

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, PRODUCCIÓN, EVALUACIÓN Y
FORMULACIÓN DE CEPAS NUEVAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*
TÓXICAS CONTRA INSECTOS LEPIDÓPTEROS**

PRESENTA

QBP. JOSÉ FERNANDO ORNELAS PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

AGOSTO, 2017

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, PRODUCCIÓN, EVALUACIÓN
 Y FORMULACIÓN DE CEPAS NUEVAS NATIVAS DE *Bacillus*
 thuringiensis TÓXICAS CONTRA INSECTOS LEPIDÓPTEROS**

Comité de Tesis

Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco
Presidente

Dra. Myriam Elías Santos
Secretario

Dra. Ma. del Socorro Flores González
Vocal

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Vocal

Dra. Isela Quintero Zapata
Vocal

DEDICATORIA

A mi esposo y compañero de vida, Mario Alberto Roque Alonso, a mi familia y amigos por brindarme su apoyo, amor y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por haberme dado la fortaleza, de terminar una etapa más de mi vida.

A la **Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco**, por brindarme su confianza al invitarme a desarrollar este proyecto, por todo su apoyo y por su excelente dirección en este proyecto. Gracias, por sus constantes orientaciones y su inestimable dedicación a lo largo de todo el proceso de elaboración de este Proyecto. Sus valiosas enseñanzas han hecho posible todo esto y han marcado profundamente mi trayectoria profesional.

A la **Dra. Myriam Elías Santos**, por haber brindado su apoyo en la operación de esta investigación y por estar al pendiente en todo momento.

A la **Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos**, por sus indicaciones en la Formulación y consejos.

A la **Dra. María del Socorro Flores** y a la **Dra. Isela Quintero Zapata**, por formar parte de ésta comisión de tesis, su apoyo y consejos.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio que hicieron muy amena mi estancia en el Instituto gracias a **Dra. Orquídea Pérez y LCA Iliana Cardoso Lozano** por brindarme su amistad, por todos los consejos y siempre brindarme su ayuda. A la **Tec. Teresa Burgos** y a la **M.C. Dinora Pérez** por toda su ayuda. A **Feliciano Molina Estrada** por todo su apoyo, consejo y ayuda en la elaboración de las Dietas Artificiales.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Biológicas y al Instituto de Biotecnología**, por darme la oportunidad de lograr una meta más.

Y por último, a mi **Familia y Amigos**, quienes con su cariño y apoyo incondicional han logrado que este proyecto se convierta en realidad. A todos ustedes... Gracias.

A CONACYT, por la beca-crédito otorgada para esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

Sección	Página
TÍTULO	
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Control Biológico	7
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.3 Mecanismo de Acción de las proteínas Cry	8
2.4 Caracterización de Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.5 Utilización como control biológico	10
2.6 Factores que afectan la actividad de la δ -endotoxina	10
2.7 Medios de producción	11
2.8 Formulación	15
2.9 Microencapsulación	19
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Obtención de los aislados	27
6.2 Mantenimiento de las cepas	27
6.3 Medios de Cultivo y condiciones de fermentación para propagación de las cepas.	27
6.4 Recuperación del complejo espora-cristal	29
6.5 Bioensayos	29
6.6 Selección de los aislados más tóxicos	29
6.7 Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀)	30
6.8 Comparación de la toxicidad de las cepas aisladas contra las cepas de referencia HD-1, GM-7, IB-7 e IB-62.	30
6.9 Formulación	30

6.9.1	Determinación de humedad de los formulados	31
6.10	Efecto de almacenamiento de los formulados	31
6.11	Efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad insecticida del extracto y formulados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
6.12	Análisis proteico del complejo espora-cristal	32
6.13	Perfil de plásmidos	32
6.14	Determinación de Genes Cry	33
6.15	Producción de la Beta exotoxina	34
6.15.1	Preparación del inóculo	34
6.15.2	Medio de cultivo para la producción de la β exotoxina	34
6.15.3	Precipitación con etanol	35
6.15.4	Análisis espectrofotométrico	35
7. RESULTADOS		36
7.1	Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
7.2	Morfología de los cristales de las cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
7.3	Rendimiento de las fermentaciones del medio melaza-harina de soya	36
7.4	Evaluación de la toxicidad de las cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Spodoptera exigua</i> y <i>Helicoverpa zea</i>	38
7.5	Determinación de CL ₅₀ de cepas cultivadas en el medio melaza	44
7.6	Determinación de CL ₅₀ de cepas cultivadas en el medio soluble (Jarabe de maíz)	48
7.7	Actividad tóxica de las Formulaciones preparadas con los extractos insecticidas YUC-3, YUC-5 y M2-1	54
7.7.1	Determinación de CL ₅₀ del Formulador YUC-3	56
7.7.2	Determinación de CL ₅₀ del Formulador M2-1	56
7.8	Porcentaje de humedad de los extractos insecticidas-polímeros	57
7.9	Efecto de almacenamiento sobre la actividad insecticida de los formulados e ingrediente activo	57
7.10	Efecto de los formulados blanco (sin ingrediente activo)	61
7.11	Efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad insecticida de los extractos y formulados YUC-3, YUC-5 y M2-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	61
7.12	Análisis proteico	66
7.13	Perfil de plásmidos	67
7.14	Genes Cry	67
7.15	Producción de β -exotoxina	68

8. DISCUSIÓN	70
9.CONCLUSIONES	79
10.PERSPECTIVAS	81
11.BIBLIOGRAFIA	82

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1	Los diferentes tipos de adyuvantes/ aditivos usados en formulaciones microbianas	16
Tabla 2	Formulaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> productos y su uso disponibles comercialmente	18
Tabla 3	Composición del Medio de Cultivo para la producción de δ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> por Cepas Nativas y de Referencia.	28
Tabla 4	Composición del Nuevo Medio de Cultivo con ingredientes solubles para la producción de δ -endotoxina de Cepas Nativas y de Referencia <i>Bacillus thuringiensis</i> .	28
Tabla 5	Composición de los formulados de <i>Bacillus thuringiensis</i> y polímeros agregados a diferentes concentraciones.	31
Tabla 6	Reacción de la extracción de ADN	33
Tabla 7	Información de los Primers	33
Tabla 8	Composición del Medio de Cultivo para la producción de la β exotoxina	34
Tabla 9	Cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> aisladas de suelo agrícola del Estado de Yucatán y Chiapas	37
Tabla 10	ANOVA de las cepas aisladas de Yucatán.	40
Tabla 11	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de Yucatán y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros.	45
Tabla 12	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de Chiapas y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros.	47
Tabla 13	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de Yucatán y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros producidos en el medio con Ingredientes Solubles.	49
Tabla 14	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> de Chiapas y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros producidos en el medio con Ingredientes Solubles.	51
Tabla 15	Comparación de CL ₅₀ , en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, de las cepas de referencia y nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> producidos en medio melaza y en el nuevo medio soluble, contra larvas neonatas de insectos de prueba. Análisis de la t de Student (* indica diferencia significativa al nivel de 0.05).	53
Tabla 16	Resumen de las prueba t de Student de la comparación CL ₅₀ de los complejos espóra-cristal producidos en medio melaza y un nuevo medio soluble contra los insectos prueba.	54
Tabla 17	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, de los formulados preparados a partir de la cepa nativa YUC-5 de <i>Bacillus thuringiensis</i> y el producto comercial Dipel® 2X contra Larvas Neonatas.	55
Tabla 18	Porcentaje de humedad de los formulados después del secado por aspersión.	57
Tabla 19	Mortalidad presentada por formulados e ingrediente activo de la cepa	vii 58

	YUC-5 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sin formular, almacenados a 25-30°C durante varios días, contra larvas neonatas de insectos de prueba.	
Tabla 20	Mortalidad Presentada por Formulados e Ingrediente Activo de la Cepa YUC-3 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sin Formular, Almacenados a 25-30°C durante Varios Días, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.	59
Tabla 21	Mortalidad Presentada por Formulados e Ingrediente Activo de la Cepa M2-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> sin Formular, Almacenados a 25-30°C durante Varios Días, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.	60
Tabla 22	Efecto de Irradiación con Luz Ultra Violeta de 254 nm λ durante 72 Horas sobre el Extracto Insecticida sin Formular y Formulados Preparados de la Cepa Nativa YUC-5 de <i>Bacillus thuringiensis</i> , contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.	62
Tabla 23	Efecto de Irradiación con Luz Ultra Violeta de 254 nm λ durante 72 Horas sobre el Extracto Insecticida sin Formular y Formulados Preparados de la Cepa Nativa YUC-3 de <i>Bacillus thuringiensis</i> , contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.	64
Tabla 24	Efecto de irradiación con luz ultra violeta de 254 nm λ durante 72 horas sobre el extracto insecticida sin formular y formulados preparados de la cepa nativa M2-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> , contra larvas neonatas de insectos de prueba.	65
Tabla 25	Espectro de absorción ultravioleta de los precipitados etanólicos de las cepas nativas y de referencia de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	69

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Modo de acción de las proteínas Cry	8
Figura 2	Fotografías al microscopio de la morfología de las cepas nativas de suelo de Yucatán y Chiapas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	36
Figura 3	Efecto de la exposición de larvas neonatas de <i>Trichoplusia ni</i> a la cepa de referencia IB-7.	39
Figura 4	Análisis comparativo de la composición de los cristales de cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> determinados mediante SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida.	66
Figura 5	Gel de agarosa al 5%. Análisis comparativo de los fragmentos amplificados de los genes Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> YUC-3, YUC-5 y M2-1.	67
Figura 6	Gel de agarosa al 1%. Análisis de Genes Cry de las cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	68

