensis*, pueden producir en el medio de cultivo más de una forma de cristales, se menciona que se encontraron cristales de formas romboidal, de tipo amorfo y también de la clase bipiramidal. Mientras que reportan el aislamiento de cristales irregulares, cuboidales, bipiramidales y esféricos, aunque señalan que la forma más común es la bipiramidal.

Crece en gran variedad de medios no selectivos, siendo el caldo nutritivo y el Luria Bertani (LB) dos de los más utilizados. Aunque puede crecer desde los 15 hasta los 45°C, la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 26 y 30°C, pudiéndose producir pérdidas de plásmidos a temperaturas mayores de 32°C. *Bacillus thuringiensis* no es especialmente exigente en cuanto al pH de su crecimiento. Crece adecuadamente en valores de entre 5,5 y 8,5, con pH óptimo comprendido entre 6,5 y 7,5.

La morfología de las colonias de *Bacillus thuringiensis* crecidas en placa puede variar en relación con el medio de cultivo utilizado. En agar nutritivo forma colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro. El diámetro que avanza en la placa de cultivo depende directamente de la densidad de colonias que alberga. Su textura es seca y cerosa, apreciándose en colonias maduras que su círculo central posee una superficie de apariencia más brillante y lisa que el halo externo, mate, debido probablemente a la esporulación de las células centrales, más adelantadas en el ciclo (10).

1.5.1 EL CRISTAL PARAESPORAL

Simultáneamente a la formación de la spora, tiene lugar la síntesis de uno o varios cristales paraesporales de naturaleza proteica, que pueden representar entre un 20 y un 30% del peso seco del esporangio.



REFERENCIA: http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/custodio/Bt_general.html(8)

FOTOGRAFIA No 1 VISTA DE *Bacillus thuringiensis* EN EL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE.

El cristal paraesporal se ubica en el interior del esporangio, generalmente, fuera del exosporio. Sin embargo, se han descrito cristales paraesporales dentro del exosporio en algunos aislamientos, con lo que el cristal y espora continúan juntos tras la lisis celular. Al igual que la espora existen pruebas de que los cristales son inactivados por acción de la luz ultravioleta siendo además fácilmente degradados por la acción de los microorganismos del suelo. Una vez completada la esporulación, se produce la lisis de la pared del esporangio, liberándose el cristal y la espora en el medio, comenzando el ciclo de nuevo si las condiciones son favorables (10).

1.5.2 FACTORES DE VIRULENCIA PRODUCIDOS POR *Bacillus thuringiensis*

Además de las δ -endotoxinas, *Bacillus thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre estos factores de virulencia se encuentran: fosfolipasas , proteasas , quitinasas, α -exotoxinas o exotoxinas termolabiles , las δ -exotoxinas, las cuales son toxinas que funcionan como análogos de ATP y las proteínas VIP, que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento. Las proteínas VIP se han cristalizado y contienen un dominio semejante al sitio activo de proteínas con actividad de ribosilación de ADP.

Se propone que estos factores ayudan a la bacteria en la infección del insecto. Se ha reportado que en algunos casos la mezcla esporas/cristales mata mucho más eficiente que los cristales solos (1).

1.5.3 CLASIFICACIÓN DE LAS δ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. A la fecha se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes *cry* y 16 diferentes genes *cyt*. La primera clasificación de las δ -endotoxinas se basó en la especificidad de la actividad insecticida.

En esta clasificación las toxinas CryI eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros, las toxinas CryII eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, activas contra lepidópteros y dípteros, las toxinas CryIII eran proteínas activas contra insectos coleópteros; las toxinas CryIV activas contra insectos dípteros y las CryV y CryVI activas hacia nemátodos, en donde el CryVI era un grupo que no tenía homología con el grupo CryV.

Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, pero con especificidad diferente ó toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, las cuales también las llamaron CryV, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propició que se creara una nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas basadas exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de *Bacillus thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos ó cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias como *Clostridium bifermentans* (clasificadas como Cry17A, Cry18A, y Cry19A con actividad hacia mosquitos). Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de *Bacillus thuringiensis* que muestren actividad hemolítica ó tengan similitud a la secuencia de las toxinas Cyt. A la fecha las proteínas Cry estan agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos (1).

1.6 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Bacillus thuringiensis*

Reino: Eubacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

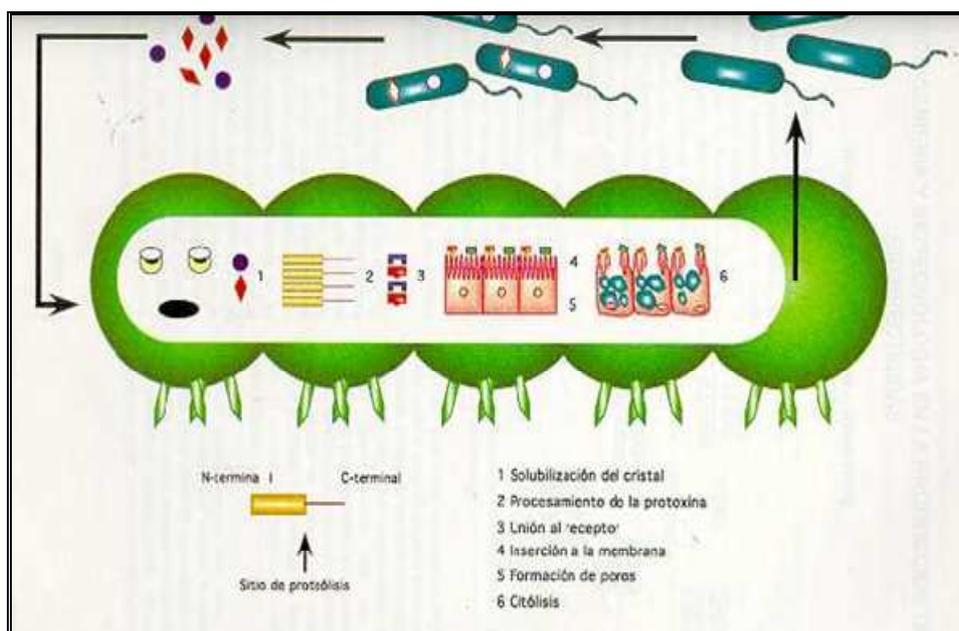
Genero: *Bacillus*

Especie: *thuringiensis*

Nombre binomina: *Bacillus thuringiensis*, Berliner 1915

1.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis tiene un ciclo de vida que comprende la formación de endosporas cuando las condiciones del medio en el que se encuentra son adversas. La endospora es una forma de resistencia frente a situaciones de estrés ambiental como la desecación o la falta de nutrientes, entre otros. Junto con la endospora también forma un cristal paraesporal constituido por δ -endotoxinas. Cuando estas protoxinas contenidas en el cristal son ingeridas por las larvas de los insectos susceptibles les causan intoxicación. Las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas y sus enzimas digestivas (principalmente tripsina y quimotripsina) disuelven los cristales y activan las protoxinas por cortes proteolíticos, convirtiéndolas en toxinas. La toxina es reconocida por receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto, se ancla a ella y forma canales iónicos, causando un desequilibrio osmótico y por tanto la lisis celular. Esto provoca en último término la muerte del insecto. Las endosporas de *Bacillus thuringiensis* se mantienen en el canal alimentario, donde, después de una disminución del pH provocada por el desequilibrio osmótico, pueden germinar. Una característica importante de estas toxinas es su alto grado de especificidad. En la relación toxina-insecto susceptible se han descrito cuatro niveles de especificidad. El primer nivel corresponde a la conducta alimentaria del insecto; éste debe ingerir junto con su alimento las endosporas y los cristales de *Bacillus thuringiensis*. El segundo nivel viene definido por el pH del intestino medio del insecto, que debe ser alcalino, pues la mayoría de los cristales paraesporales de *Bacillus thuringiensis* se solubilizan a pH alto, excepto en un caso, en el que también solubilizan a pH ácido. El tercer nivel es debido a las proteasas alcalinas del intestino del insecto; éstas han de ser las adecuadas para poder digerir parcialmente las proteínas, es decir, realizar el paso de protoxina a toxina. Por último, el cuarto nivel de especificidad corresponde a los receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto; las toxinas deben ser reconocidas por los receptores para poder anclarse a la membrana. Además de la unión al receptor, es necesaria la inserción de parte del dominio de la toxina, la agregación y la formación del canal (6).



REFERENCIA: http://www.bioteconolocus.com/articulos/bt/default.htm#_INTRODUCCIÓN

FIGURA No 1. MECANISMO DE ACCION DE *Bacillus thuringiensis*.

1.8 HABITAT DE *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis tiene la capacidad de ocupar un gran número de ecosistemas terrestres diferentes como desiertos, bosque húmedo tropical, altas montañas, playas y cuevas entre muchos otros y es habitante de muchos ambientes, se han aislado cepas de suelo, insectos, polvo y granos de productos almacenados, residuos, hojas y coníferas. En granos de almacén donde hay ausencia de la luz solar, y relativa baja humedad, se evita la actividad depredadora de microorganismos que eliminan las esporas, lo que favorece la supervivencia de la bacteria por un mayor tiempo, en contraste con la menor persistencia de las esporas de *Bacillus thuringiensis* en ambiente abierto o exterior.

Sin embargo, el suelo que es el hábitat del que con mayor frecuencia se han aislado cepas de *Bacillus thuringiensis* la población y la toxicidad declinan rápidamente. Parece ser que *Bacillus thuringiensis* no es altamente competitivo en relación a otros microorganismos, ya que al inocular esporas y cristales en suelo se ha observado que la presencia y actividad se mantiene hasta por 3 años en suelos estériles mientras que en suelos no estériles se pierde la actividad.

Una conclusión obtenida a partir de los resultados de los muestreos de suelo es que no existe relación entre las poblaciones de insectos que viven sobre un suelo y las de *Bacillus thuringiensis* albergadas en ellos.

Los primeros trabajos enfocados al estudio de la ecología de *Bacillus thuringiensis* tenían como objetivo el de analizar la distribución y abundancia de esta especie en el ambiente, principalmente en el suelo. En la década de los 80 se hicieron varios muestreos de suelos de distintas partes del mundo. En 1989 Martín y Travers publicaron un trabajo donde analizaron muestras de suelos de todos los continentes. A pesar de encontrar *Bacillus thuringiensis* en todo el mundo, concluyeron que el papel de *Bacillus thuringiensis* en el medio ambiente era un enigma. Después de este trabajo se han realizado varios estudios de búsqueda de *Bacillus thuringiensis* en suelos de diferentes países: Indonesia, Korea, Noruega, México, Colombia y España, entre otros. De todos estos trabajos se concluye que ésta es una especie cosmopolita.

Otro nicho ecológico de donde se ha aislado *Bacillus thuringiensis* lo constituyen los insectos enfermos o muertos. La toxicidad de los aislamientos obtenidos a partir de ellos no se ajusta en todos los casos a lo esperable. Se han dado casos, por ejemplo, de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* inactivos frente a la especie de la cual fueron obtenidos o que afectan a insectos de distinto orden, lo que sugiere un posible comportamiento oportunista de la bacteria.

El filoplano constituye otro habitat en el que es frecuente la presencia de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida. Los resultados obtenidos han llevado a postular que *Bacillus thuringiensis* podría ser una bacteria epífita de plantas, y que mantendría relaciones de simbiosis con ellas, aprovechando sus exudados para desarrollarse mientras ejerce un efecto repelente hacia los insectos. Además, la proporción de aislados con actividad insecticida contra lepidópteros provenientes de este medio es mucho mayor a la encontrada para aislados de suelo, lo que viene a apoyar la hipótesis de que la cubierta vegetal favorece el establecimiento de niveles ezoóticos de poblaciones de *Bacillus thuringiensis* activas frente a los insectos que la habitan.

A principios de la década de los 90, Smith y Couche (1991) publicaron el primer trabajo de búsqueda de *Bacillus thuringiensis* en hojas de árboles. Aislaron *Bacillus thuringiensis* del 50- 70% de las hojas muestreadas. Estos autores lanzaron una hipótesis en la que proponían *Bacillus thuringiensis* como comensal o simbiote de las plantas, ofreciendo protección a éstas de los insectos fitófagos. A su vez, las plantas proveerían nutrientes mediante los exudados foliares y además proveerían un nicho libre de competencia con otras bacterias esporogénicas del suelo. Smith y Couche también proponían que se debería determinar si *Bacillus thuringiensis* es metabólicamente activa en el filoplano y examinar las yemas de las plantas para evaluar si son fuentes adicionales de nuevos aislamientos de *Bacillus thuringiensis*. Los resultados de este estudio sugerían que el papel de *Bacillus thuringiensis* en el medio ambiente debía ser reconsiderado. A pesar de que se supone que las hojas de plantas son nicho ecológico, puesto que es la manera de aplicación del complejo spora-cristal y porque se reporta el aislamiento de esporas de *Bacillus thuringiensis* tanto de vegetales domésticos como silvestres, al ser las esporas *Bacillus thuringiensis* susceptibles a la radiación solar, ello debe limitar su viabilidad en la hoja (6).