LISTA DE ANEXOS

Anexo		Página
Anexo I	Mortalidad Presentada por Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>Trichoplusia ni</i> .	96
Anexo II	Mortalidad Presentada por Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>Spodoptera exigua</i> .	100
Anexo III	Mortalidad Presentada por Cepas Nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>Helicoverpa zea</i> .	104
Anexo IV	Continuación de los Análisis de Varianza de bioensayos preliminares de cepas nativas aisladas de Yucatán	108
Anexo V	Análisis de Varianza de bioensayos preliminares de cepas nativas aisladas de muestras de suelo de Chiapas	112
Anexo VI	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , en µg/cm ² , de los Formulados Preparados a partir de la cepa nativa YUC-3 de <i>Bacillus thuringiensis</i> y el Producto Comercial Dipel [®] 2X contra Larvas Neonatas.	115
Anexo VII	Comparación de CL ₅₀ y CL ₉₀ , en µg/cm ² , de los Formulados Preparados a partir de la cepa nativa M2-1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> y el Producto Comercial Dipel [®] 2X contra Larvas Neonatas.	116

LISTA DE ABREVIATURAS

APN	Aminopeptidasa N
ALP	Fosfatasa alcalina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CL₅₀	Concentración letal media
CL₉₀	Concentración letal 90
°C	Grados Celsius
Cm²	Centímetros cuadrados
h	Horas
<i>H. zea</i>	<i>Helicoverpa zea</i>
kDa	Kilodaltones
Kg/Ha	Kilogramo(s) por hectárea
L/Ha	Litros por hectárea
KLa	Coefficiente de transferencia de masa
mg/L	Miligramos(s) por litro
mg/mL	Miligramos(s) por mililitro
g/Kg	Gramo(s) por kilogramo(s)
g/L	Gramos (s) por litro
mL	Mililitro
µg	Microgramo(s)
µg/cm²	Microgramo(s) por centímetro cuadrado
µg/mL	Microgramo(s) por mililitro
ng/cm²	Nanogramo(s) por centímetro cuadrado
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
Serovar.	serovariedad
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
UI	Unidades Internacionales
US-EPA	Agencia de Protección al ambiente de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
Var.	variedad
Griegas	
β	Beta
δ	Delta

RESUMEN

Bacillus thuringiensis se ha usado durante más de cincuenta años como una opción importante en el control de insectos lepidópteros y dípteros principalmente, debido a sus ventajas de especificidad, bajo riesgo de desarrollo de resistencia y seguridad ambiental. Actualmente, para impulsar el desarrollo de nuevos plaguicidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* las investigaciones se basan en buscar nuevas cepas que presenten quizá mayor potencial tóxico contra diversos organismos plaga, así como el mejoramiento en la producción y formulación, así como el desarrollo de plantas transgénicas. Por lo anterior, en este trabajo se aislaron y se evaluaron 35 nuevas cepas provenientes de suelo del Estado de Yucatán y Chiapas, encontrándose cepas con alta toxicidad. El análisis microscópico indicó el predominio de cristales de forma bipiramidal (pequeños a grandes), cuadrados e irregulares. Posteriormente las cepas aisladas fueron cultivadas en medio a base de melaza, líquido de remojo de maíz y harina de soya para la producción del complejo espora-cristal durante 3 días a 30°C y 200 rpm. Después de la extracción del complejo espora-cristal, se realizaron bioensayos preliminares contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* utilizando 50, 5 y 0.5 µg del complejo espora-cristal/cm² en dieta artificial Shorey, a partir de estos bioensayos se seleccionaron 14 cepas nativas para la determinación de las CL₅₀, las cuales se compararon contra cepas de referencia como la HD-1, GM-7, IB-7 e IB-62. Los resultados de los bioensayos indicaron que la cepa YUC-5 presentó 0.108 µg/cm² de CL₅₀, contra *Trichoplusia ni*, siendo significativamente más tóxica que las cepas de referencia GM-7 y HD-1, mientras que contra *Spodoptera exigua* la toxicidad fue similar a IB-62 y HD-1. Contra *Helicoverpa zea*, solo dos cepas presentaron mayor toxicidad, la YUC-17 y YUC-20, sin embargo su actividad tóxica fue casi diez veces menos que las cepas de referencia. Cuando las cepas nativas y de referencia se cultivaron en medio soluble conteniendo jarabe de maíz y extracto de semilla de girasol, presentaron CL₅₀ mayores y por lo tanto menos toxicidad en comparación a las producidas en medio melaza, a excepción de la cepa M2-9 y YUC-3, que presentaron CL₅₀ menores en medio soluble. Así, se determinó que los extractos insecticidas más tóxicos resultaron ser los producidos por las cepas nativas YUC-5, YUC-3 y M2-1 contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y

Helicoverpa zea, respectivamente, las cuales posteriormente se formularon con mezclas de polímeros naturales y fotoprotector. En nuevos bioensayos con estos formulados preparados, la cepa YUC-5 mostró que el formulado F2-5, con 1% de pectina y 5% de harina de maíz, presentó significativamente la menor CL_{50} contra *Trichoplusia ni* ($0.133 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), seguido del formulado F1-5, compuesto por 4% de pectina y 2% de harina de maíz, mostrando mejor actividad que el producto comercial [®]Dipel 2X, sin embargo, al ser aplicados contra *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, presentaron menor actividad toxica que el [®]Dipel 2X. Los formulados preparados de la cepa YUC-3 (F1-3 y F2-3) mostraron que la actividad tóxica contra *Trichoplusia ni* fue significativamente igual al [®]Dipel 2X, para el formulado F2-3, mientras que para el formulado F1-3 fue menor. Cuando los formulados anteriores (F1-3 y F2-3) fueron probados contra *Spodoptera exigua*, la actividad de ambos formulados fue significativamente mayor al producto comercial [®]Dipel 2X. Los formulados F1-M21 y F2-M21, preparados con la cepa M2-1 cuando se probaron contra *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, no superaron la actividad del producto comercial [®]Dipel 2X, pero en cambio el formulado F2-M21 presentó significativamente igual CL_{50} contra *Trichoplusia ni* en comparación con el producto comercial [®]Dipel 2X y menor CL_{50} que el F1-M21. Después de 90 días de almacenamiento a 20-35°C y 80% de humedad relativa, los formulados mantuvieron su actividad tóxica sin pérdida significativa. Cuando se irradiaron con luz ultravioleta, los extractos insecticidas sin formular después de 72 horas presentaron reducciones del 59-87.4% en la mortalidad de larvas neonatas de los insectos prueba, contrario a lo mostrado por las formulaciones irradiadas que presentaron menores reducciones (3.9-12.5%) en la mortalidad de larvas comparadas con formulaciones no irradiadas. La electroforesis en gel de poliacrilamida de las suspensiones de esporas y cristales mostró que las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1 tuvieron un patrón proteico similar al informado para *Bacillus thuringiensis* serov. *kurstaki*, con proteínas de 130 y 70 kDa bien definidas. El análisis de PCR de las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1 revela la presencia de fragmentos amplificados característicos de los genes Cry comparados con un patrón de plásmidos similar a la cepa HD-1. Los genes Cry encontrados en el gel de agarosa al 1% corresponden a los genes Cry 1 y Cry 2 de las cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1. Estas cepas carecen de la producción de β -exotoxina.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis has been used for over fifty years as an important choice in controlling lepidopteran and dipterans insects mainly due to their specificity advantages, low risk of resistance development and environmental safety. Currently, in order to promote the development of new biological pesticides based on *Bacillus thuringiensis*, the research is based on the search for new strains that may present a greater toxic potential against various pest organisms, as well as the improvement in the production and formulation, in addition also the development of transgenic plants. Therefore, in this work, 35 new strains, from the soil of the States of Yucatan and Chiapas were isolated and evaluated, and isolates with high toxicity were found. Microscopic analysis indicated the predominance of bipyramidal (small to large), square and irregular crystals. The strains isolated were then cultured in molasses, corn steep powder and soybean meal for the production of the spore-crystal complex for 3 days at 30 ° C and 200 rev/min. After the extraction of the spore-crystal complex, preliminary bioassays were performed on neonate larvae of *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa zea* using 50, 5 and 0.5 µg of the spore-crystal /cm² on Shorey artificial diet. From these bioassays, 14 native strains were selected for the determination of the LC₅₀, which were compared against reference strains like HD-1, GM-7, IB-7 and IB-62. The results of the bioassays indicated that the strain YUC-5 presented 0.108 µg / cm² as LC₅₀, against *Trichoplusia ni*, being significantly more toxic than the GM-7 and HD-1 reference strains, whereas against *Spodoptera exigua* toxicity was similar to IB-62 and HD-1 strains. Against *Helicoverpa zea*, only two strains showed greater toxicity, YUC-17 and YUC-20, however their toxic activity was almost ten times less than the reference strains. When native and reference strains were cultured in soluble medium containing corn syrup and sunflower seed extract, they showed higher LC₅₀s and therefore less toxicity compared to those produced in molasses medium, with the exception of strain M2-9 and YUC-3, which showed minor LC₅₀s in soluble medium. Thus, the most toxic insecticidal extracts were found to be produced by the native YUC-5, YUC-3 and M2-1 strains against *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa zea*, respectively, which were subsequently formulated with natural polymer blends and photoprotectant. In new bioassays done with these

formulations, the strain YUC-5 showed that the F2-5 formulation, with 1% pectin and 5% corn flour, had the lowest LC_{50} against *Trichoplusia ni* ($0.133 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), followed by the formulation F1-5, composed of 4% pectin and 2% of corn flour, showing better activity than the commercial product [®]Dipel 2X, however, when these formulations were applied against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa zea*, presented less toxic activity than [®]Dipel 2X. The formulations prepared with the YUC-3 strain (F1-3 and F2-3) showed that the toxic activity against *T. ni* was significantly equal to the [®]Dipel 2X, for the F2-3 formulation, whereas for the F1-3 formulation it was less. When the above formulations (F1-3 and F2-3) were tested against *Spodoptera exigua*, the activity of both formulations was significantly higher than the commercial product [®]Dipel 2X. The formulations F1-M21 and F2-M21, prepared with the strain M2-1 when tested against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa zea*, did not exceed the activity of the commercial product [®]Dipel 2X, but instead the formulated F2-M21 presented significantly similar LC_{50} against *Trichoplusia ni* compared to the commercial product [®]Dipel 2X and lower LC_{50} than the F1-M21. After 90 days storage at 20-35° C and 80% relative humidity, the formulations maintained their toxic activity without significant loss. When the insecticidal extracts unformulated were irradiated with ultraviolet light during 72 hours showed reductions of 59-87.4% in neonatal larval mortality, contrary to that presented by the irradiated formulations that showed the lowest reductions (3.9-12.5 %) on larval mortality compared to non-irradiated formulations.

The polyacrylamide gel electrophoresis of spore and crystal suspensions showed that the YUC-3, YUC-5 and M2-1 strains had a protein pattern similar to that reported for *Bacillus thuringiensis* serov. *kurstaki*, with well-defined 130 and 70 kDa proteins. PCR analysis of the YUC-3, YUC-5 and M2-1 strains reveals the presence of amplified fragments characteristic of the Cry genes compared to a plasmid pattern similar to the HD-1 strain. The Cry genes found in the 1% agarose gel correspond to the genes Cry 1 and Cry 2, of the native strains YUC-3, YUC-5 and M2-1. These strains lack the production of β -exotoxin.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día el aumento de resistencia a los insecticidas por parte de los insectos, la conciencia del problema de contaminación ambiental y el alto costo de nuevos insecticidas químicos hacen evidente que el control de insectos no pueda depender durante más tiempo del uso exclusivo de estos productos, lo que ha propiciado la utilización de métodos alternativos como el control biológico.

Por otro lado, las hortalizas son de los pocos productos que mantienen una balanza comercial positiva dentro del sector rural ya que el volumen exportado fue 4.1 veces mayor que el importado desde 1961 a 2010, convirtiendo al país como el principal proveedor de Estados Unidos y futuro posible comercio con otros países, de igual manera la actividad hortícola de México aporta el 16% del valor de la producción agrícola, presenta tasas de crecimiento promedio anuales positivas actualmente y la superficie cultivada ha crecido 2.0%, mientras que el valor de la producción a términos nominales aumentó a 27.4%, lo anterior lo caracteriza como un segmento con un fuerte dinamismo y grandes expectativas para el desarrollo agrícola del país (FAO; FAOSTAT, SAGARPA; SIACON. 2012).

Bacillus thuringiensis se ha utilizado durante más de un siglo como una opción importante en el control biológico de algunos insectos plaga, incluyendo la generación de plantas transgénicas. Es muy específico contra insectos susceptibles y es inocuo para la entomofauna asociada y no deja residuos en el ambiente. Tiene actividad hacia insectos del orden Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Hymenoptera, Hemiptera, Neuroptera, Arachnida, Phthiraptera, Nematelminos y Platelminos (van Frankenhuyzen, 2009, Schnepf *et al.*, 1998). La actividad tóxica de la bacteria es debida al efecto de proteínas denominadas Cry (Soberón *et al.*, 2010, Pigott & Ellar, 2007). Muchos genes *cry* han sido expresados en plantas de maíz, algodón y arroz entre otros cultivos, confirmando resistencia hacia plagas de insectos (Sanahuja *et al.*, 2011). La actividad biológica de la bacteria se ha podido constatar sobre especies de lepidópteros como *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Manduca sexta*, *Trichoplusia ni*, *Ostrinia nubilalis*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* y *Bombyx mori*, entre otros (van Frankenhuyzen, 2009, Schnepf *et al.*, 1998). Aunque los tiempos de permanencia de las proteínas Cry en el ambiente son muy cortos y la presión de selección es baja, desde 1987 aparecieron los primeros reportes

de resistencia a las toxinas cry. Con las nuevas variedades transgénicas de maíz y algodón al igual que en el caso de los plaguicidas químicos, estamos observando la evolución de la resistencia (Tabashnik, 2008).

Por ello, es importante continuar con la búsqueda de nuevas toxinas que reconozcan diferentes receptores proteínicos en los insectos blanco, de manera que la resistencia a una toxina Cry por mutaciones en un receptor específico se pueda evitar con la aplicación de otra toxina Cry que reconozca otros receptores en el insecto (Kranthi, 1992), lo que proporcionaría nuevas alternativas para el control de las diversas plagas y quizás contribuiría a solucionar el problema del desarrollo de resistencia por parte de los insectos (Bravo *et al.*, 1998). Por lo que en nuestra investigación tratamos de aislar y caracterizar nuevas cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* quizás con nuevo espectro insecticida contra diversos insectos plaga de importancia agrícola como; *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, así como comparar la toxicidad contra las cepas de referencia HD-1, GM.7, IB-7 e IB-62, determinando algunas de sus características morfológicas, perfil de plásmidos, caracterización de proteínas y genes Cry, así como su producción en medio de cultivo usando ingredientes solubles como el Jarabe de Maíz, Líquido de Remojo de Maíz y Semilla de Girasol teniendo como referencia el medio melaza y harina de soya, que se ha utilizado desde mucho tiempo atrás; y observar y comprobar la toxicidad de los cristales formados en estos nuevos medios, así como la formulación con polímeros naturales de las cepas nativas más tóxicas para incrementar su persistencia y actividad tóxica y su evaluación a nivel de laboratorio.

2. ANTECEDENTES

2.1 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico puede definirse como el control de plagas por el uso directo o indirecto de enemigos naturales, depredadores y patógenos; es el uso de poblaciones de un organismo para controlar a otro. Se ha demostrado que el uso de bacterias esporógenas es muy efectivo para el control de insectos plaga debido a su alto grado de actividad letal que presentan; la más estudiada y efectiva es *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria Gram positiva produce toxinas altamente específicas contra insectos incluyendo lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros y de otras clases como nemátodos, protozoarios y ácaros (Bravo *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 2006).

2.2 BACILLUS THURINGIENSIS

El género *Bacillus* miembro de la División Firmicutes cuenta con una gran diversidad de especies, de las cuales actualmente se conocen 156 mismas que presentan similitudes morfológicas y bioquímicas y un alto grado de variabilidad genética (Carlson, 1994). *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, flagelada, aerobia estricta, cuya síntesis de cristal proteico demuestra toxicidad contra insectos y otros invertebrados (Schnepf *et al.*, 1998). Frecuentemente las cepas de *Bacillus thuringiensis* son aisladas de muestras de suelo (Meadows, 1993), larvas de insectos enfermos (Kaelin *et al.*, 1994), de productos almacenados (Karamanlidou *et al.*, 1991) y hojas de árboles (Meadows *et al.*, 1992) utilizando técnicas simples con medio selectivo y análisis morfológico. La toxicidad puede variar significativamente de acuerdo al polimorfismo, incrementando o decreciendo la eficiencia y la especificidad hacia el organismo blanco (Bravo y Soberón, 2003, Melo *et al.*, 2013).

Debido a su importancia económica e industrial, existen grandes colecciones de cepas de *Bacillus thuringiensis*, siendo más de 50,000 las cepas estudiadas, distribuidas entre colecciones públicas y privadas (Ibarra, 2003). Por esto se han realizado grandes esfuerzos para la caracterización y agrupamiento de las diferentes cepas y clonas de *Bacillus thuringiensis*, entre las que más destacan: serotipo flagelar y similitud de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cry. De acuerdo a las proteínas presentes en el

flagelo se han caracterizado 69 serotipos y 82 serovariedades (Huerta *et al.*, 2012), mientras que en función de la secuencia de los genes Cry, se han determinado 74 clases (Crickmore, 2017). A la fecha se encuentran 789 toxinas Cry clasificadas (Crickmore, 2017). 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, β -exotoxinas las cuales; 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 espora-cristal mata mucho más eficiente que los cristales solos (Bravo y Soberón, 2003).

2.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos: primero, la ingestión por la boca de los insectos susceptibles, solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, unión al receptor, inserción a la membrana, agregación, formación de poro y citólisis. En la figura 1 se muestra un esquema donde se presentan los diferentes eventos en el modo de acción de las proteínas Cry (Alyahyae y Ellar, 1995).