1.9 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

El aislamiento y selección de nuevas cepas de la especie *Bacillus thuringiensis*, utilizada para la producción de bioplaguicidas es una práctica internacional que ha permitido aumentar las posibilidades de uso a partir de nuevas cepas con potencialidades de control sobre otros organismos que constituyen plagas.

La mayoría de los procedimientos para el aislamiento de *Bacillus* con actividad entomopatógena, incluyen un pre-tratamiento de pasteurización de las muestras destinado a la eliminación de la flora vegetativa presente en la misma sin afectar la viabilidad de la mayoría de las esporas, siendo ésta la primera etapa selectiva del proceso.

El tratamiento con calor consiste en calentar a una temperatura entre 60-65°C las suspensiones de la muestra en solución salina o en agua corriente durante 60 min.

Bacillus thuringiensis se distingue solamente por la formación de cuerpos paraesporales visibles al microscopio. Se corrobora la presencia de la especie *thuringiensis* mediante la determinación de la presencia del cuerpo paraesporal o cristal.

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa. (10)

Si es aerobio, esporulado y Gram positivo, es del género *Bacillus*, ahora, para afinar más e intentar dar con la especie, hacemos cuatro pruebas bioquímicas. La primera de ellas es la de Voges-Proskawer en la que se busca la presencia de acetoina o acetyl-metil carbonil. Con la segunda de las pruebas se trata de saber si fermenta a la glucosa produciendo ácido y gas negativo. La última de las pruebas bioquímicas consiste en investigar la producción o no de α -amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón. Nuestro Bacilo es Gram+, esporulado con espora central, elipsoidal que deforma al esporangio, V-P+, amilasa+, ácido+, gas-. Según la tabla podría ser: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus anthracis*(7).

La presencia del cristal paraesporal es la característica mas importante para la identificación de *Bacillus thuringiensis*, se determina por tinción, es decir, se prepara un frotis delgado de la solución de *Bacillus thuringiensis* sobre un vidrio portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se cubre con una solución de cristal violeta 0.5% durante 2-3 min. Se lava el exceso de colorante con agua y se deja secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se observan al microscopio óptico con 1000X de aumento (10).

1.10 CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

Los métodos que se utilizan habitualmente para la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de *Bacillus thuringiensis* son: el serotipo flagelar, la descripción morfológica del cristal paraesporal, la caracterización por métodos moleculares y los bioensayos. El antígeno flagelar ha sido usado para caracterizar *Bacillus thuringiensis* desde 1962. Los aislamientos de *Bacillus thuringiensis* son incubados con anticuerpos policlonales de cepas conocidas, los cuales reconocen los antígenos flagelares del bacilo, dándose una reacción de aglutinación específica. Actualmente se conocen 83 serovariedades. Sin embargo, existen algunos trabajos en los que se concluye que no existe una relación clara entre la clasificación por la técnica del antígeno flagelar y las clasificaciones filogenéticas elaboradas mediante marcadores moleculares. De todas formas esta técnica sigue considerándose como la única herramienta disponible para identificar las distintas serovariedades de *Bacillus thuringiensis*. El cristal paraesporal puede presentar varias morfologías: bipiramidal, ovoidal, redondo, cuadrado, triangular, entre otras. Existe una correlación bastante alta entre la forma del cristal y la actividad tóxica, por ejemplo, los cristales bipiramidales están generalmente asociados a actividad contra lepidópteros y los cristales redondos están asociados a actividad contra dípteros.

Seguramente la técnica más utilizada para caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* es la PCR usando cebadores específicos de DNA, se pueden identificar los genes que codifican las distintas proteínas que forman los cristales, y así hacer una aproximación de la toxicidad de cada aislamiento. En la actualidad están catalogadas genéticamente más de 350 proteínas cristalinas. La composición proteica del cristal puede ser analizada mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. De esta forma se separan las protoxinas según su peso molecular y, comparando con patrones de bandas de los cristales de cepas conocidas, se puede obtener información sobre la posible toxicidad de los cristales de las cepas evaluadas. Esta técnica puede ser complementada combinándola con *Western blot*, en la que los componentes separados electroforéticamente son transferidos a una membrana que se incuba con anticuerpos específicos contra secuencias de aminoácidos conocidas. Así se pueden identificar las protoxinas(6).

Otra técnica importante para estos estudios es la evaluación de la toxicidad de los aislamientos sobre distintas especies de insectos de interés agronómico y para la salud. Estos estudios se denominan bioensayos, en los cuales se alimentan a las especies de insectos a evaluar con toxinas y endosporas.

Existen dos tipos de bioensayos: los cualitativos, que evalúan la patogenicidad con altas concentraciones de la muestra, contando el número de insectos muertos, ya que sólo se pretende ver la efectividad de la muestra como insecticida; y los cuantitativos, en los que se utilizan diversas dosis de toxina para evaluar la cantidad necesaria de toxina con la que se obtiene el 50% de mortalidad del insecto estudiado (Dosis Letal 50 (DL50) y Concentración Letal 50 (CL50) (6).

1.11 USO DE *Bacillus thuringiensis*: VENTAJAS Y LIMITACIONES.

Se ha estimado que el 2% del mercado mundial de pesticidas es satisfecho con biopesticidas, en el que *Bacillus thuringiensis* domina el 95% de las ventas. Varios han sido los factores que han hecho posible su éxito en la agricultura. El más importante es su alta especificidad hacia el insecto blanco y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales. Sólo existe un ejemplo de generación de resistencia a *Bacillus thuringiensis* en campo. Esto se debe a que los tiempos de permanencia de las proteínas Cry en el ambiente son muy cortos, por lo que la presión de selección es muy baja. En este sentido, *Bacillus thuringiensis* ha sido utilizado como una alternativa compatible con el medio ambiente para el manejo de plagas agrícolas. Paradójicamente, las ventajas de *Bacillus thuringiensis* se convierten en importantes desventajas para su uso comercial. El estrecho rango de huésped ocasiona que no se cuente con toxinas para cada plaga que afecta la actividad humana.

El reducido tiempo de permanencia en el ambiente hace necesario un profundo conocimiento de la biología y comportamiento de la plaga que se quiere controlar ya que una toxina puede ser activa para los estadios larvarios, pero disminuir o incluso no ser tóxica para los adultos. Por lo tanto, los tiempos y formas de aplicación deben ser cuidadosamente seleccionados. Otra limitante ha sido la utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos barrenadores y chupadores ya que la aplicación de productos de *Bacillus thuringiensis* se ha dado tradicionalmente como productos asperjados y el hábito alimenticio de estos insectos impide la ingestión de la toxina Cry. Este problema se ha resuelto con la creación de plantas transgénicas que producen sistémicamente la toxina Cry haciéndola accesible a insectos barrenadores. Por último, existe el riesgo de desarrollo de resistencias por el incremento en el uso de *Bacillus thuringiensis*, como aspersiones de cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas Cry. Esto podría sustituir gradualmente las poblaciones sensibles por otras resistentes, con lo cual no sólo se vería reducida la efectividad del bioinsecticida, sino que se reduciría la variabilidad genética de las poblaciones de insectos. Una de las estrategias más atractivas y a la vez más controvertidas, se refiere a la transformación de las plantas de cultivo con los genes heterólogos. Esta estrategia se desarrolló como consecuencia de los avances en las técnicas de ingeniería genética de plantas. El objetivo es que la planta, una vez transformada con el gene de la toxina, exprese suficiente cantidad de ésta como para aniquilar a las plagas susceptibles que las consumen. Desde 1987 aparecieron los primeros reportes sobre plantas de tabaco y tomate que presentaban suficiente expresión de la toxina de *Bacillus thuringiensis* como para conferir niveles altos de resistencia. En la actualidad, universidades, centros de investigación y compañías privadas, llevan a cabo proyectos ambiciosos sobre el desarrollo de plantas transgénicas con capacidad insecticida. Esta la han extendido hacia una gran variedad de plantas de importancia económica. La adopción de las plantas transgénicas en la agricultura se está llevando a cabo en forma vertiginosa. Sólo en Estados Unidos, el 50% de la superficie sembrada con soya consistió de plantas transgénicas resistentes a herbicidas.

En la actualidad existen 8 cultivos importantes con cultivares transgénicos registrados: soya, maíz, algodón, canola, papa, tomate, tabaco y remolacha, y muchas otras plantas están próximas a registrarse. Las dos principales características transgénicas comercializadas hasta la fecha son la tolerancia a herbicidas y la resistencia a plagas basadas en genes de *Bacillus thuringiensis* (1).

1.12 NUTRIENTES QUE REQUIEREN LOS MICROORGANISMO

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de tiempo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales. Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en:

- Autotrofos: si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan)
- Heterotrofos si utilizan carbono orgánico.

La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente, C₄H₇O₂N lo que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno (32%), nitrógeno (14%) y debe estar disponible, normalmente, en forma de NH₄ o de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; fósforo (3%) y debe estar en forma de PO₄³⁻, azufre que representa en torno al 1% y procede de aminoácidos sulfurados o de SO₄²⁻; y otros elementos entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn.

La elaboración de medios de cultivo que permitan aislar microorganismos a fin de iniciar posteriores cultivos puros requiere proporcionar los nutrientes antes citados y, en ciertos casos, algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.). Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o bien sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos. En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser:

- Selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros
- Diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos
- Selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey para identificar *Escherichia coli*),
- Medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño (11).

1.12.1 DETECCIÓN Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos; los principales son: recuento directo, medida de la masa de las células, recuento de viables, medida del número de partículas, medida de parámetros bioquímicos y medida de la actividad metabólica.

- Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10^5 por mL.
- Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella.
- Recuento de viables: consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 UFC.

- En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de 0.2 μm de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.
- Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.
- Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen.
- Medida de actividad metabólica de las bacterias como que respiran producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno (utilización de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno)(11).

1.12.2 CICLO DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

- Fase adaptación: Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- Fase exponencial o logarítmica: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.
- Fase estacionaria: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.
- Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos (11).

1.12.3 FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO.

- **Temperatura:** Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima.

TABLA Nº 2 TIPOS DE MICROORGANISMOS EN FUNCIÓN DE SUS TEMPERATURAS DE CRECIMIENTO MÍNIMA, MÁXIMA Y ÓPTIMA

Tipo de microorganismo	Temperatura Mínima	Temperatura Óptima	Temperatura Máxima
Mesófilo	5 – 15	30 – 45	35 – 47
Psicrófilo	-5 + 5	12 – 15	15 – 20
Psicrótrofo	-5 + 5	25 – 30	30 – 35
Termófilo	40 – 45	55 – 75	60 – 90

REFERENCIA: <http://www.monografias.com/trabajos27/crecimiento-bacteriano>

- **Actividad de agua:** El agua es un sustrato en muchas reacciones bioquímicas (proteasas y lipasas, por ejemplo). Cuando no hay agua disponible, estas reacciones se detienen y el metabolismo se para. Esta falta de agua también detiene muchas de las enzimas que podrían degradar las estructuras biológicas. Por ello, las células que no crecen por falta de agua no mueren rápidamente: los sistemas de degradación tampoco funcionan y no las degradan. Es decir: cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo.
- **pH:** Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0. La disminución del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la disminución del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos.
- **Potencial redox:** hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento. En general, cuando un microorganismo requiere un ambiente oxidante se dice que desarrolla un metabolismo oxidativo (o respirativo) mientras que los microorganismos que requieren ambientes reductores (o menos oxidantes) realizan un metabolismo fermentativo. Un microorganismo es aerobio cuando necesita oxígeno para vivir y es anaerobio cuando no lo necesita (anaerobios facultativos como las bacterias entéricas, o como *Saccharomyces cerevisiae*; o anaerobios aerotolerantes como las bacterias lácticas) o cuando muere en presencia de oxígeno (11).