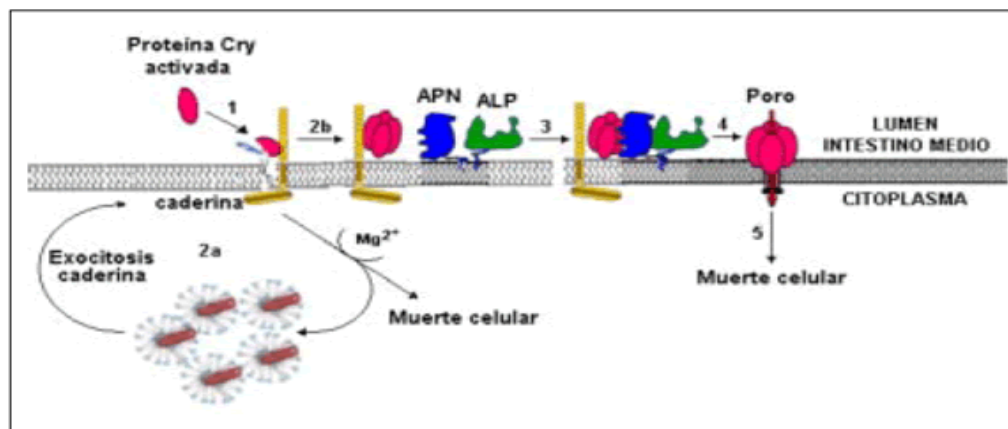


Figura 1. Modo de acción de las proteínas Cry: 1) Unión de la toxina a caderina y clivaje desde su extremo C-terminal para generar la forma monomérica activa; 2a) inicio de la cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} , estimulación de exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical y consiguiente muerte celular; 2b) formación de la estructura oligomérica pre-poro; 3) unión del oligómero a la

aminopeptidasa N (APN) y/o fosfatasa alcalina (ALP) y migración a zonas específicas de la membrana; 4) formación del poro; 5) desequilibrio osmótico y consiguiente muerte celular.

Los signos observados a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis* son el cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y la muerte (Gómez *et al.*, 2007). Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño (Bravo *et al.*, 2011). Esto causa a su vez que se colapse la diferencia del potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma (Carroll y Ellar, 1993). Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que mantiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células se destruyen, las esporas de *Bacillus thuringiensis* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que proliferan (Schwartz *et al.*, 1997). La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia (Soberón y Bravo, 2003).

2.4 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

La búsqueda y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* es un proyecto de interés mundial, ya que el conocimiento, proporciona nuevas alternativas para el control de las diversas plagas y quizá, contribuirá a solucionar el problema del desarrollo de resistencia por parte del insecto (Caballero y Ferré, 2000); además de proveer una valiosa herramienta para la búsqueda de metabolitos con potencial biotecnológico e información de los patrones de distribución ecológica (Moreno, 2007). Los requerimientos normativos para registro y uso experimental como plaguicidas microbianos incluyen: análisis del producto, análisis de residuos, toxicología, efectos ecológicos y destino ambiental (Betz *et al.*, 1990).

Los datos requeridos que ha implementado la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (US-EPA, 1988) para el registro de cepas de *Bacillus thuringiensis* incluyen:

1. Datos morfológicos y bioquímicos

2. Análisis del serotipo
3. Historia de la cepa
4. Patrón de resistencia a antibióticos
5. Descripción de las toxinas insecticidas producidas
6. Perfil de plásmidos
7. Descripción morfológica de la proteína cristalina
8. Bioensayo para diversos tipos de insectos
9. Pruebas de toxicidad intraperitoneal en ratón para la β -exotoxina.

2.5 UTILIZACIÓN COMO CONTROL BIOLÓGICO

La utilización de *Bacillus thuringiensis* se ha incrementado en los últimos 10 años a pesar de haber sido comercializado hace más de 40 años, las toxinas de *Bacillus thuringiensis* se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura principalmente en cultivos de hortalizas y cereales, esto es gracias a la demanda de plaguicidas menos tóxicos para el medio ambiente y la demanda de productos con mayor efectividad para el control de insectos resistentes a diferentes químicos (De Luna, 2002). Además, se estima que el 2% del mercado mundial de pesticidas es satisfecho con biopesticidas en el que *Bacillus thuringiensis* domina el 95% de las ventas (Tabashnik y Carrière, 2004).

2.6 FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE LA δ -ENDOTOXINA.

El estrecho rango de huésped ocasiona que no se cuente con toxinas para cada plaga que afecta la actividad humana. Por lo tanto, los tiempos y forma de aplicación deben ser cuidadosamente seleccionados (Barrows *et al.*, 2007). 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 (Barrows *et al.*, 2007). La corta o breve persistencia de los patógenos sobre el follaje es frecuentemente un factor limitante en el control de las poblaciones de insectos. Otro de los problemas relacionados con la forma de incrementar la residualidad de *Bacillus thuringiensis* es evitar el daño que le causan los rayos solares (UV), ya que diferentes estudios revelaron que la exposición por cortos períodos (<24 horas) a longitudes de onda

menores de 500 nm, inactiva esporas, puede inactivar la toxina cristalina de *Bacillus thuringiensis* y degrada estructuras proteicas virales (Ignoffo y Batzer, 1971). Diversos estudios han demostrado que el uso de protectores en las formulaciones como el rojo Congo, ácido fólico y verde malaquita mantienen la actividad tóxica de *Bacillus thuringiensis* a la exposición de luz U.V. (Dunkle y Shasha, 1989, Bohm y Friend, 1988). Un incremento en la palatabilidad de *Bacillus thuringiensis* puede reducir la variabilidad y mejorar el nivel de control de las plagas blanco. Se ha demostrado que *Ostrinia nubilalis* prefiere alimentarse de almidón y Coax, un fagoestimulante comercial (McGuire *et al.*, 1994). La actividad residual de las formulaciones a base de *Bacillus thuringiensis*, dependerá de los días secos y lluviosos de la aplicación del producto bioinsecticida. De esta manera, McGuire *et al.*, 1994, compararon una formulación a base de almidón de maíz y un producto comercial contra *Ostrinia nubilalis* (Hübner) reportando que en los años secos no existe diferencia significativa en cuanto a actividad residual entre ambos productos sin embargo; en los períodos de lluvia la actividad disminuye significativamente en el producto comercial con respecto a la formulación con almidón de maíz. Lo que indica que el lavado por lluvia es la causa principal de pérdida de toxicidad del producto comercial.

2.7 MEDIOS DE PRODUCCIÓN

La producción de bioinsecticidas requiere del diseño de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento, esporulación y formación de la δ -endotoxina, satisfaciendo el suministro de una fuente de Carbono adecuada, una fuente de Nitrógeno y requerimientos minerales. La habilidad que presenta *Bacillus thuringiensis* para producir toxinas varía de una cepa a otra y la actividad presentada también depende de las condiciones del medio de cultivo (Dulmage, 1977). Como fuentes nitrogenadas se utilizan harinas de soya, maíz, trigo, pescado y leguminosas entre otras; mientras que como fuentes de carbono se emplean principalmente melazas, almidones, fructuosa, glucosa, maltosa, ribosa, glicerol, glutamato y aminoácidos (Fernández *et al.*, 2002). En cuanto a los minerales mencionan cinco iones particularmente importantes en el crecimiento y esporulación de *Bacillus*: Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} y Ca^{++} , los cuales son convenientes agregar a los medios en cantidades en g/L:

MgSO₄·7H₂O, 0.3, MnSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O y ZnSO₄·7H₂O, 0.02 y CaCO₃, 1.0 (Vandekar y Dulmage, 1983).

En muchos países se desarrollan programas de prospección de nuevos aislamientos de la bacteria para ampliar su espectro y aumentar su capacidad insecticida. Carreras Solís (2005) utilizó dos medios de cultivos para la producción de cepas de *Bacillus thuringiensis* (LBT-7, LBT-40, LBT-48, LBT-52, LBT-53 y HD-1), el medio LB y el medio GTE (Glucosa-Triptona-Extracto de levadura) encontrando diferencia significativa en la producción de proteínas Cry de cada cepa de *Bacillus thuringiensis* y del estándar HD-1. Otros autores, Swiecicka *et al.*, (2008) utilizaron 50 mL de caldo de leche peptonizado (1% caldo de leche peptonizado, 1% dextrosa, 0.2% extracto de levadura, 1.2 mM MgSO₄, 0.07 mM FeSO₄, 0.14 mM ZnSO₄, 0.12 mM MnSO₄) en matraces de 250 mL a 250 rpm para que la cepa de *Bacillus thuringiensis* IS5056 tuviera su mayor producción de bacilos esporulados a las 48 horas y sintetizaran una proteína de ≈ 130 kDa. La cepa IS5056 producida en este medio de cultivo presentó CL₅₀ de 16.9 $\mu\text{g/mL}$ contra el segundo instar de *Trichoplusia ni.* de igual manera, Flores *et al.*, 2011 utilizaron el medio de caldo de leche peptonizado para la producción de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, encontrando que la morfología predominante fue la bipiramidal. En las mismas condiciones que las cepas nativas, se produjo la cepa de referencia HD-1, cuyo porcentaje de mortalidad presentado fue de 59.2% al ser aplicado a concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo las cepas nativas aisladas de suelo agrícola no superaron el 39.73% de mortalidad contra *Spodoptera frugiperda*.

Por otra parte, Salazar Magallón *et al.*, 2015, cultivó la cepa de *Bacillus thuringiensis* GP139 en medios de fermentación a base de melazas con harina de soya, Nejayote con sacarosa y suero de queso con sacarosa; los anteriores cultivo fueron adicionados con ceniza como fuente de sales minerales y como medio de referencia se utilizó el Hidrolizado de Caseína y Triptona conteniendo en g/L: 5; Bacto Triptona, 2; Casaminoácidos, 3.4; KH₂PO₄, 0.012; MgSO₄·7H₂O, 0.0003; MnSO₄·4H₂O, 0.0028; ZnSO₄·7H₂O, 0.02; Fe(SO₄)₃·7H₂O, 0.147; CaCl₂·2H₂O y 3; glucosa (Velazco-Martínez *et al.*, 1997, Vega-Baudrit *et al.*, 2008, Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2010). Las cuentas de esporas/mL obtenidas fueron de 5.9×10^8 utilizando melazas con harina de soya, 4.95×10^8 utilizando suero de queso con sacarosa, mientras que con nejayote con sacarosa y el

Hidrolizado de Caseína y Triptona se obtuvieron 2.04×10^8 y 2.71×10^8 esporas/mL, respectivamente. Al exponer los complejos espора- cristal de GP139 producidos en los medios anteriormente mencionados, contra ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio, encontró que, no existe diferencia significativa en la mortalidad entre los medios así como tampoco existe diferencia significativa comparada con un insecticida químico.