1.13 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE *Bacillus thuringiensis*

Uno de los aspectos más importantes del insecticida, es su producción masiva a base de *Bacillus thuringiensis*, con alto grado de toxicidad para insectos plaga, agrícola y urbano, se diseñan medios de cultivo con diferentes composición, con dos clases de bioinsecticidas los generados a partir de cepas de colección y aislados regionales, no patentados. El proceso de producción se inicia con la preparación del inóculo, que se propaga en un medio de cultivo de bajo costo, la selección de la producción artificial, asegura cristales tóxicos, por ello el medio de fermentación considera la fuente de carbono, al igual que concentración de proteínas, factores de enriquecimiento y minerales que incrementen el grado de toxicidad contra el insecto blanco, además se usan fuentes de nutrientes accesibles y baratos, que reduzcan costos de producción; de los medios de cultivo conocidos los más satisfactorios para su producción señalan aquellos a base de: melaza, derivados subproductos de pescados, liquido remojo de maíz. Un parámetro en la producción es el conteo de cristales de esporas, el consumo de azúcares reductores, el cambio de pH y la recuperación del complejo espora-cristal, por el método de coprecipitación con la lactosa y acetona(6).

1.14 PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN DE BIOINSECTICIDAS CON BASE EN *Bacillus thuringiensis*

- Incrementar la toxicidad de las cepas conocidas de *Bacillus thuringiensis* por selección de plásmidos que contienen los genes que codifican para la síntesis de delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*.
- Ampliación de la diversidad de los hospederos, elaboración de productos con actividad inespecífica es decir, contra dos o más grupos de insectos

- Optimización de la fermentación o producción de *Bacillus thuringiensis* con aislados o cepas receptoras de genes que codifican para la proteína tóxica en una de las especies más prometedoras es *Bacillus subtilis*, ya que forma esporas en un mínimo de tiempo, lo que acorta el período de la fermentación con el ahorro de insumos con un aumento importante en la producción de esporas y cristales.
- Plantas transgénicas, implica la transferencia de los genes de *Bacillus thuringiensis* que codifican para la síntesis del cristal al genoma de plantas, para una autoprotección contra el ataque de insectos plaga, observado ya en tabaco, *Bacillus thuringiensis* desde entonces otras se modificaron como: el algodón y el tomate, aunque los riesgos ambientales son aun desconocidos por la falta de información de transgénicos en la naturaleza que llevara largo tiempo definir como medidas ambientalmente seguras en el control de mosquitos. Los inconvenientes de estas plantas es lograr niveles tóxicos del cristal de *Bacillus thuringiensis* suficiente, aunque existe el riesgo del desarrollo de resistencia de los insectos plaga a la delta-endotoxina por la presión continua de selección factor clave para su aparición, su potencialidad esta en el manejo integrado de plagas agrícolas, urbanas y/o forestales (6).

1.15 FERMENTACIÓN LÍQUIDA

La fermentación líquida o sumergida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones físico-químicas controladas, este es el método más usado en la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como la temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación sumergida se realiza principalmente usando tres métodos de alimentación de sustrato, fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y fermentación en cultivo continuo.

1.15.1 FASES DE UNA FERMENTACIÓN

- Fase inactividad

Fase de inactividad de duración variable ya que depende del número de células así como de las características metabólicas de las mismas. Grandes fases inactividad indican la presencia de sustancias tóxicas, muerte de células o inactividad de éstas.

- Fase temporal de aceleración

No ha sido definida matemáticamente pero en ellas las proporciones de las células hijas tienden a alcanzar el 50% de la población total.

- Fase de crecimiento exponencial

Allí crecen los microorganismos rápidamente y el crecimiento de la población depende del sustrato inicialmente colocado.

- Fase estacionaria

Aquí ya se ha alcanzado el máximo valor de producción, en esta fase algunas células se dividen y otras mueren donde las células vivas utilizan los compuestos provenientes de las muertas como nutriente, manteniendo la población constante durante la fase.

- Fase de muerte

Dado que la población celular presente no se mantiene por sí misma comienza a morir. Tiene un comportamiento exponencial (5).

1.16 ASPECTOS RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

La selección de un aislado silvestre de *Bacillus thuringiensis* y su capacidad efectiva para producir cristales tóxicos y posible manipulación genética para mejorarla, al igual que sus requerimientos nutricionales, son aspectos fundamentales en la producción del bioinsecticida a base de esta bacteria; una etapa clave en el proceso de escalonamiento masivo para la producción de la delta-endotoxina, y su posterior formulación y aplicación a nivel de campo . Por lo que es necesario un diseño adecuado de un medio de cultivo (o de fermentación) apto para el crecimiento, esporulación y formación de los cristales de *Bacillus thuringiensis*, pues de ello depende la calidad tóxica del cristal; en ese sentido el medio de fermentación debe contener una fuente de carbono, de nitrógeno orgánico y sales minerales que en balance estimulen el crecimiento, la esporulación y la producción de cristales altamente tóxicos. En términos del tipo de constituyentes, la fuente de carbono (C) orgánica más empleadas son: la glucosa, el almidón y sacarosa, reconocidas como esenciales para la síntesis de cristales, aunque , al utilizar como fuente de C materias primas baratas, como productos de maíz hidrolizado (almidón y dextrinas), al igual que el jugo de agave y melaza de caña (fructosa), excelentes resultados sobre la esporulación y calidad tóxica del cristal. Cabe mencionar que la melaza de caña se considera una materia prima adecuada como fuente de carbono, de bajo costo con efectos positivos sobre la toxicidad de la delta-endotoxina. Es claro que la ausencia de una fuente adecuada de carbono para *Bacillus thuringiensis*, causa una disminución en la producción de esporas y en la formación y calidad de la deltaendotoxina. En el caso de fuentes de Nitrógeno, se ha reportado que *Bacillus thuringiensis* requiere de aminoácidos esenciales y otras formas orgánicas de nitrógeno durante su fase de crecimiento y durante la esporulación , en general en los medios de cultivo comerciales se han empleado proteínas de semilla y/o agua de cocimiento de maíz, otras alternativas más baratas han sido obtenidas de fuentes naturales como la harina de pescado, de la semilla de algodón, o de leguminosas como la soya, el garbanzo, la haba, el cacahuete y las lentejas, o bien de líquido de remojo de maíz; de residuos de levadura, de sangre de res, del suero de queso y productos secundarios de la industria láctea, esta clase de materia prima estimula la biosíntesis de la delta-endotoxina con alta actividad insecticida.

Para los minerales se ha señalado al Mn, K, Ca y Zn como elementos componentes necesarios en el medio de fermentación para la producción de la delta-endotoxina. Dulmage (1970), reportó el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* que en un medio que contiene dextrosa, extracto de levadura K_2HPO_4 y KH_2PO_4 presentó los mejores niveles en la producción de la delta-endotoxina y recomendó el uso de sustratos baratos como harina de semilla de algodón y harina de soya. Goldberg (1980) describió un medio de fermentación con glucosa, peptona de soya, extracto de levadura y líquido de remojo de maíz y sales minerales del tipo: KCl, $(NH_4)_2SO_4$, H_3PO_4 , $MgSO_4$, $CuCl_2$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ y $MnSO_4$, con el que logró un alto rendimiento en la esporulación y cristales tóxicos de excelente calidad. Por lo anterior, los medios de cultivo para *Bacillus thuringiensis* deben contener sales minerales para la síntesis de energía, estimular el crecimiento y la esporulación, y factores de crecimiento como: extracto de levadura (como una fuente de vitaminas del complejo B), pues su omisión retarda la esporulación y reduce la formación de cristales y en consecuencia la toxicidad del complejo espora/cristal. Goldberg, en 1980, observó un claro incremento en la producción de esporas al adicionar extracto de levadura a un medio de cultivo enriquecido (mencionado anteriormente). Para *Bacillus thuringiensis*, la combinación de factores nutricionales orgánicos e inorgánicos es esencial en la síntesis de la delta-endotoxina de alta toxicidad, así que el uso de materiales de bajo costo como componentes del medio de cultivo, es básico en la optimización del proceso de producción bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. En consecuencia para el diseño de medios de cultivo o fermentación sugiere 1) que sus componentes sean fáciles de manejar o que no requieran pretratamiento; 2) que permitan optimizar el crecimiento de la bacteria sin afectar negativamente la calidad de la delta-endotoxina; 3) que sean baratos, abundantes y sean de fácil adquisición en la localidad (12).

1.17 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* PARA LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL

Es importante señalar que una fórmula basada en la combinación de nutrientes para una variedad de *Bacillus thuringiensis*, no necesariamente es adecuada para otra variedad, por lo que la calidad de la delta-endotoxina depende tanto del medio de cultivo como del aislado de *Bacillus thuringiensis* utilizado. Aunque obviamente, el diseño del medio y la bacteria no son los únicos aspectos involucrados en la producción del bioinsecticida, existen otras variables que deben considerarse en el proceso de la fermentación como: la temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* oscila entre los 28 y 32°C. Durante el proceso de producción de *Bacillus thuringiensis* es importante considerar el suministro de oxígeno porque esta bacteria requiere un elevado nivel de este gas, en especial durante la fase de crecimiento exponencial. Esta demanda disminuye durante la esporogénesis y en la etapa de lisis del esporangio y liberación de la delta endotoxina. Esto permite disminuir el suministro de aire en la etapa final de la producción, lo que representa una economía en el proceso. Cuando se eleva el suministro de oxígeno y dado que se utilizan medios de cultivo ricos en proteínas, existe el riesgo de que se produzca un exceso de espuma; por lo cual es necesario, en ocasiones, adicionar antiespumantes. Esto debe hacerse con cuidado y el antiespumante seleccionado no debe afectar el desarrollo de la bacteria. Además un exceso de este producto puede crear una anaerobiosis parcial con detrimento de la calidad del proceso. También puede ocasionar problemas durante el recobrado y la formulación. La velocidad de agitación para asegurar un suministro de oxígeno adecuado en el medio de cultivo y evitar la acumulación del calor y evitar la inhibición o reducción de la calidad tóxica de los cristales. En la fermentación, la aireación tiene dos finalidades, suministrar oxígeno y extraer el calor producido. Diversos estudios efectuados indican que la cantidad de oxígeno consumida durante la fermentación depende de la temperatura y del tamaño de las partículas con que se realiza el proceso. Así el valor de pH es un parámetro importante y aunque generalmente se deja libre durante el proceso, es necesario ajustar los medios de cultivo para que no sea menor a 5,0. En general, el pH inicial debe ser de 6,8-7,2 pero baja después de las primeras 8-12 horas, hasta llegar a 5,0.

Posteriormente se incrementa lentamente y al final el proceso tiene un valor aproximado de 8,0. Esta cinética es un buen indicador del proceso (12).

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Dos Aislamientos de *Bacillus thuringiensis* obtenidas de muestras de suelo de Chambo y Alausí

2.2.2 EQUIPOS

- Estufa
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Balanza de precisión
- Autoclave
- Peachímetro
- Microscopio

- Cámara fotográfica

2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO Y OTROS

- Cámara de Neubauer BOECO
- Cajas petri de vidrio
- Erlenmeyer de 250 y 1000mL
- Pipetas de 1mL
- Tubos de ensayo
- Placas porta y cubre objetos
- Probeta de 250mL.
- Mechero
- Espátula
- Agujas de transferencia
- Algodón
- Guantes estériles
- Maskin
- Marcador permanente
- Mascarillas

2.2.4 REACTIVOS

2.2.4.1 MEDIO DE CULTIVO

- Agar Nutritivo
- Agar Luria Bertani
- Medio glucosado
- Medio de Clark y Lubs
- Agar de Almidón

2.2.4.2 REACTIVOS VARIOS

- KH_2PO_4
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Bacto-triptona
- Glucosa
- KOH
- H_3PO_4
- CaCO_3
- NaOH
- Cristal violeta
- Lugol
- Safranina
- Alcohol-acetona

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 FASE DE CAMPO

Se realizó la recolección de las dos muestras de suelo de Chambo y Alausí de cultivos orgánicos en los que no se aplican agroquímicos de alta toxicidad, se colocaron en fundas plásticas debidamente etiquetadas y fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH para realizar el aislamiento purificación e identificación de *Bacillus thuringiensis*

2.3.2 FASE DE LABORATORIO

- Aislamiento y purificación de *Bacillus thuringiensis*
- Identificación de *Bacillus thuringiensis*
- Fermentación a nivel de matraz de los dos aislamientos de *Bacillus thuringiensis* en dos medios de cultivo
- Cuantificación de esporas mediante la cámara de Neubauer del bioformulado de *Bacillus thuringiensis*
- Determinación del pH de los bioformulados de *Bacillus thuringiensis*

2.4 PROCEDIMIENTO

2.4.1 AISLAMIENTO DE *Bacillus thuringiensis*

La procedencia de las muestras de suelo de las que se aisló *Bacillus thuringiensis* fueron las siguientes:

Muestra 1	Muestra 2
Provincia: Chimborazo	Provincia: Chimborazo
Cantón: Chambo	Cantón: Alausí
Predio: El Huayco	Parroquia: Matríz
Propietario: Sr. Ángel Gavilanes	Comunidad: Nizag

El procesamiento de estas muestras se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó 1g de suelo se mezcló con 10 mL de agua destilada estéril y se pasteurizó en baño María a 65°C por 30 min.
- Se dejó en hielo por 30 min y de éstos sólo 10 mL se aforaron con agua destilada estéril a un volumen final de 200 mL.