Amin *et al.*, 2008, formularon un medio para la producción de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* a partir de diferentes cantidades de glucosa y lo probaron contra *Anagasta kuehniella*, *Spodoptera littoralis* y *Sesamia cretica* donde el medio basal contenía diferentes cantidades de glucosa, en g/l, de 45, 90, 140 y 190, observándose el mejor crecimiento en la concentración de 190 gramos de glucosa, el complejo espора- cristal obtenido y probado contra los tres insectos mencionados mostró que *Spodoptera littoralis* fue el más susceptible con CL_{50} de 8.6×10^6 esporas/ml.

A nivel comercial, se busca minimizar la duración de fermentación de *Bacillus thuringiensis* sin que la producción de δ -endotoxinas se vea comprometida. El suministro de oxígeno es el parámetro decisivo para el crecimiento, esporulación y producción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Mounsef *et al.*, 2015). Algunos autores, reportan que en *Bacillus thuringiensis* H-14 el 100% de esporulación lo encontraron en ausencia de oxígeno pero producción con mayor toxicidad de la cepa fue en condiciones de excesiva aireación (Sarrafzadeh y Navarro, 2006). En su reporte, Mounsef *et al.*, 2015 con el fin de mejorar la productividad de las δ -endotoxinas mediante el uso del coeficiente volumétrico de transferencia de masa produjeron a *Bacillus thuringiensis kurstaki* en un medio compuesto de subproductos de molienda de cereales (CMB) a diferentes concentraciones, reportando que se alcanzó la mayor productividad de proteínas de toxina en el medio de cultivo de CMB al 6% con KLa de $65.5 h^{-1}$, observándose también la evolución de la célula bacteriana entre su crecimiento vegetativo, esporulación y liberación de esporas maduras mediante la variación del porcentaje de CO_2 en el gas efluente.

En los experimentos de Boniolo *et al.*, 2012 evaluaron la cinética de crecimiento, esporulación y toxicidad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mediante el análisis de cultivos discontinuos con perfiles de oxígeno disuelto (OD) de 0%, 5%, 20% o 100%

durante las fases de esporulación y lisis celular, reportando que la interrupción del suministro de oxígeno redujo fuertemente la producción de esporas y reprimió completamente la síntesis de toxinas. Pero cuando el OD se elevó al 100% de la saturación, la actividad tóxica aumenta presentando CL_{50} de 8,2 mg/L. De igual manera, estos investigadores reportaron, que con el uso de oxígeno puro en lugar del aire normal encontraron que los cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*no esporularon.

Además de lo anterior, diversos estudios llevados a cabo por Ennouri *et al.*, 2013 comprobaron la importancia relativa de las condiciones de cultivo (pH inicial, oxígeno disponible y volumen de inóculo). El tamaño y la disponibilidad de oxígeno es el ajuste más influenciante para la producción de delta endotoxinas así como el numero de esporas; mientras que el pH es el parámetro más significativo sobre la actividad proteolítica. Los rangos probados fueron pH inicial (6.5 - 7.5), Densidad óptica (0.10-0.20) a 600 nm del tamaño del inóculo y relación de oxígeno disponible (volumen de oxígeno/volumen de cultivo) de 9-39. Estos investigadores demuestran que las regresiones lineales múltiples y los parámetros de interacción, revelan que existe la interacción negativa entre el oxígeno disponible y el pH inicial, para la producción de delta-endotoxinas. Además, la interacción entre el inóculo y el pH inicial mostró un efecto positivo significativo en la actividad proteolítica de *Bacillus thuringiensis*.

Continuando con la investigación acerca de la sobreproducción de la proteína del cristal de *Bacillus thuringiensis* mediante fermentación, Khedhe *et al.*, 2014 determinaron que un suministro eficaz de oxígeno es considerado uno de los factores más importantes en la ampliación de los procesos de fermentación así como un suministro de glucosa adecuado mejora en gran medida el rendimiento de producción de toxina y la capacidad de la célula de síntesis de δ -endotoxina. Por lo tanto, investigaron en un fermentador de 3L totalmente controlado, un medio basado en glucosa para la represión catabólica de la cepa S22 de *Bacillus thuringiensis*. Durante el período de fermentación, aplicaron una saturación de oxígeno del 75%, logrando superar parcialmente la represión de catabolitos, que se producía normalmente a altas concentraciones iniciales de glucosa (30 y 40 g/L de glucosa). En el medio de cultivo con 22,5 g/L de glucosa encontraron que la producción de toxina se mejoró en aproximadamente 36% cuando se aplicó un cultivo por lote alimentado

comparado con un lote en la cepa S22 de *Bacillus thuringiensis*. Esto debería contribuir a la reducción de los costos de producción de los bioinsecticidas.

2.8 FORMULACIÓN

En el laboratorio y campo se ha demostrado la posibilidad de que el insecto desarrolle resistencia al uso continuado de *Bacillus thuringiensis*, a las delta endotoxinas, resistencia se explica por vía bioquímica, fisiológica y de conducta. En el primer caso, el insecto llega a metabolizar las toxinas, en el segundo parece existir una disminución de sensibilidad en los receptores y en el tercero disminuye la habilidad del insecto para aceptar el insecticida. Se han desarrollado diferentes estrategias para disminuir la posible resistencia a esta bacteria. Una de las más utilizadas es su uso en programas de manejo integrado. Otra estrategia es el uso de productos a partir de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*, con diferentes tipos de delta endotoxinas (Fernández *et al.*, 2002).

Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta para la eficiencia en el campo de los insecticidas microbianos, es su formulación, donde se incluyen diversas sustancias como dispersantes, fagoestimulantes y coadyuvantes. En toda formulación independientemente de su uso final, se distinguen tres clases de componentes: Principio activo, Disolvente o Diluyentes y Coadyuvantes.

El principal objetivo de una formulación es proveer la combinación correcta de ingredientes de tal manera que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto seguro, efectivo, fácil de aplicar, con una larga vida de anaquel, así como extender su viabilidad en el ambiente (Couch e Ignoffo, 1981; Connick *et al.*, 1989; Rhodes *et al.*, 1990). En años recientes, diversos investigadores han utilizado polímeros naturales como Morales Ramos *et al.*, (2000) en donde determinaron que las formulaciones utilizando pectina o almidón produjeron al menos 94% de mortalidad larval contra *Spodoptera frugiperda* (Smith) y 72% de mortalidad al utilizar gelatina. En la Tabla 1, se describen los aditivos y adyuvantes así como sus funciones y ejemplos de cada uno de ellos para llevar a cabo una formulación (Satinder *et al.*, 2006).

Tabla 1. Los diferentes tipos de adyuvantes/ aditivos usados en formulaciones microbianas.

Adyuvante/aditivo	Función	Ejemplo	Referencia
Dispersante	Dispersión de la formulación en el medio dispersante	Amilosa, aluminio, silicato, glicolato sódico de almidón	Prabakaran <i>et al.</i> , 2001
Agentes tensioactivos y humectantes	Mejora la emulsión, dispersión, pegado o humectación del biopesticida.	Ethoxilatos (Tween/Triton series), polietileno glicol	Lisansky <i>et al.</i> 1993
Espaciadores y pegadores	La adhesión de los plaguicidas sobre el follaje, proteger del lavado de la lluvia y la difusión de manera uniforme para una máxima cobertura	Gelatina, gomas, melazas, Leche desnatada, geles vegetales, aceites vegetales, ceras, polímeros solubles en agua.	Parekh <i>et al.</i> , 2000 Cross <i>et al.</i> , 1996 Behle <i>et al.</i> , 1999 Farrar Jr <i>et al.</i> , 1995 Jankevica <i>et al.</i> , 1997 Tamez-Guerra <i>et al.</i> , 1999
Agentes de control de desviación/anti-evaporantes/humectante	Reducir la pulverización, incluyéndolos causados por el vehículo que lleva el equipo de aspersión y el control de la espuma mientras se mezcla	Poliacrilamidas, polisacáridos y cierto tipo de gomas, sorbitol, melazas, glicerol, polietileno glicol.	Behle <i>et al.</i> , 1996 Smirnoff <i>et al.</i> , 1983 Shasha <i>et al.</i> , 1998 Carr <i>et al.</i> , 1993 Morris <i>et al.</i> , 1994
Agentes espesantes	Modificar la viscosidad de las soluciones de pulverización y reducir la deriva	Polímeros humectables, hidroxietil celulosa y gomas de polisacáridos	Couch <i>et al.</i> , 1981 Angus <i>et al.</i> , 1954 Morris <i>et al.</i> , 1994
Buffers de pH	Mejorar la dispersión o solubilización en la formulación, controlar su estado iónico y aumentar la compatibilidad adyuvante	Fosfato sódico, fosfato de potasio	Prabakaran <i>et al.</i> , 2001 McMullan, 2000 Montermini <i>et al.</i> , 1993
Agentes antiespumante	Reducir la tensión superficial, reventar las burbujas de aire físicamente y debilitar la estructura de espuma	Dimetopolisiloxano, Silica, alcohol y aceites.	Dunkle <i>et al.</i> , 1988 Ejiofor <i>et al.</i> , 1991
Anti-Radiación UV	Proteger de la degradación solar de la formulación	Rojo congo, ácido fólico, lignina, melazas, Ácido p-aminobenzoico, fenoles de alquilo.	Behle <i>et al.</i> , 1997 Taborsky V., 1992 Yang <i>et al.</i> , 1995 Smith <i>et al.</i> , 1998 Lebo Jr. <i>et al.</i> , 1996 Bohm <i>et al.</i> , 1990 McGuire <i>et al.</i> , 1991
Fagoestimulante	Estimular la alimentación de las formulaciones por las plagas	Harina de maíz, sacarosa, germen de trigo, germen de maíz, harina de soya, caseína, aceite comestible, glutamato, melaza	McGuire <i>et al.</i> , 1990. McGuire <i>et al.</i> , 1994 McGuire <i>et al.</i> , 1991 Shapiro <i>et al.</i> , 1995 Munson <i>et al.</i> , 1996 Alexander <i>et al.</i> , 1992
Sinergistas	Complementa otros componentes de formulación	Sorbitol, ácido sórbico, fosfato de sodio, estilbeno, tinopal, silicato, inhibidores de	Berto <i>et al.</i> , 2002