- De esta suspensión se depositó 0,5 mL en cajas petri que contenían Agar Luria Bertani (10 g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl en 1L) y Agar nutritivo respectivamente y se dejó crecer en una estufa a 28°C.
- Se aislaron colonias separadas de distinta morfología y se purificaron por resiembras sucesivas.

2.4.2 IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

Los aislamientos de *Bacillus thuringiensis* se reactivaron en cajas petri con agar nutritivo y Luria Bertani se incubaron a 28 °C, se observó su morfología (forma, borde, perfil, color) y se realizó la tinción de Gram.

Se realizaron cuatro pruebas bioquímicas que son características para *Bacillus*.

2.4.2.1 Prueba de fermentación de la glucosa.

Se preparó un medio líquido glucosado que tiene un indicador de pH (púrpura de bromocresol), en tubos de ensayo en pico de flauta y con una asa se sembró el *Bacillus*, se colocó en la estufa por 24 horas, se observó el cambio de coloración de el medio de color violeta a amarilllo tomándose este resultado como positivo. En el mismo tubo se introduce una campana de Durham en posición invertida, que dependiendo de que aparezca una burbuja o no, nos va a indicar si es gas positivo o gas negativo.

2.4.2.2 Prueba De Voges-Proskawer.

En la que se busca la presencia de acetoína o acetyl-metil carbonil. Sembramos en un tubo con medio de Clark y Lubs. Tras la incubación 24-48h a 28°C añadimos dos reactivos: α -naftol en solución alcohólica (etanol) al 6% y una solución de KOH al 40%. Este último reactivo oxida a la acetoína formando diacetilo que se une a un residuo de guanidina del medio en que se hace la prueba, en presencia del α -naftol. La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

2.4.2.3 Prueba de la hidrólisis del almidón.

La última de las pruebas bioquímicas consistió en investigar la producción o no de α -amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón. Para realizar esta prueba sembramos previamente, por 48 horas a 28°C en Agar de Almidón una estría de *Bacillus thuringiensis*. Luego colocamos 2 a 3 gotas de lugol. La reacción positiva se determinó por el área clara alrededor del cultivo

2.4.2.4 Presencia del cristal paraesporal.

También se determinó por tinción, es decir, se preparó un frotis delgado de *Bacillus thuringiensis* sobre un vidrio portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se cubrió con una solución de cristal violeta 0.5% durante 3 min. Se lavó el exceso de colorante con agua y se dejó secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se observaron al microscopio óptico con 1000X de aumento.

2.4.3 FERMENTACIÓN DE *Bacillus. thuringiensis*

Los medios de cultivo para la fermentación se prepararon con los siguientes reactivos.

CUADRO No1. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO 1	MEDIO DE CULTIVO 2
KH ₂ PO ₄ 3.4g	KH ₂ PO ₄ 1.25g
MgSO ₄ .7 H ₂ O 0.06g	CaCO ₃ 0.5g
ZnSO ₄ .7H ₂ O 0.07g	MgSO ₄ .7 H ₂ O 0.000055g
MnSO ₄ .H ₂ O 0.008g	MnSO ₄ .H ₂ O 0.02g
FeSO ₄ . 7H ₂ O 0.014g	FeSO ₄ . 7H ₂ O 0.014g
CaCl ₂ . 4H ₂ O 0.055g	CaCl ₂ . 4H ₂ O 0.015g
Bacto-triptona 3.5g	Harina de soya 3.0g
Glucosa 1.5g	Glucosa 2.5g
500mL de H ₂ O destilada	Pure de tomate 20g
	500mL de H ₂ O destilada

Se ajustó el pH con KOH 3N a un pH de 7.2 para el medio 1, para el medio 2 se utilizó NaOH 1N y se llevó a un pH de 7 y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Se estandarizó el inóculo para lo cual se realizó una suspensión densa de *Bacillus thuringiensis* con agua destilada estéril, a partir de un desarrollo de la bacteria en placas petri conteniendo Agar Luria Bertani. De esta suspensión se hicieron diluciones hasta obtener una concentración de aproximadamente 10^6 esp/ml. Con una pipeta estéril se inoculó 5mL de la suspensión de *Bacillus thuringiensis* en un matraz erlenmeyer de 1000 ml con 500 ml de medio de cultivo 1 y 2. Se llevaron a cabo fermentaciones bajo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura a 27 ° C, agitación 200 RPM y pH de 7-7.2. Se tomaron muestras cada 8 horas y se procedió al conteo de esporas con la cámara de Neubauer. Se realizó la medición del pH cada 24 horas.

2.4.4 CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS DEL BIOFORMULADO DE *Bacillus thuringiensis*

Para la determinación del número de esporas por mL del bioformulado de *Bacillus thuringiensis* se preparó diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2}) con el fin de facilitar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer. La primera dilución (10^{-1}) se obtuvo transfiriendo con una pipeta estéril 1mL del bioformulado a un tubo de ensayo con 9mL de agua estéril, se agitó fuertemente durante 1min obteniéndose la primera dilución, de la dilución 10^{-1} se tomó 1 mL y se colocó en 9 mL de agua estéril obteniéndose la dilución 10^{-2} .

Se tomó el tubo de la dilución 10^{-2} , en el cual se colocó 3 gotas de cristal violeta y se agitó enérgicamente durante 30 segundos y se dejó reposar 3 minutos, se volvió a agitar e inmediatamente se tomó la muestra de (1 μ L) con la pipeta para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio minuto antes de proceder al conteo. El mismo que se realizó por triplicado. Luego se llevó la cámara al microscopio y se procedió al conteo con el objetivo de 40x. Cada 8 horas se realizó el conteo de las esporas del bioformulado.

La concentración de esporas por mL de bioformulado se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara

Número de esporas / mL = Suma de 5CS x factor de dilución x 50.000

2.4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño Completo al Azar (DCA), con 4 tratamientos 3 repeticiones para el aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* y para la fermentación de *Bacillus thuringiensis* a nivel de matraz

CUADRO No2 CÓDIGOS Y DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES ESPOCH. 2009

Tratamiento	Código	Descripción
T1	BtACHAN	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo en agar nutritivo
T2	BtACHLB	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo En Luria Bertani
T3	BtAAAN	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí en agar nutritivo
T4	BtAALB	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí En Luria Bertani

CUADRO N° 3 CÓDIGOS Y DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS EN LA FERMENTACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* A NIVEL DE MATRAZ. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES ESPOCH. 2009

N° de Tratamiento	Código	Descripción
T1	FBtACHM1	Fermentación <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo En medio de cultivo 1.
T2	FBtACHM2	Fermentación <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo. En medio de cultivo 2.
T3	FBtAAM1	Fermentación <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí En medio de cultivo 1.
T4	FBtAAM2	Fermentación <i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí. En medio de cultivo 2.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

A las 48 horas de realizada la instalación de la prueba de aislamiento se tiene el crecimiento de cultivo mixto de bacterias en agar nutritivo y Luria Bertani. Mediante siembras sucesivas por estriado simple se obtiene cultivo puro de cada uno de los dos aislamientos. Las características morfológicas externas de las colonias de *Bacillus thuringiensis* aislados de suelos de Chambo y Alausí obtenidas en la presente investigación utilizando agar nutritivo y agar Luria Bertani, determina que tienen forma circular, color marfil claro en agar nutritivo y crema en agar Luria Bertani, de textura cerosa, borde irregular y perfil plano características similares al reportado por Escobar, (1992) y Lara, (2008) (3)(9).

CUADRO No.4 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *Bacillus thuringiensis*. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ABRIL 2009

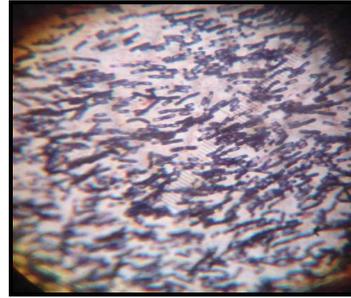
MORFOLOGÍA	Bt Chambo Agar nutritivo	Bt Chambo Luria Bertani	Bt Alausí Agar nutritivo	Bt Alausí Luria Bertani
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Color	Marfil claro	Crema	Marfil claro	Crema
Textura	Cerosa	Cerosa	Cerosa	Cerosa
Borde	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular
Perfil	Plano	Plano	Plano	Plano

3.1.2 TINCIÓN GRAM DE *Bacillus thuringiensis*

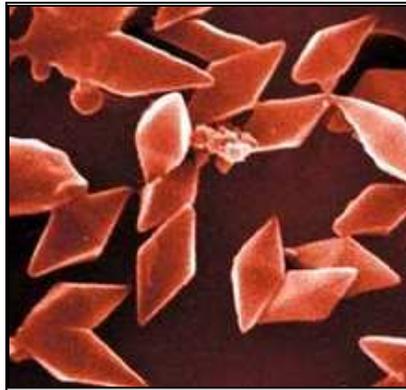
Bacillus thuringiensis es Gram positivo, y al microscopio se observó el cristal de forma romboide, con esto se reafirma lo expuesto por Escobar, (1992) que señala “ La bacteria *Bacillus thuringiensis* es un bacilo flagelado, esporulado y Gram positivo que produce, durante la esporulación, un cristal de proteína tóxico para los insectos, conocido también como delta endotoxina.” Así como lo reportado por Sauka y Benintende, (2008) es un bacilo Gram positivo que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos. Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes. Y Lara, (2008) *Bacillus thuringiensis* es un bacilo Gram positivo (3)(13)(9).

CUADRO No 5. RESULTADOS DE LA TINCIÓN GRAM DE *Bacillus thuringiensis*. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ABRIL 2009

TRATAMIENTOS	TINCIÓN GRAM
<i>Bacillus thuringiensis</i> Chambo Agar nutritivo	Bacilo Gram positivo
<i>Bacillus thuringiensis</i> Chambo Luria Bertani	Bacilo Gram positivo
<i>Bacillus thuringiensis</i> Alausí Agar nutritivo	Bacilo Gram positivo
<i>Bacillus thuringiensis</i> Alausí Luria Bertani	Bacilo Gram positivo



FOTOGRAFÍA No 2. TINCIÓN GRAM DE *Bacillus thuringiensis*. AISLADO DE SUELOS DE CHAMBO Y ALAUSÍ. MICROSCOPIO ÓPTICO CON 400X DE AUMENTO DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ABRIL 2009



FOTOGRAFÍA No 3. CRISTALES DE *Bacillus thuringiensis*. MICROSCOPIO ÓPTICO CON 1000X DE AUMENTO DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ABRIL 2009

3.1.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La prueba bioquímica de fermentación de la glucosa fue positiva y se comprobó por el cambio de color del medio que inicialmente fue violeta y luego cambio a amarillo por la producción del ácido, fue gas negativo debido a la ausencia de burbuja. La prueba de Voges-Proskauer es positiva porque presento un color rojo-fucsia que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoina.

La última de las pruebas bioquímicas consistió en investigar la producción de α -amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón. Al colocar lugol sobre toda la superficie de la placa, no se tiñeron las colonias ni sus inmediaciones ya que es amilasa positiva, es decir, nuestro bacilo produce α -amilasa que ha hidrolizado el almidón. Se comprueba lo expresado en la página de internet <http://html.rincondelvago.com/identificacion-de-un-microorganismo.html>. Nuestro Bacilo es Gram+, esporulado, Voges-Proskawer +, amilasa+, ácido+, gas-. Según la tabla podría ser: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillu. mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus anthracis*. Se confirma que es *Bacillus thuringiensis* por la observación al microscopio del cristal característico de la bacteria (7).

CUADRONo.6 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ABRIL 2009

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Chambo	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislamiento Alausí
Fermentación de glucosa	(+)	(+)
Gas CO ₂	(-)	(-)
Voges-Proskawer	(+)	(+)
Hidrólisis del almidón	(+)	(+)

3.2 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis*

Para la determinación de la curva de crecimiento del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* se realizó el conteo del número de esporas mediante la cámara de Neubauer cada 8 horas Anexo 1, 2 ,3 ,4

3.2.1 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 1

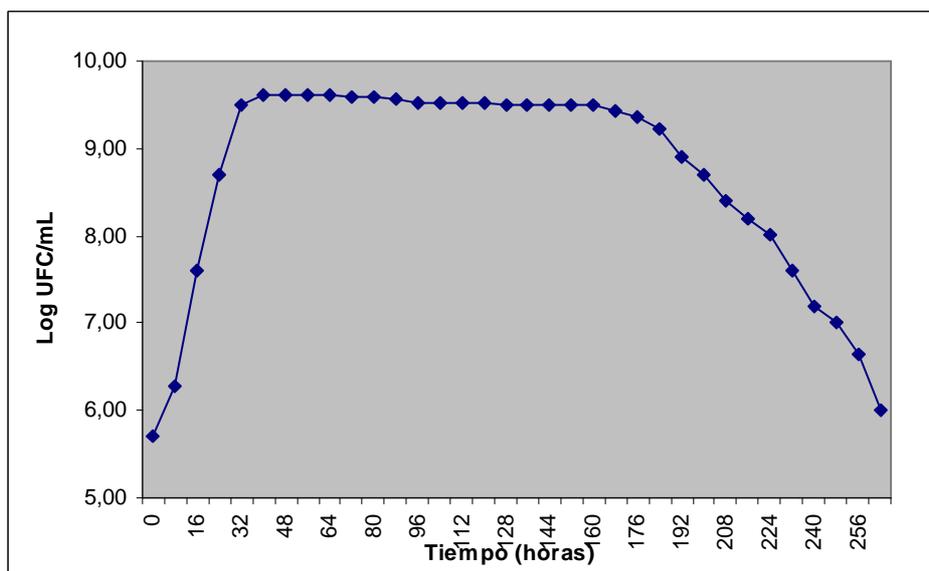


GRÁFICO No. 1 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 1. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La curva de crecimiento del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Chambo en el medio de cultivo 1 presenta la fase de crecimiento hasta las 40 horas con una población de 4.1×10^9 UFC/mL de bioformulado seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta las 160 horas en la cual la concentración permanece constante con un valor de 3.16×10^9 UFC/mL de bioformulado, y una población final en la fase de muerte, de 1×10^6 UFC/mL de bioformulado a las 264 horas

3.2.2 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis*. AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 2

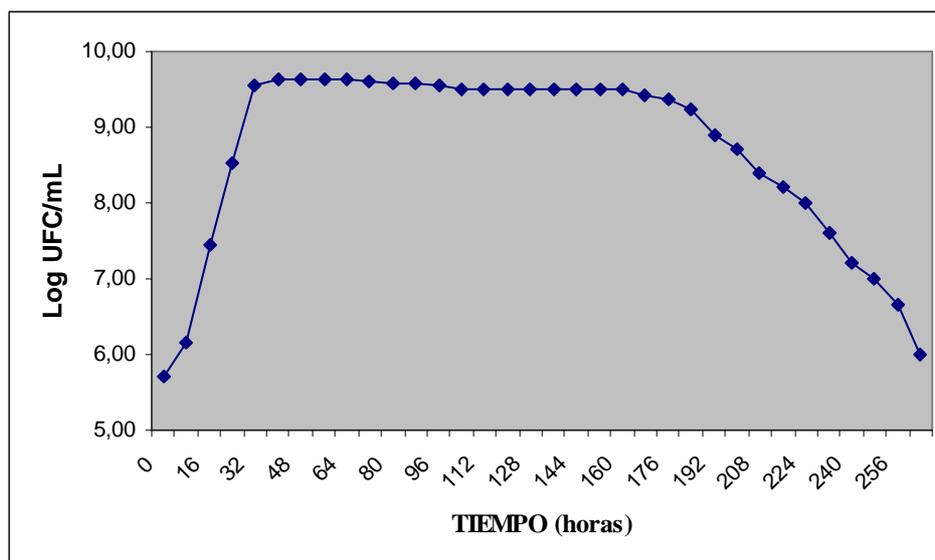


GRÁFICO No. 2 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 2. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La curva de crecimiento del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Chambo en el medio de cultivo 2 presenta la fase de crecimiento hasta las 40 horas con una población de 4.3×10^9 UFC/mL de bioformulado seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta las 160 horas en la cual la concentración permanece constante con un valor de 3.2×10^9 UFC/mL de bioformulado, y una población final en la fase de muerte, de 1×10^6 UFC/mL de bioformulado a las 264 horas

3.2.3 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 1

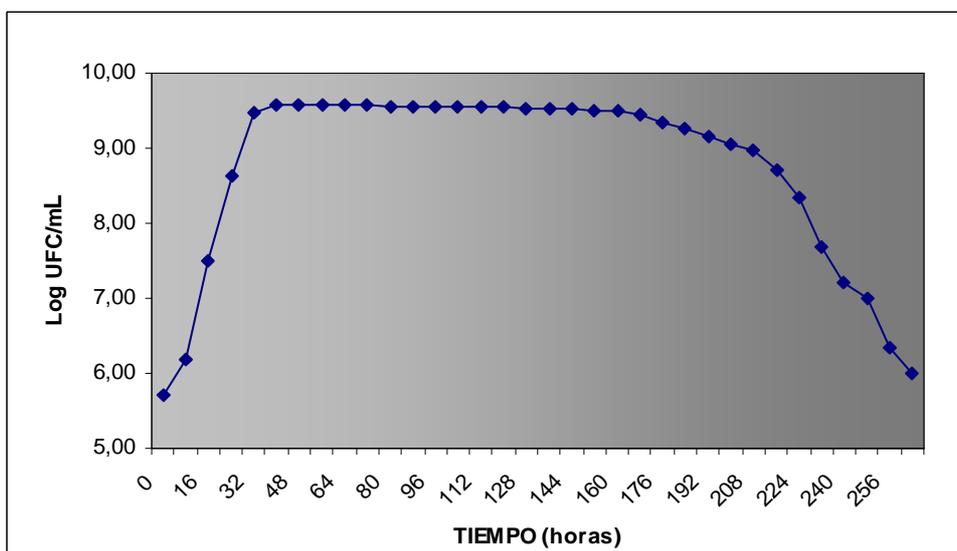


GRÁFICO No. 3 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 1. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La curva de crecimiento del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Alausí en el medio de cultivo 1 presenta la fase de crecimiento hasta las 40 horas con una población de $3,8 \times 10^9$ UFC/mL de bioformulado seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta las 160 horas en la cual la concentración permanece constante, con un valor de $2,88 \times 10^9$ UFC/mL de bioformulado, y una población final en la fase de muerte, de 1×10^6 UFC/mL de bioformulado a las 264 horas

3.2.4 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 2

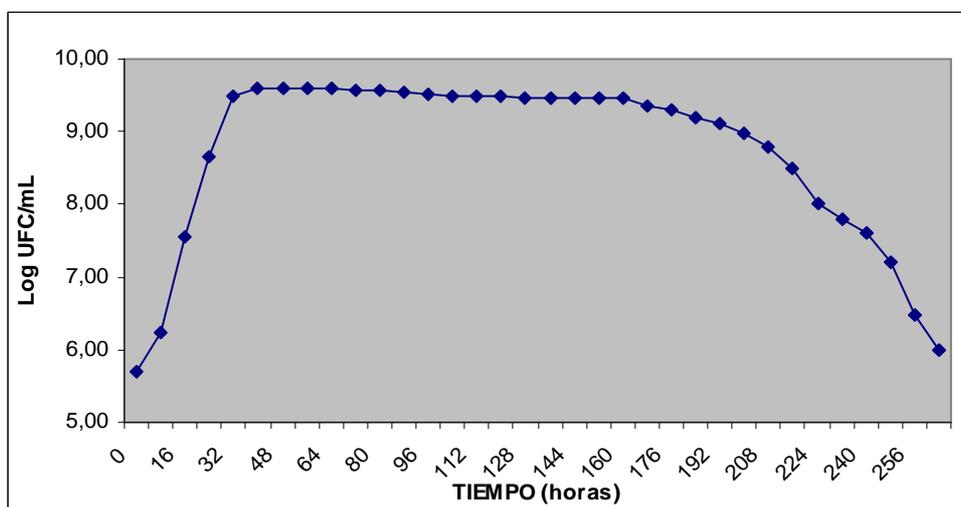


GRÁFICO No. 4 CURVA DE CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 2. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La curva de crecimiento del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Alausí en el medio de cultivo 1 presenta la fase de crecimiento hasta las 40 horas con una población de $4,0 \times 10^9$ UFC/mL de bioformulado seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta las 160 horas en la cual la concentración permanece constante, con un valor de $3,02 \times 10^9$ UFC/mL de bioformulado, y una población final en la fase de muerte, de 1×10^6 UFC/mL de bioformulado a las 264 horas

3.3 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis*

Para la determinación del pH del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* se tomaron muestras cada 24 horas y se realizó la medición con el peachimetro. Anexo 5, 6, 7, 8.

3.3.1 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 1

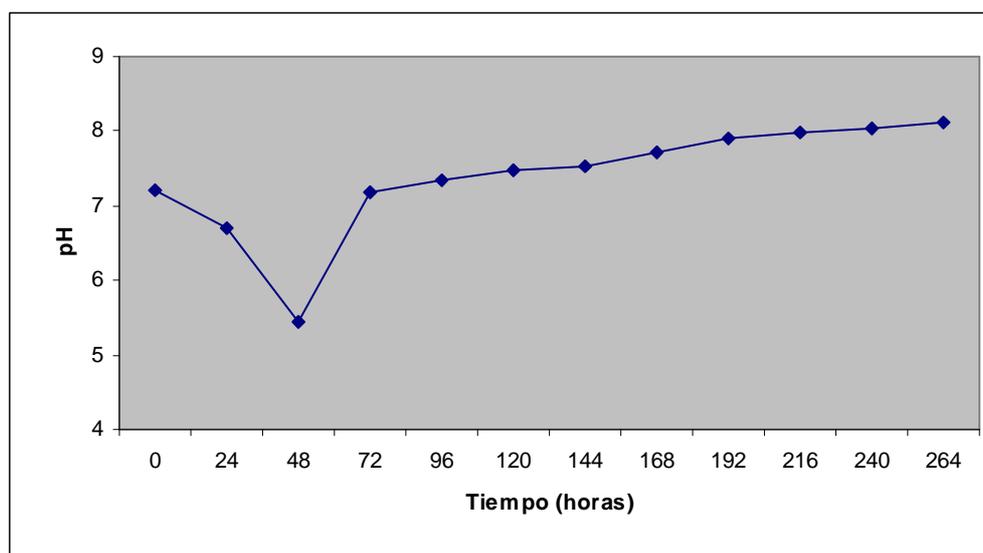


GRÁFICO No. 5 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 1. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La determinación del pH del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Chambo en el medio de cultivo 1 tuvo un pH inicial de 7.2, a las 40 horas de fermentación que es donde hubo mayor crecimiento de la bacteria el medio se acidificó y en la fase estacionaria que empieza a las 72 el medio tiende a la alcalinización y termina a las 264 horas con un pH de 8.12, lo que concuerda con lo expresado por Guzmán, que expresa que la disminución del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias(11).