		proteasas, ácido oléico, ácido linoléico.	
Agentes antimicrobianos	Suprime el crecimiento de otros microorganismos y mantiene el formulado puro	Ácido sórbico, propiónico, cristal violeta.	Teera-Arunsiri <i>et al.</i> , 2003
Acarreadores	Ayuda en la entrega de la formulación a la plaga blanco.	Alginato, carragenina, acrilato y acrilamida, tierra de diatomeas.	Yardin <i>et al.</i> , 2000
Enlazadores	Unión de partículas en gránulos.	Gomas, melazas, resinas.	Teera-Arunsiri <i>et al.</i> , 2003
Agentes de suspensión	Mantiene la formulación en suspensión	Sorbitol, soya, polisacáridos, Glicolato de almidón, sucrosa.	www.dropdata.net/download/PestiSci_L3_6.PDF , 2004
Atrayentes	Actúa como cebos para atraer a las plagas	Feromonas, cucurbitacina y varios alcaloides, plastisol, aceite de semilla de algodón.	Losel <i>et al.</i> , 1998
Multiuso	Realiza varias funciones al mismo tiempo	Melaza, almidón, lignina.	Shasha <i>et al.</i> , 1998

La selección del adyuvante o aditivo a utilizar será determinado por el tipo de formulación deseada. La formulación estará ajustada a las variaciones del hábitat (follaje, suelo, agua, tamaño), patógeno (tipo, características, mecanismo de regeneración), viscosidad de la materia y tamaño de partícula, modo de acción (oral o contacto), interacción hospedero/patógeno/medio ambiente (resistencia), modo y rango de aplicación (L/Ha y Kg/Ha) según Satinder *et al.*, 2006.

Estas formulaciones brindan una alternativa eficaz al control químicos para el control de plagas que han desarrollado aumento de resistencia por parte de estos insectos, junto con la conciencia del problema de contaminación ambiental, el alto costo de nuevos insecticidas químicos, la reducción de insectos benéficos y el resurgimiento de plagas (Lasa *et al.*, 2009) hacen evidente que el control de insectos no puede depender durante más tiempo del uso exclusivo de los productos químicos, propiciando la utilización de métodos alternativos como el control biológico.

Un insecticida puede introducirse en el mercado en varias formas, dependiendo del ambiente del insecto que va a ser controlado y/o el método de aplicación preferido. Los tipos más comunes son los siguientes: Formulaciones granuladas, Polvos, Polvos Humectables, Líquidos emulsionables, Sistemas de liberación controlada. Las formas secas son más estables durante su almacenamiento, mientras que las líquidas resultan más

económicas (Fernández *et al.*, 2002). En la actualidad una variedad de insecticidas microbianos están disponibles comercialmente para el control de una amplia variedad de plagas agrícolas, forestales y vectores de enfermedades (Tabla 2) (Satinder *et al.*, 2006).

Tabla 2. Formulaciones de *Bacillus thuringiensis* productos y su uso disponibles comercialmente.

Industria/Compañía	Producto	Formulación	Plaga a controlar
Ciba-Geigy	Agree*	Polvo humectable	Lepidópteros, Agricultura.
AFA Enviroment Inc.	Aquabact II XT**	Suspensión líquida	Mosquitos.
AFA Enviroment Inc.	Aquabact 200G ** (10/14)	Gránulos	Mosquitos.
Solvay/Duphar	Bactucide-P*	Polvo humectable	Lepidópteros, Salud pública, agricultura, Forestal.
AEF Global Inc.	Bioprotect*	Suspensión acuosa	Polillagitana; gusano del abetooriental; gusano del abetooccidental; oruga delpino; oruga de la tiendade los bosques;gusano delolmo.
Laboratorios Abbott	Delfin*	Microgránulos dispersables en agua	Lepidópteros, Agricultura, Jardinería.
ValentBiosciences Corporation	Dipel WP*	Polvo humectable	Polilla gitana, falso medidor de la col.
ValentBiosciences Corporation	Dipel 2X DF*	Gránulos humectables	gusano del abeto; polilla gitana; gusano delolmo; orugatienda; falso medidor de la col; enrollador de la hojay lapolilla dorso diamante.
Laboratorios Abbott	Dipel 4L*	Suspensión emulsionable	Lepidópteros, Agricultura, invernadero.
Laboratorios Abbott	Dipel 6L*	Suspensión emulsionable	Lepidópteros, Horticultura, Forestal.
Laboratorios Abbott	Dipel 6AF*	Acuosa asperjable	Lepidópteros, Horticultura, Agricultura.
Laboratorio Abbott	Dipel 176*	Suspensión emulsionable	Orugas tienda; gusanos de las yemasde abeto, polillagitana.
ValentBiosciences Corporation	Foray 76B*	Concentrado acuoso	Agricultura, Forestal, Campo de golf.

Novo	Novo Biobit 32B4*	Concentrado asperjable	Agricultura, Forestal, Protección de cultivos, lepidópteros.
ValentBiosciences Corporation	Novodor***	Concentrado acuoso	Escarabajo de la hoja del olmo y papa del colorado.
Woodstream Canada Corporation	Safer's BTK	Concentrado líquido	Polilla gitana, gusano tienda, falso medidor de la col.
Zoecon/Sandoz	Teknar**	Granulado	Mosquitos.
ValentBiosciences Corporation	Teknar HP-D**	Suspensión acuosa	Mosquitos y mosca negra.
Certis USA LLC	Thuricide-HPC	Concentrado acuoso	Polilla gitana, falso medidor de la col.
ValentBiosciences Corporation	Thuricide 48LV*	Suspensión líquida	Lepidópteros, forestal.
Zoecon/Sandoz	Trident***	Concentrado acuoso	Coleópteros.
ValentBiosciences Corporation	Vectobac-200G**	Granulado	Mosquitos .
ValentBiosciences Corporation	Vectobact 600L	Suspensión acuosa	Moscas de los hongos.

* *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

** *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

*** *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*

2.9 MICROENCAPSULACIÓN

La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo. En el caso de sabores y aromas, varios métodos han sido desarrollados para encapsularlos y utilizarlos en la industria de alimentos; el secado por aspersión es el que más se utiliza; debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales, equipos como el Spraydryer realizan este tipo de secado (Yáñez *et al.*, 2002).

En el trabajo realizado por Castro-Franco (1994), con *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (GM-10), formulado con extracto de *Agave lechuguilla*, para el control de *Spodoptera frugiperda*, probó tres fotoprotectores, rojo Congo, verde de malaquita y carbón vegetal, a una concentración de 0.05% cada uno; después de la exposición a la luz ultravioleta encontró que los formulados preparados con verde de malaquita produjeron un 78.4% de mortalidad, aquellos con rojo Congo 70.2 y los de carbón vegetal 45.8, contra las

larvas de *Spodoptera frugiperda*, estadísticamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Duncan, por lo que el más efectivo fue el verde de malaquita, ya que perdió sólo un 22% de la actividad original.

Diversas investigaciones se han enfocado en la elaboración de diferentes formulaciones de bioinsecticidas utilizando diversas matrices poliméricas así como la utilización de equipos de secado más eficientes. Tamez-Guerra *et al.*, (1996) utilizaron ácido láctico, ácido cítrico, harina de maíz nixtamalizada, almidón de maíz, Miragel, almidón de papa, alcohol isopropílico, azúcar y aceite de maíz para formular *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* además utilizaron como fotoprotector el verde malaquita. Para obtener formulaciones suaves, las condiciones de temperatura de entrada y salida del Spraydryer son 120-130°C y 60-90°C, respectivamente. Las formulaciones resultantes del secado por aspersión fueron probadas mediante bioensayos en dieta artificial contra *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* y *Spodoptera exigua*, sin encontrar diferencia significativa en pérdida de actividad tóxica de estas formulaciones secadas por aspersión comparadas a las formulaciones que no fueron secadas en estas condiciones, presentando CL₅₀ en mg/mL de 1.23, 8.72, 7.72 y 13.93, respectivamente en los insectos anteriormente mencionados.