3.3.2 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 2

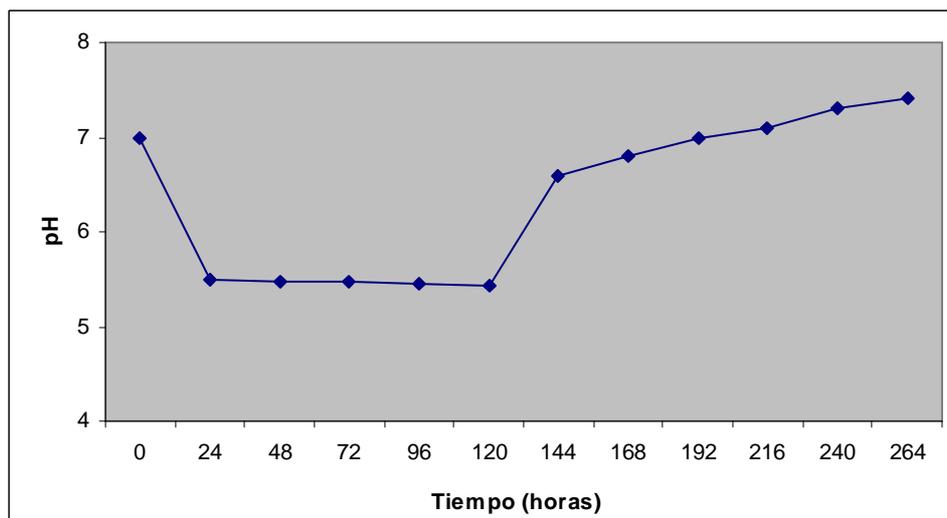


GRÁFICO No. 6 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO CHAMBO MEDIO DE CULTIVO 2. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La determinación del pH del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Chambo en el medio de cultivo 2 tuvo un pH inicial de 7.0, a las 24 horas de fermentación que corresponde a la fase de crecimiento de la bacteria el medio sufre una acidificación prolongada hasta 120 horas de la fase estacionaria y luego tiende a la alcalinización hasta llegar a la fase de muerte con un pH de 7.42 a las 264 horas lo que concuerda con lo expresado por Cañari, (1995) que expresó que conforme avanza el tiempo de fermentación, el medio, inicialmente se acidifica y luego alcaliniza, esto es debido a que existen más proteínas que carbohidratos en el caldo de fermentación, cuya degradación de las primeras favorece la alcalinización por la excreción de aminoácidos(15).

3.3.3 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 1

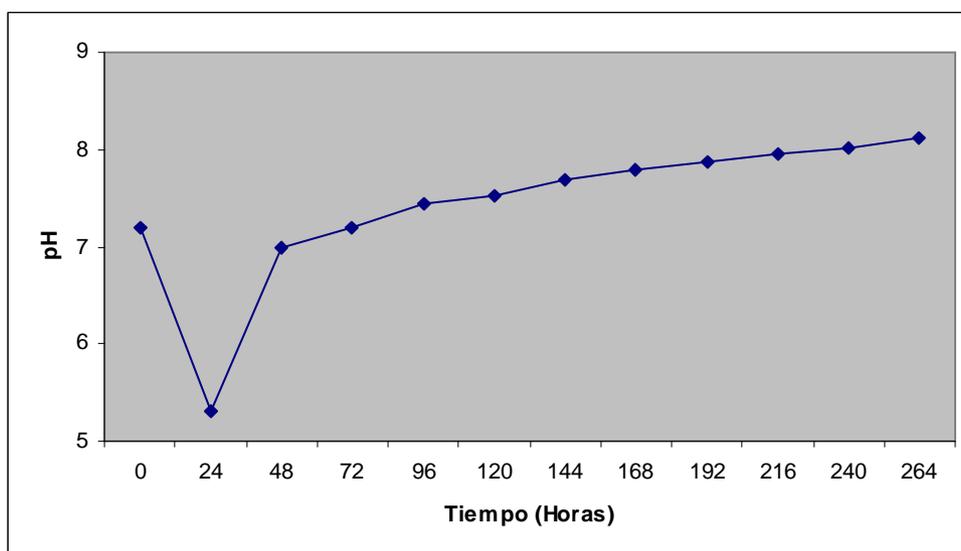


GRÁFICO No. 7 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 1. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009.

La determinación del pH del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Alausí en el medio de cultivo 1 tuvo un pH inicial de 7.2 a las 24 horas el medio se acidificó a pH 5.30 en la fase de crecimiento y a partir de las 48 horas empieza el medio a la alcalinización hasta llegar a la fase de muerte con un pH de 8.11. Lo que concuerda con lo pronunciado Pescorán, que expresa que los patrones de pH en las fermentaciones dependen principalmente del medio que esta siendo usado y del microorganismo que esta creciendo en él. Es importante monitorear continuamente el pH durante la fermentación, debido a que las desviaciones en el pH pueden ser el primer signo de un problema en la fermentación. La disminución del pH durante la fermentación es debido a que *Bacillus thuringiensis* produce y excreta ácidos a partir de glucosa y otras fuentes de carbono, los ácidos que producen son: ácido láctico, acetato, piruvato; los cuales pueden llegar a ser inhibidores del crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, las disminuciones del pH en la fermentación inhiben el crecimiento de la bacteria y de alguna manera influyen sobre la producción de la espora y el cristal insecticida (4).

3.3.4 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 2

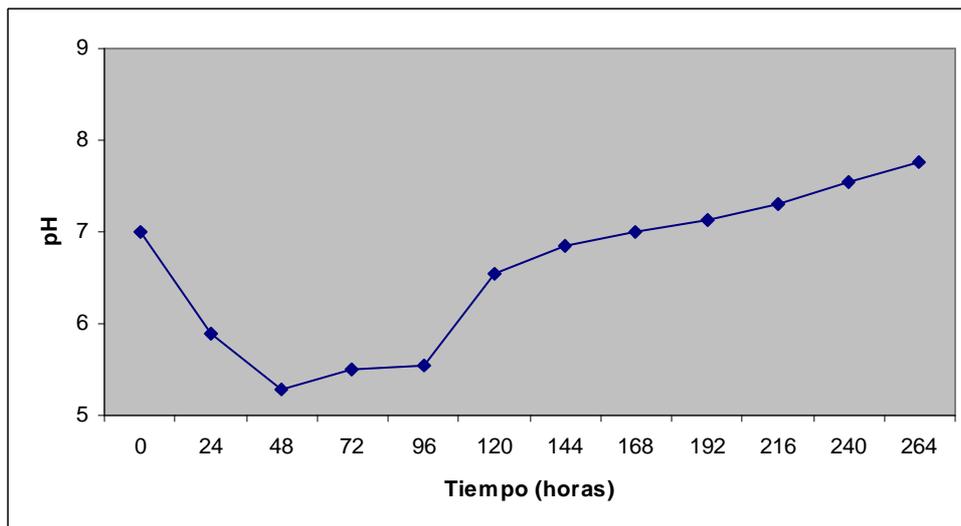


GRÁFICO No. 8 DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* AISLAMIENTO ALAUSÍ MEDIO DE CULTIVO 2. DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. JUNIO 2009

La determinación del pH del bioformulado líquido de *Bacillus thuringiensis* aislamiento Alausí en el medio de cultivo 2 tuvo un pH inicial de 7 a las 24 horas de fermentación que corresponde a la fase de crecimiento de la bacteria el medio sufre acidificación y a partir de las 96 horas de la fase estacionaria empieza con tendencia a la alcalinización hasta llegar a la fase de muerte con un pH de 7.77 lo que concuerda con lo expresado por Orietta y Larrea (2002) que dice que el pH inicial debe ser de 6,8-7,2 pero baja después de las primeras horas hasta llegar a 5,0. Posteriormente se incrementa lentamente y al final el proceso tiene un valor aproximado de 8,0. Esta cinética es un buen indicador del proceso (14).

3.4 MÁXIMO CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO DE *Bacillus thuringiensis* DE LOS AISLAMIENTOS DE CHAMBO Y ALAUSÍ EN LOS DOS MEDIOS DE CULTIVO

El análisis de varianza para el máximo crecimiento del bioformulado de *Bacillus thuringiensis* de los aislamientos de Chambo y Alausí en los dos medios de cultivo a las 40 horas de fermentación, presentó diferencias altamente significativas al 5% para los tratamientos, con un coeficiente de variación del 3.11 %.

CUADRO No 7. ANÁLISIS DE VARIANZA MÁXIMO CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO DE *Bacillus thuringiensis* DE LOS AISLAMIENTOS DE CHAMBO Y ALAUSÍ EN LOS DOS MEDIOS DE CULTIVO

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Tratamiento	3	442500000000016400	147500000000003600	9.316 **
Error	8	126666564266786800	15833320533348350	
Total	11	569166564266803200		

** Diferencias altamente significativas

Coeficiente de variación: 3.11 %

La prueba de Tukey al 5% dio como resultado 4 rangos de significancia a las 40 horas. El aislamiento de Chambo en el Medio de Cultivo 2, fue el que presentó mayor población con una media de 4.3×10^9 UFC/mL; mientras que el aislamiento de Alausí en el Medio de Cultivo 1 ocupó el último rango con una media de 3.767×10^9 UFC/mL.

Esto se debe a que el medio de cultivo 1 tiene como componentes sales minerales, Bactotripton y glucosa y el medio de cultivo dos está más enriquecido con sales minerales, glucosa, harina de soya y puré de tomate nutrientes necesarios para su crecimiento estos resultados concuerdan con lo expresado por Escobar, (2004) que dice sobre la harina de soya que es un sustrato complejo que contiene 40% de proteína y 12% de lípidos. La mayoría de nutrientes que requiere la bacteria para su crecimiento y desarrollo, al igual que Camacho, (1992) que señala sobre el puré de tomate como una fuente de nitrógeno de fácil acceso. Smith (1982) indica que la glucosa es la mejor fuente de carbono. Y Pardo, (2003) establece también importante la adición de micronutrientes como calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio (3)(12).

CUADRO No. 8 PRUEBA DE TUKEY AL 5% DE MÁXIMO CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* EN LOS BIOFORMULADOS DE LOS AISLAMIENTOS DE CHAMBO Y ALAUSÍ EN DOS MEDIOS DE CULTIVO A LAS 40 HORAS

Tratamiento	Medias	Rango	Logaritmo
T2	4.3×10^9	A	9.63
T1	4.1×10^9	B	9.61
T4	4.0×10^9	C	9.60
T3	3.767×10^9	D	9.58

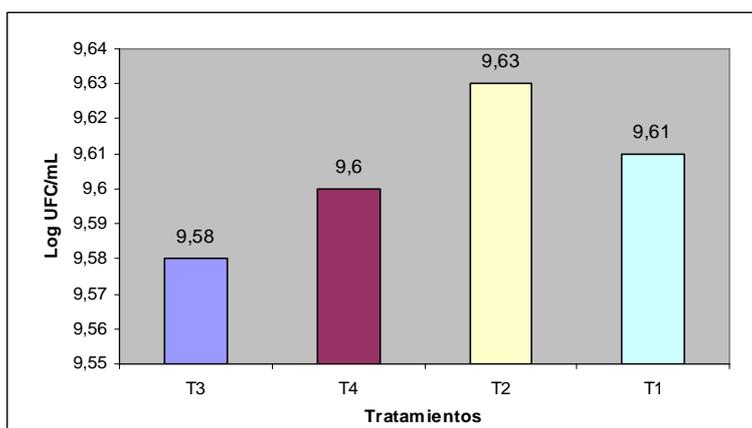


GRÁFICO NO. 9 MÁXIMO CRECIMIENTO DEL BIOFORMULADO LÍQUIDO DE *Bacillus thuringiensis* DE LOS AISLAMIENTOS DE CHAMBO Y ALAUSÍ EN DOS MEDIOS DE CULTIVO A LAS 40 HORAS

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. De las muestra de suelo obtenidas de Chambo y Alausí se aisló, e identificó *Bacillus thuringiensis* presentando características morfológicas propias de la especie, confirmando lo obtenido por otros autores con relación a la morfología de *Bacillus thuringiensis*, siendo en el Agar Luria Bertani donde se presento un crecimiento mayor de las colonias que en Agar nutritivo
2. La curva de crecimiento de los bioformulados líquidos de *Bacillus thuringiensis* del aislamiento de Alausí y Chambo presentan tres fases: fase de crecimiento hasta las 40 horas, la fase estacionaria presenta una concentración constante hasta las 160 horas y la fase de muerte a las 264 horas.
3. Los bioformulados líquidos de *Bacillus thuringiensis* del aislamiento de Chambo presentaron mayor crecimiento bacteriano con 4.1×10^9 UFC/mL y 4.3×10^9 UFC/mL en el medio de cultivo uno y dos respectivamente
4. Se determinó el medio de cultivo dos compuesto por KH_2PO_4 1.25g, CaCO_3 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.000055g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.014g, $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.015g, Harina de soya 3.0g, Glucosa 2.5g, Pure de tomate 20g, como el ideal para la fermentación de *Bacillus thuringiensis* por ser el más favorable para el crecimiento de la bacteria al ocupar el primer rango en la Prueba de Tukey al 5% de significancia sobre el medio de cultivo uno.

Esto se debe a la composición del medio con harina de soya que contiene 40% de proteína y 12% de lípidos al igual que el puré de tomate fuente de nitrógeno, la glucosa como la mejor fuente de carbono, y los micronutrientes calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio, por lo tanto son estos todos los nutrientes que requiere la bacteria para su crecimiento y desarrollo.