Posteriormente, Tamez-Guerra *et al.*, (1999) utiliza esta técnica de secado para formular a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumomatoensis*(C-9) con polímeros naturales obteniendo CL₅₀ de 642 µg/mL contra *Epilachna varivestis* y contra *Trichoplusia ni* (Hübner) presentó CL₅₀ de 219 µg/mL. Después de 24 meses de almacenamiento, estas formulaciones presentaron 90% de su actividad original. Otro de los reportes sobre formulación de *Bacillus thuringiensis* por Tamez-Guerra *et al.*, (2000) quienes utilizaron diversos polímeros para formular más de 80 mezclas con *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* con 64,000 UI/mg, como ingrediente activo, contra larvas de *Ostrinia nubilalis*. Las formulaciones fueron preparadas variando el pH, ingredientes, tales como almidón de maíz pregelatinizado, goma, gelatina, gluten de trigo, harina de maíz pregelatinizada, harina de maíz nixtamalizada y lignato de potasio, además de azúcar, aceite y ácido láctico o cítrico, en tanto que el ingrediente activo se agregó en proporción del 10-50%; todas las formulaciones se probaron bajo condiciones de lluvia y luz solar simuladas, y posteriormente, en campo. Entre los resultados más importantes encontrados tenemos que

dos formulaciones, hechas con harina de maíz o lignina+harina de maíz pregelatinizada (PCF) mataron el 51.6 y 75.3% de las larvas, después de aplicar lluvia simulada, respectivamente, contra solo 27% para Polvo técnico (Abbott Laboratories); cuando se probó la actividad insecticida de las formulaciones después de aplicación de luz solar simulada por 8 h, las realizadas a base de harina de maíz mataron el 78.5% de las larvas, mientras que la de lignina+PCF logró el 70.4%, en contraste con polvo técnico, quien causó un 29% de mortalidad. En las pruebas de campo contra *Trichoplusia ni*, aplicado sobre hojas de col, la formulación a base de PCF y lignina mostró significativamente más alta actividad residual que el Dipel 2X, 4y 7 días después de la aplicación.

Más adelante, Aroonrat *et al.*, (2003) comprobaron que las condiciones óptimas para el secado por aspersion son utilizar la temperatura de salida de 60-85°C y una temperatura de entrada de 120-180°C al secar formulaciones con mezclas de diversas sustancias, como Almidón de tapioca gelatinizado, sacarosa, leche en polvo, alcohol de polivinilo, Tween, aceite de salvado de arroz y 10% de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Estas formulaciones presentaron 55% de suspensibilidad y CL_{50} de 5.69×10^4 UFC/ml del valor contra larvas de *Spodoptera exigua*.

Algunos otros investigadores han revisado la preferencia alimenticia de los insectos plaga y con esta información, desarrollar nuevas formulaciones con mayor respuesta sobre dichos insectos como en el trabajo reportado por Rosas-Garcia *et al.*, (2009) quienes evaluaron ocho matrices a partir de ingredientes naturales y los enfrentaron con hojas de maíz frescas para seleccionar una de ellas altamente palatable a las larvas. La matriz seleccionada se combinó con la cepa de *Bacillus thuringiensis* HD-125 a tres concentraciones diferentes (30, 70 y 100 g/Kg) del complejo de esporas-cristal para elaborar tres formulaciones insecticidas. Los resultados indicaron que la mezcla de almidón de maíz modificado, gelatina porcina y mazorca de maíz seca era la más preferida por las larvas. Las formulaciones obtenidas se evaluaron en bioensayos de mortalidad con larvas neonatales de *Spodoptera exigua* en condiciones de laboratorio, utilizando dieta artificial, y en invernadero. Los porcentajes de mortalidad en condiciones de laboratorio de las formulaciones se mantuvieron en el rango de 58-68%, sin superar al producto comercial, Dipel con mortalidad de 73%; mientras que, en condiciones de invernadero la mortalidad de *Spodoptera exigua* utilizando estos formulados oscila entre los 66-71%, superando la

mortalidad del Dipel de 56%. De este modo, los resultados sugieren que la matriz seleccionada combinada con *Bacillus thuringiensis* (70 g/Kg) es la formulación más adecuada para lograr un control efectivo de *Spodoptera exigua*.

Por otra parte, en estudios realizados por De Luna-Santillana *et al.*, (2011) desarrollaron 18 matrices microencapsulantes de *Bacillus thuringiensis* preparados con gelatina, pectina y almidón de maíz adicionándole cinco fagostimulantes aditivos, espiga de maíz, mazorcas de maíz frescas, alfalfa, hojas de sorgo y repollo. Estas microencapsulaciones fueron preparadas para evaluar la preferencia de diez larvas neonatas de *Spodoptera exigua*. Los resultados mostraron que las larvas de *Spodoptera exigua* preferían matrices de gelatina, pectina y de los aditivos de polvo de col o de espiga del maíz. Los mejores agentes microencapsulantes fueron gelatina-col y gelatina-espiga de maíz, atrayendo 5.47 y 5.42 larvas, respectivamente. La gelatina fue el mejor biopolímero y los fagostimulantes de espiga de maíz y repollo obtuvieron mayor preferencias por las larvas de *Spodoptera exigua*.

Otros investigadores han reportado la preparación de formulaciones en forma de microcápsulas en un biogel, contra *Choristoneura rosaceana* Harris (Lepidoptera: Tortricidae), que fue diez veces más baja que el Dipel® (Byeong *et al.* 2012). García Rodríguez *et al.*, (2015) formularon la cepa HD-1 en microcápsulas de almidón de amaranto modificado por fosforilación y succinilación, donde encontraron CL_{50} de 885.4 ng/cm² contra larvas de 1er estadio de *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae). También Coté *et al.*, (2001) formularon la cepa HD-1 en microcápsulas de alginato y encontraron baja toxicidad contra *C. rosaceana* que fue atribuida a la baja concentración de ingrediente activo agregada (3.5 µg/cm²) y a la biodisponibilidad del HD-1 en el intestino de las larvas.

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día el aumento de resistencia a los insecticidas por parte de los insectos, la conciencia del problema de contaminación ambiental y el alto costo de nuevos insecticidas químicos hacen evidente que el control de insectos no pueda depender durante más tiempo del uso exclusivo de estos productos, lo que ha propiciado la utilización de métodos alternativos como el control biológico. Actualmente, para impulsar el desarrollo de plaguicidas biológicos de *Bacillus thuringiensis* las investigaciones se basan en buscar nuevas cepas que presenten quizá mayor potencial tóxico contra diversos organismos plaga. Por ello, pretendemos aislar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y caracterizarlas, para establecer una colección de nuevas cepas que puedan sintetizar tal vez nuevas proteínas insecticidas para plagas de lepidópteros y en un futuro utilizarse en el control de plagas de importancia agrícola, ya que existen posibilidades de que presenten propiedades tóxicas superiores a las existentes permitiendo su uso comercial.

4. HIPÓTESIS

Es posible el aislamiento de nuevas cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de lugares no explorados de nuestro país que presenten alta actividad insecticida contra insectos lepidópteros (*Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*) mayores a las existentes.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, de lugares no explorados de nuestro país que puedan presentar una mayor actividad insecticida contra larvas de insectos lepidópteros (*Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*).

5.2 Objetivos particulares

5.21 Aislamiento de nuevas cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* de Yucatán y Chiapas

5.22 Fermentación de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para la producción de espora-cristal a nivel de matraz Erlenmeyer de 500 ml en medio de referencia (melaza y harina de soya).

5.23 Evaluación de la actividad insecticida de los extractos producidos por las cepas aisladas mediante bioensayos contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, usando dietas artificiales.

5.24 Selección de los aislados más tóxicos mediante análisis de varianza.

5.25 Comparación de la actividad insecticida de las cepas aisladas con las cepas de referencia GM-7, IB-7, IB-62 y HD-1 cultivadas en los mismos medios.

5.26 Diseño y elaboración de un medio de cultivo con ingredientes solubles de las fuentes de Carbono y Nitrógeno.

5.27 Fermentación y evaluación de las cepas nativas más tóxicas cultivadas en los nuevos medios diseñados.

5.28 Diseño y elaboración de una formulación con las cepas nativas más tóxicas usando ingredientes biodegradables.

5.29 Comparación de los formulados preparados con las cepas nativas mas tóxicas contra el formulado comercial, Dipel® 2X.

5.30 Efecto de almacenamiento de los formulados preparados con cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

5.31 Determinación del perfil de proteínas del cristal de las cepas nativas más tóxicas

5.32 Determinación del perfil de plásmidos de las cepas nativas más tóxicas.

5.33 Detección de β exotoxina de las cepas nativas más tóxicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS.

Para los aislamientos se tomó 1 gramo de cada una de las muestras de suelo colectadas de los estados de Yucatán y Chiapas con las cuales se realizaron suspensiones en agua estéril y posteriormente se sometieron a una temperatura de 80°C, por 10 minutos, enseguida se sembraron alícuotas en placas de Agar Nutritivo (Merck), se incubaron a 30°C por 48 horas, de las colonias resultantes se realizaron frotis utilizando cristal violeta al 2% (Saleh *et al.*, 1970) para teñir. Las cepas de referencia, HD-1, GM-7, IB-7 e IB-62, fueron proporcionadas por el Instituto de Biotecnología (FCB-UANL).

6.2 MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.

Las cepas formadoras de cristal se mantuvieron por medio de resiembras sucesivas trimestrales en Agar Nutritivo y para su conservación a largo plazo se utilizaron viales con tirillas de papel filtro estéril donde se colocó una suspensión concentrada de esporas (10^8 /mL) y se secaron a 30° C por una semana y para finalmente almacenarlas en cajas.

6.3 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS.

Las cepas nativas y de referencia de *Bacillus thuringiensis* fueron activadas en tubos con agar nutritivo inclinado a pH 7.0 e incubadas a 30°C por 24 hrs, posteriormente, se inocularon dos asadas de cada una de las cepas activadas en 100 ml de medio melaza y harina de soya (Medio de referencia), se incubaron en agitación a 200 rpm y 30°C por 72 hrs. El fin de la fermentación se determinó al encontrar 80% a 100% de esporulación en los cultivos.

En la siguiente Tabla 3 se muestra la composición del medio de cultivo utilizado.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la producción de δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* por cepas nativas y de referencia.