5. Las condiciones óptimas de fermentación fueron temperatura ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$), pH 7 y agitación de 200rpm

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevas investigaciones para comprobar la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* aislado de suelos de Chambo y Alausí, sobre los insectos-plaga que atacan diversos cultivos
2. Es conveniente que los medios de fermentación para *Bacillus thuringiensis* sean de bajo costo para obtener una óptima producción del bioinsecticida

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH y tuvo como objetivo determinar el medio de cultivo ideal y condiciones óptimas de fermentación de *Bacillus thuringiensis* para saber si es posible la producción de un bioformulado líquido utilizado como bioinsecticida para control biológico de plagas. Procediendo a aislar e identificar colonias a partir de dos muestras de suelo provenientes de Chambo y Alausí. Se realizaron fermentaciones a nivel de matraz en dos medios de cultivo: el uno, compuesto por sales minerales, Bacto-peptona y glucosa y el 2, formado por sales minerales, glucosa, harina de soya y puré de tomate. Posteriormente, cada 8 horas, se cuantificó el número de esporas mediante cámara de Neubauer, con los datos se realizó las curvas de crecimiento y se determinó su pH. Con la aplicación del tratamiento estadístico, análisis de varianza y prueba de Tukey al 5% de significancia se determinó que el medio de cultivo ideal, es el dos por estar más enriquecido con sustratos complejos que contiene la mayoría de nutrientes que requiere la bacteria para su crecimiento y desarrollo. La condiciones para la fermentación fueron temperatura 26°C , la velocidad de agitación de 200rpm para asegurar un suministro de oxígeno adecuado y evitar la acumulación del calor , así como el pH inicial óptimo de 7. Mediante la fermentación realizada en el medio de cultivo ideal, se obtuvo el bioformulado líquido orgánico. Se recomienda comprobar su actividad insecticida sobre insectos plaga.

SUMMARY

The present investigation was carried out at the Phytopathology Lab of the Natural Resources Faculty of the ESPOCH and its objective was determining the ideal culture medium and optimum fermentation conditions of *Bacillus thuringiensis* to know if the liquid bio-formulated production is possible using as a bio-insecticide for the biological pest control. Soil samples from Chambo and Alausi were isolated and identified. Fermentations were carried out at matras in two culture media: one, composed by mineral salts, bacto-peptone and glucose and the other one composed by mineral salts, glucose, soybean flour and mashed tomatoes. Later the spore number was quantified every 8 hours through the Neubauer chamber. With the data, the growth curves were performed and the pH was determined. With the statistical treatment, variance analysis and Tukey test at 5% significance application it was determined that the ideal culture medium is the second one because it is more enriched with complex substrates containing most nutrients required by bacteria for their growth and development. The conditions for fermentation were 26 °C temperature, 200 rpm agitation speed to secure an adequate oxygen provision and avoid the heat build-up, as well as the optimum initial pH of 7. Through fermentation carried out in the ideal culture medium, the organic liquid bio-formulated product was obtained. It is recommended to test its insecticide activity on pest insects.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. *Bacillus thuringiensis* Y SUS TOXINAS INSECTICIDAS

www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/.../Capitulo16.pdf
20090217

2. CONTROL BIOLÓGICO

<http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/003106/03106-07-A1.pdf>
20090217

3. EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDA POR *Bacillus thuringiensis* EN UN MEDIO DE PRODUCCIÓN SUPLEMENTADO CON "SANGUAZA"

<http://www.linros-interinsumos.com/Tempo/revista2/articulo02.htm>
20090507

4. ESCOBAR, M.;et al. Análisis Exploratorio para la Optimización de un Medio de Cultivo para la Fermentación de *Bacillus thuringiensis*

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/525/968>
20080410

5. ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO *Trichoderma*

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>
20090507

6. ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA DE *Bacillus thuringiensis* EN LA HOJA

www.tdx.cbuc.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/.../pms1de1.pdf

20090408

7. IDENTIFICACIÓN DE UN MICROORGANISMO.

<http://html.rincondelvago.com/identificacion-de-un-microorganismo.html>

20090106

8. GENERALIDADES DE *Bacillus thuringiensis*

http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs001/custodio/Bt_general.html

20090110

9. LARA, I. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* y su uso como bioinsecticida

<http://www.scribd.com/doc/8961317/Cultivo-de-Bacillus-thuringiensis-y-su-uso-como-bioinsecticida>

20090215

10. MEDRANO, O; et al .;Supervivencia de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en la esfermosfera-rizosfera de fríjol. TERRA. 18:333-337.2000

11. MODELO MATEMÁTICO DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS

<http://www.monografias.com/trabajos27/crecimiento-bacteriano>

20090425

12. PRODUCCIÓN DE BIOINSECTISIDAS A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis*

http://www.biotechnolocus.com/articulos/bt/default.htm#_INTRODUCCIÓN

20080410

- 13. SAUKA. D Y BENINTEDE G.** *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas

<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412008000200013&strip>
20090215

- 14. TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis***

<http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/resanitariosv64/fito>.
20090105

- 15. UTILIZACIÓN DE LA "SANGUAZA" PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis***

http://www.linros-interinsumos.com/Tempo/revista1/utilizacion_sanguaza.htm
20090308

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO No 1. RECUENTO DE ESPORAS DE *Bacillus thuringiensis* DEL AISLAMIENTO CHAMBO EN EL MEDIO DE CULTIVO 1

Tiempo	R1	R2	R3	Promedio	
Horas	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Logaritmo
8	5.0x10 ⁶	5.0x10 ⁶	5.0x10 ⁵	5.0x10 ⁵	5.70
16	1.9 x10 ⁶	2 x10 ⁶	1.8 x10 ⁶	1.9 x10 ⁶	6.28
24	3.98 x10 ⁷	3.97 x10 ⁷	4 x10 ⁷	3.98 x10 ⁷	7.60
32	5.0x10 ⁸	4.9x10 ⁸	5.1x10 ⁸	5.0x10 ⁸	8.70
40	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.49
48	4.1x10 ⁹	4.3x10 ⁹	4x10 ⁹	4.1x10 ⁹	9.61
56	4.3x10 ⁹	4.2x10 ⁹	3.9x10 ⁹	4.1x10 ⁹	9.61
64	4,3x10 ⁹	4 x10 ⁹	4,1x10 ⁹	4.1x10 ⁹	9.61
72	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	4.1x10 ⁹	9.61
80	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.59
88	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.58
96	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.56
104	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.52
112	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.51
120	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.51
128	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.51
136	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.50
144	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.50
152	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.50
160	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.50
168	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.44
176	2.3 x10 ⁹	2.2 x10 ⁹	2.5 x10 ⁹	2.3 x10 ⁹	9.37
184	1.70 x10 ⁹	1.5 x10 ⁹	1.9 x10 ⁹	1.70 x10 ⁹	9.23
192	7.9x 10 ⁸	7.7x 10 ⁸	8.1x 10 ⁸	7.9x 10 ⁸	8.90
200	5x10 ⁸	5.2 x10 ⁸	4.8 x10 ⁸	5 x10 ⁸	8.70
208	2.7 x10 ⁸	2.3 x10 ⁸	2.5 x10 ⁸	2.5 x10 ⁸	8.40
216	1.4 x10 ⁸	1.6 x10 ⁸	1.8 x10 ⁸	1.6 x10 ⁸	8.20
224	1 x10 ⁸	1.05x10 ⁸	1 x10 ⁸	1.02 x10 ⁸	8.01
232	4.2 x10 ⁷	3.8 x10 ⁷	4 x10 ⁷	4 x10 ⁷	7.60
240	1.4 x10 ⁷	1.8 x10 ⁷	1.6 x10 ⁷	1.6 x10 ⁷	7.20
248	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷	1 x10 ⁷	7.00

256	4.7×10^6	4.5×10^6	4.3×10^6	4.5×10^6	6.65
264	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	6.00

ANEXO No 2. RECUENTO DE ESPORAS DE *Bacillus thuringiensis* DEL AISLAMIENTO CHAMBO EN EL MEDIO DE CULTIVO 2

Tiempo	R1	R2	R3	Promedio	
Horas	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Logaritmo
8	5.0×10^6	5.0×10^6	5.0×10^5	5.0×10^5	5.70
16	1.4×10^6	1.2×10^6	1.6×10^6	1.4×10^6	6.15
24	3.0×10^7	2.8×10^7	2.6×10^7	2.8×10^7	7.45
32	3.5×10^8	3.3×10^8	3.1×10^8	3.3×10^8	8.52
40	3.5×10^9	3.3×10^9	3.7×10^9	3.5×10^9	9.54
48	4.5×10^9	4.3×10^9	4.1×10^9	4.3×10^9	9.63
56	4.1×10^9	4.3×10^9	4.5×10^9	4.3×10^9	9.63
64	4.5×10^9	4.1×10^9	4.3×10^9	4.3×10^9	9.63
72	4.3×10^9	4.5×10^9	4.1×10^9	4.3×10^9	9.63
80	3.8×10^9	4×10^9	4.2×10^9	4×10^9	9.60
88	3.7×10^9	3.9×10^9	4.1×10^9	3.9×10^9	9.59
96	3.5×10^9	3.7×10^9	3.9×10^9	3.7×10^9	9.57
104	3.4×10^9	3.8×10^9	3.6×10^9	3.6×10^9	9.56
112	3.0×10^9	3.2×10^9	3.4×10^9	3.2×10^9	9.51
120	3.2×10^9	3.0×10^9	3.4×10^9	3.2×10^9	9.51
128	3.3×10^9	2.9×10^9	3.1×10^9	3.1×10^9	9.50
136	3.0×10^9	3.4×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9	9.51
144	3.3×10^9	3.1×10^9	2.9×10^9	3.1×10^9	9.50
152	2.9×10^9	3.3×10^9	3.1×10^9	3.1×10^9	9.50
160	3.1×10^9	2.9×10^9	3.3×10^9	3.1×10^9	9.50
168	2.4×10^9	2.6×10^9	2.8×10^9	2.6×10^9	9.41
176	2.5×10^9	2.2×10^9	2.3×10^9	2.3×10^9	9.37
184	1.7×10^9	1.9×10^9	1.5×10^9	1.7×10^9	9.23
192	8.1×10^8	7.9×10^8	7.7×10^8	7.9×10^8	8.9
200	5.1×10^8	5.3×10^8	4.9×10^8	5.1×10^8	8.7
208	2.4×10^8	2.6×10^8	2.8×10^8	2.6×10^8	8.4
216	1.4×10^8	1.8×10^8	1.6×10^8	1.6×10^8	8.2
224	1.2×10^8	1.4×10^8	1.6×10^8	1.4×10^8	8.1
232	4.3×10^7	4.1×10^7	3.9×10^7	4.1×10^7	7.6
240	1.5×10^7	1.9×10^7	1.7×10^7	1.7×10^7	7.2
248	1.3×10^7	0.9×10^7	1.1×10^7	1.1×10^7	7
256	4.7×10^6	4.5×10^6	4.3×10^6	4.5×10^6	6.65
264	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	6.00

ANEXO No 3. RECUENTO DE ESPORAS DE *Bacillus thuringiensis* DEL AISLAMIENTO ALAUSÍ EN EL MEDIO DE CULTIVO 1

Tiempo	R1	R2	R3	Promedio	
Horas	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Logaritmo
8	5.0x10 ⁶	5.0x10 ⁶	5.0x10 ⁵	5.0x10 ⁵	5.70
16	1.5x10 ⁶	1.3x10 ⁶	1.7x10 ⁶	1.5x10 ⁶	6.18
24	3.4 x10 ⁷	3.2 x10 ⁷	3.0 x10 ⁷	3.2 x10 ⁷	7.51
32	4.1 x10 ⁸	4.3 x10 ⁸	4.5 x10 ⁸	4.3 x10 ⁸	9.63
40	2.7 x10 ⁹	3.1 x10 ⁹	2.9 x10 ⁹	2.9 x10 ⁹	9.46
48	3.6x10 ⁹	3.8x10 ⁹	4.0x10 ⁹	3.8x10 ⁹	9.58
56	3.8x10 ⁹	3.8x10 ⁹	3.8x10 ⁹	3.8x10 ⁹	9.58
64	3.6x10 ⁹	3.8x10 ⁹	4.0x10 ⁹	3.8x10 ⁹	9.58
72	4.0x10 ⁹	3.6x10 ⁹	3.8x10 ⁹	3.8x10 ⁹	9.58
80	3.3x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.7x10 ⁹	3.5x10 ⁹	9.55
88	3.7x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.3x10 ⁹	3.5x10 ⁹	9.54
96	3.5x10 ⁹	3.3x10 ⁹	3.7 x10 ⁹	3.5x10 ⁹	9.54
104	3.3x10 ⁹	3.7x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.5x10 ⁹	9.54
112	3.2x10 ⁹	3.4x10 ⁹	3.6x10 ⁹	3.4x10 ⁹	9.53.
120	3.4x10 ⁹	3.6x10 ⁹	3.2x10 ⁹	3.4x10 ⁹	9.53
128	3.6x10 ⁹	3.2x10 ⁹	3.4x10 ⁹	3.4x10 ⁹	9.53
136	3.3x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.3x10 ⁹	9.52
144	3.1x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.3x10 ⁹	3.3x10 ⁹	9.52
152	3.5x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.3x10 ⁹	3.3x10 ⁹	9.52
160	3.1x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.3x10 ⁹	3.3x10 ⁹	9.51
168	2.6x10 ⁹	2.8x10 ⁹	3.0x10 ⁹	2.8x10 ⁹	9.44
176	2.0x10 ⁹	2.2x10 ⁹	2.4x10 ⁹	2.2x10 ⁹	9.35
184	1.7x10 ⁹	2.1x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.9x10 ⁹	9.27
192	1.2 x10 ⁹	1.4 x10 ⁹	1.6 x10 ⁹	1.4 x10 ⁹	9.15
200	1.3 x10 ⁹	1.1 x10 ⁹	1.5 x10 ⁹	1.3 x10 ⁹	9.10
208	9.3 x10 ⁸	9.7 x10 ⁸	9.5 x10 ⁸	9.5 x10 ⁸	8.98
216	1.4 x10 ⁸	1.6 x10 ⁸	1.8 x10 ⁸	1.6 x10 ⁸	8.70
224	5.3 x10 ⁸	5.1 x10 ⁸	4.9 x10 ⁸	5.1 x10 ⁸	8.35
232	4.5 x10 ⁷	4.7 x10 ⁷	4.9 x10 ⁷	4.7 x10 ⁷	7.67
240	1.4 x10 ⁷	1.6 x10 ⁷	1.8 x10 ⁷	1.6 x10 ⁷	7.20
248	1.1 x10 ⁷	1.3 x10 ⁷	0.9 x10 ⁷	1.1 x10 ⁷	7
256	2.0x10 ⁶	2.2x10 ⁶	2.4x10 ⁶	2.2x10 ⁶	6.34
264	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	6

ANEXO No 4. RECUENTO DE ESPORAS DE *Bacillus thuringiensis* DEL AISLAMIENTO ALAUSÍ EN EL MEDIO DE CULTIVO 2

Tiempo	R1	R2	R3	Promedio	
Horas	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	Logaritmo
8	5.0x10 ⁶	5.0x10 ⁶	5.0x10 ⁵	5.0x10 ⁵	5.70
16	1.5x10 ⁶	1.7x10 ⁶	1.9x10 ⁶	1.7x10 ⁶	6.23
24	3.7 x10 ⁷	3.3 x10 ⁷	3.5 x10 ⁷	3.5 x10 ⁷	7.55
32	4.3 x10 ⁸	4.7 x10 ⁸	4.5 x10 ⁸	4.5 x10 ⁸	8.65
40	3 x10 ⁹	3.2 x10 ⁹	2.9 x10 ⁹	3 x10 ⁹	9.48
48	4x10 ⁹	4.2x10 ⁹	3.8x10 ⁹	4x10 ⁹	9.60
56	4.2x10 ⁹	3.8x10 ⁹	4x10 ⁹	4x10 ⁹	9.60
64	3.8x10 ⁹	4x10 ⁹	4.2x10 ⁹	4x10 ⁹	9.60
72	4x10 ⁹	4.2x10 ⁹	3.8x10 ⁹	4x10 ⁹	9.60
80	3.6x10 ⁹	4.0x10 ⁹	3.8x10 ⁹	3.8x10 ⁹	9.58
88	3.7x10 ⁹	3.9x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.7x10 ⁹	9.57
96	3.4x10 ⁹	3.6x10 ⁹	3.8x10 ⁹	3.6x10 ⁹	9.56
104	3.0x10 ⁹	3.4x10 ⁹	3.2x10 ⁹	3.2x10 ⁹	9.51
112	3.3x10 ⁹	3.1x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	9.50
120	3.2x10 ⁹	2.8x10 ⁹	3x10 ⁹	3x10 ⁹	9.49
128	2.7x10 ⁹	2.9x10 ⁹	3.1x10 ⁹	2.9x10 ⁹	9.48
136	2.6x10 ⁹	2.8x10 ⁹	3.0x10 ⁹	2.8x10 ⁹	9.47
144	3.0x10 ⁹	2.8x10 ⁹	2.6x10 ⁹	2.8x10 ⁹	9.47
152	2.5x10 ⁹	2.9x10 ⁹	2.7x10 ⁹	2.7x10 ⁹	9.46
160	2.7x10 ⁹	2.5x10 ⁹	2.9x10 ⁹	2.7x10 ⁹	9.46
168	2.6x10 ⁹	2.4x10 ⁹	2.2x10 ⁹	2.6x10 ⁹	9.45
176	2.1x10 ⁹	2.3x10 ⁹	2.5x10 ⁹	2.3x10 ⁹	9.36
184	1.8x10 ⁹	2x10 ⁹	2.2x10 ⁹	2x10 ⁹	9.30
192	1.6 x10 ⁹	1.4 x10 ⁹	1.8 x10 ⁹	1.6 x10 ⁹	9.20
200	1.1 x10 ⁹	1.3 x10 ⁹	1.5 x10 ⁹	1.3 x10 ⁹	9.10
208	9.8 x10 ⁸	9.8 x10 ⁸	9.8 x10 ⁸	9.8 x10 ⁸	8.99
216	3.0 x10 ⁸	3.2 x10 ⁸	3.4 x10 ⁸	3.2 x10 ⁸	8.50
224	1 x10 ⁸	1 x10 ⁸	1 x10 ⁸	1 x10 ⁸	8
232	6.1x10 ⁷	6.5x10 ⁷	6.3x10 ⁷	6.3x10 ⁷	7.8
240	4.2 x10 ⁷	4 x10 ⁷	3.9 x10 ⁷	4 x10 ⁷	7.6
248	1.6 x10 ⁷	1.4 x10 ⁷	1.8 x10 ⁷	1.6 x10 ⁷	7.2
256	3.2x10 ⁶	2.8x10 ⁶	3x10 ⁶	3x10 ⁶	6.48
264	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	6

ANEXO No 5. DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO AISLAMIENTO CHAMBO EN EL MEDIO DE CULTIVO 1

TIEMPO (horas)	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
pH	7.2	6.69	5.44	7.18	7.34	7.47	7.54	7.72	7.91	7.98	8.05	8.10

ANEXO No 6. DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO AISLAMIENTO CHAMBO EN EL MEDIO DE CULTIVO 2

TIEMPO (horas)	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
pH	7	5.49	5.48	5.47	5.46	5.44	6.6	6.8	7	7.1	7.31	7.42

ANEXO No7. DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO AISLAMIENTO ALAUSÌ EN EL MEDIO DE CULTIVO 1

TIEMPO (horas)	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
pH	7.2	5.3	7	7.2	7.45	7.52	7.68	7.78	7.88	7.96	8.02	8.11

ANEXO No8. DETERMINACIÓN DEL pH DEL BIOFORMULADO AISLAMIENTO ALAUSÌ EN EL MEDIO DE CULTIVO 2

TIEMPO (horas)	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
pH	7	5.9	5.29	5.49	5.54	6.54	6.84	7	7.13	7.31	7.54	7.77

ANEXO No 9. CULTIVO MIXTO DE BACTERIAS



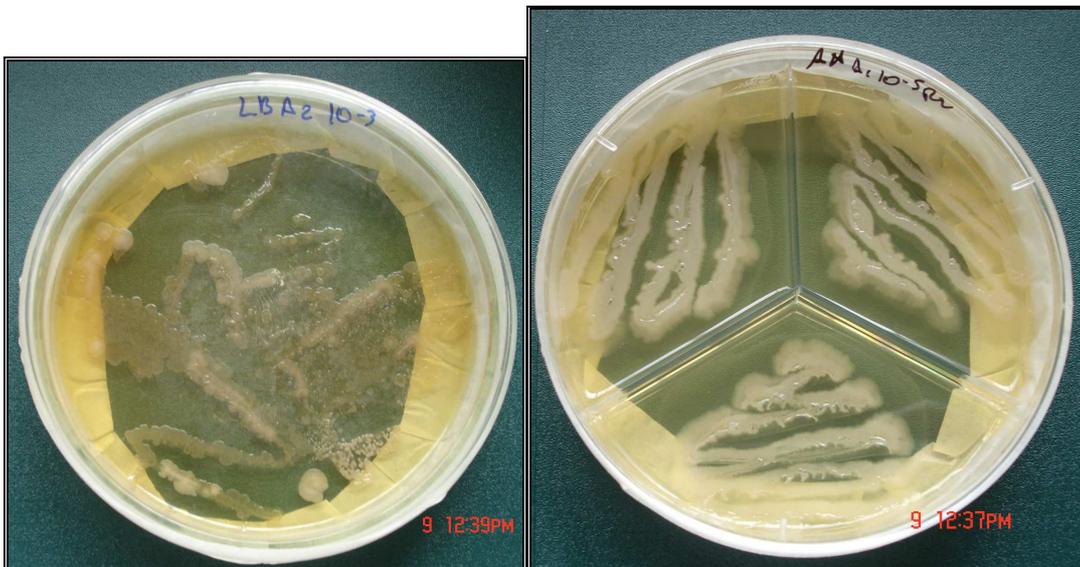
ANEXO No 10. RESIEMBRAS SUCESIVAS PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVO PURO



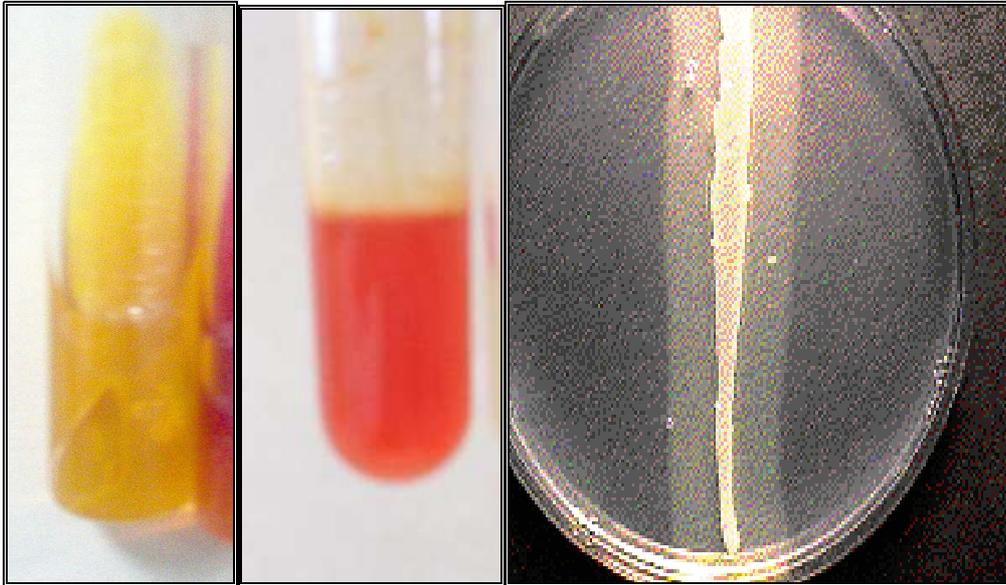
ANEXO No11. CULTIVO PURO DE *Bacillus thuringiensis* PRODEDENTE DE CHAMBO EM AGAR NUTITIVO Y LURIA BERTANI



ANEXO No 12. CULTIVO PURO EN AGAR NUTRITIVO Y LURIA BERTANI DE *Bacillus thuringiensis* PROCEDENTE DE ALAUSÍ



ANEXO No 13. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis*. (FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA, VOGES-PROSKAWER E HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN)



ANEXO No 14. FERMENTACIÓN A NIVEL DE MATRAZ DE *Bacillus thuringiensis* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO



ANEXO No 15. MEDICIÓN DEL pH DE LOS BIOFORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis*



ANEXO No 16. CONTEO EN LA CÁMARA DE NEUBAUER DE *Bacillus thuringiensis*