Ingredientes	g / l
Melaza	10
Líquido de remojo de maíz (CP Ingredientes, SA de CV)	10
Harina de Soya	10
CaCO ₃	1.0
MgSO ₄	0.3
ZnSO ₄	0.02
FeSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.02
pH	7.0±0.1

En esta investigación se utilizó además un medio de cultivo nuevo que no se ha reportado con ingredientes solubles como el Jarabe de Maíz (Industrializadora de Maíz, SA de CV) para sustituir la melaza, como fuente de Carbono en concentraciones del 1-5%, como fuente de Nitrógeno se utilizó polvo de remojo de maíz (CP Ingredientes SA de CV) en concentraciones 0.5-2%.

Además se probó un medio con extracto de semilla de girasol soluble (Jaronski y Axtell, 1984) que es rico en proteínas y pudiera así mejorar la producción y se agregó también como semilla molida en concentraciones del 1% al 2.5%.

Tabla 4. Composición del nuevo medio de cultivo con ingredientes solubles para la producción de δ -endotoxina de cepas nativas y de referencia *Bacillus thuringiensis*.

Ingredientes	g / L
Jarabe Maíz	20
Polvo de remojo de maíz (CP Ingredientes, SA de CV)	20
Harina de Girasol	15
CaCO ₃	1.0
MgSO ₄	0.3
ZnSO ₄	0.02
FeSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.02
pH	7.0±0.1

6.4 RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.

La extracción de la espora y del cristal del medio de fermentación se realizó mediante la técnica de coprecipitación con lactosa y acetona (Dulmage, 1970). El producto obtenido se dejó secar y fue triturado en mortero, se pesó el extracto final seco y se etiquetó y almacenó en frascos herméticos hasta ser utilizado.

6.5 BIOENSAYOS.

Se prepararon soluciones stock de cada uno de los extractos insecticida de las cepas aisladas y de referencia a partir de 50 mg del complejo espora-cristal y se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se agitaron en un vórtex por dos minutos y de dicha solución stock se tomaron los mL o μl correspondientes para preparar soluciones de concentraciones de 500, 50 y $5\mu\text{g/mL}$. De estas concentraciones del complejo espora-cristal se tomaron las cantidades correspondientes en μl para esparcir sobre la superficie de placas de microtítulo conteniendo 1 mL de la dieta Shorey (Shorey *et al.*, 1965), para tener las concentraciones de 50, 5 y $0.5\ \mu\text{g/cm}^2$. Posteriormente la suspensión adicionada se dejó secar completamente, se transfirió una larva neonata de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* a cada pozo de la placa, se le colocó un pedazo de papel y se cubrió con su correspondiente tapa, se dejaron expuestas a temperatura de 30°C y 80% Humedad relativa durante tres días. Se prepararon 3 placas con 24 larvas /concentración para cada especie de larva y para el testigo no tratado (sin toxina). Cada uno de los bioensayos se realizaron 3 veces en días diferentes. Los resultados de mortalidad se registraron al tercer día post-aplicación del bioinsecticida.

6.6 SELECCIÓN DE LOS AISLADOS MÁS TÓXICOS.

Para saber si no existía variación entre los tres bioensayos realizados se efectuó un análisis de varianza de todos los bioensayos en los diferentes días para conocer el nivel de significancia y **después de esto proceder a realizar la agrupación de las replicas para la diferenciación de los aislados**. Una vez realizado esto y si los resultados indicaban que no había diferencia significativa entre los bioensayos, se agruparon las 3 replicas y se sometieron a un Análisis de Varianza, en un diseño completamente al azar, seguido de

diferenciación de medias, mediante el método de Diferencia Mínima Significativa al nivel del 0.05 en un programa computarizado elaborado por Olivares-Sáenz, (1994).

6.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀).

Los aislados más tóxicos obtenidos del análisis de varianza anterior se bioensayaron nuevamente para la determinación de la CL₅₀. Para esto se probaron 7 concentraciones (500, 400, 350, 300, 250, 200, 100 ng/cm²) a partir de una suspensión inicial de 50 µg/ml. Se incluyeron tres repeticiones de 24 larvas por cada concentración, de tal manera que se trataron 72 larvas por concentración y 24 para el testigo no tratado. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico Probit computarizado (United States Applied and Environmental Health, 1989) para la obtención de la CL₅₀. Cada bioensayo se realizó tres veces en días diferentes.

6.8 COMPARACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS CONTRA LAS CEPAS DE REFERENCIA HD-1, GM-7, IB-7 E IB-62.

Los extractos insecticidas de las cepas de referencia HD-1, GM-7, IB-7 e IB-62 fueron obtenidos de la misma manera que las cepas nativas (cultivados en los mismos medios y extraídos por el mismo método) y se realizaron bioensayos en la misma forma descrita para los aislados. Posteriormente las CL₅₀ obtenidas para cada insecto probado se sometieron a un Análisis de Varianza Unifactorial, y después las medias se compararon mediante el método de Tukey al nivel del 0.05.

6.9 FORMULACIÓN.

Como ingrediente activo se utilizó un 10% del complejo espora-cristal de la cepa nativa más tóxica de *Bacillus thuringiensis* y se agregaron diferentes sustancias como acarreadores y protectores de la luz ultra violeta, para obtener dos formulaciones (F1 y F2) las cuales fueron secadas por aspersión en un aparato Marca Yamato Modelo ADL 311S. Bajo las siguientes condiciones: Temperatura de entrada y salida: 150 y 60° C; respectivamente, 0.1 Megapascal de Presión y Flujo de Aire de 4 Bar. Se utilizó como formulado de referencia un producto comercial de *Bacillus thuringiensis*, Dipel[®] 2X.

Tabla 5. Composición de los formulados de *Bacillus thuringiensis* y polímeros agregados a diferentes concentraciones.

Ingredientes	Concentración	
	Formulado 1	Formulado 2
Ingrediente Activo	10%	10%
Almidón modificado	81%	81%
Pectina	4%	1%
Harina de Maíz	2%	5%
Goma Acacia	2%	2%
β -caroteno (Industrial orgánica)	1%	1%

6.9.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LOS FORMULADOS.

Para esto se pesó 1 gramo de cada formulado y posteriormente se secó en horno a 70°C durante 24 horas, hasta llevarlo a peso constante, posteriormente se restó el peso final del peso inicial y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de humedad.

6.10 EFECTO DE ALMACENAMIENTO DE LOS FORMULADOS.

Se prepararon lotes de 500 mg de cada uno de los formulados, los cuales se mantuvieron a temperatura de laboratorio (20-30°C) y se evaluó su actividad tóxica a los 0, 30, 60 y 90 días después, mediante bioensayos contra los insectos prueba. Se determinó también la humedad que presentaron, mediante secado de las muestras en horno a 70° por 24 horas y determinando la diferencia en peso.

6.11 EFECTO DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL EXTRACTO Y FORMULADOS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*.

El ingrediente activo sin formular de la cepa seleccionada y los formulados preparados se irradiaron con una lámpara de luz ultra violeta a 254 nm λ (Spectroline, Spectronics Corp.) durante 72 horas. Con los formulados irradiados así como ingrediente activo sin formular se prepararon diluciones para obtener concentraciones de 500, 50 y 5 $\mu\text{g/ml}$ para realizar bioensayos, en las mismas condiciones y contra los mismos insectos de prueba que los bioensayos anteriores. Los datos obtenidos de mortalidad tanto de

formulados e ingrediente activo irradiado y sin irradiar se compararon mediante una prueba t de Student a nivel de 0.05 para cada par de formulados irradiados y sin irradiar.

6.12 ANÁLISIS PROTEICO DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.

Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* se sembraron en caldo nutritivo hasta la lisis celular (3-4 días). La mezcla espora-cristal fue cosechada y lavada con NaCl al 1 N por centrifugación a 14,000 rpm por 1 minuto. La mezcla espora-cristal fue suspendida en solución buffer (25 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 5% de mercaptoetanol y 0.1% de azul de bromofenol) según Laemmli (1970) y fue calentada hasta su ebullición por 10 minutos. El material insoluble fue removido por centrifugación a 1000 rpm por 14 segundos, el sobrenadante se retiró a otro tubo Eppendorf. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se llevó a cabo por medio del método descrito por Laemmli (1970) utilizando 12 % de poliacrilamida; los geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.1%. La masa molecular de las proteínas fueron determinadas utilizando, albúmina de bovino (BSA) como referencia (Benintenden *et al.*, 2000; Crickmore *et al.*, 1998).

6.13 PERFIL DE PLÁSMIDOS.

Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* se sembraron en 2 mL de medio LB (Luria Bertani) por 12 horas; transcurrido este tiempo, las células fueron sometidas a centrifugación 10,000 rpm, por 10 minutos; las células recuperadas se suspendieron en 2 mL de TE 0.05 M (Tris-Base) y EDTA 0.01 M a un pH de 8.0 y centrifugadas. Los pellets fueron suspendidos en 40 µL de TE; 40 µL de la suspensión celular fue transferida a tubos Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 0.06 mL de buffer para lisis (4% SDS en TE a pH 12.4) y se incubaron a 37° C por 20 minutos hasta alcanzar la lisis total de las células; la solución se neutraliza con 30 µL de 2.0 M Tris a un pH 7.0, los tubos fueron ligeramente invertidos hasta que se observe un cambio en la viscosidad de la solución; el ADN cromosomal fue precipitado con 0.24 mL de NaCl 5 M e incubados en hielo por 4 horas. El material insoluble fue removido por centrifugación a 12,000 rpm por 1 minuto; el sobrenadante fue recogido en otro tubo Eppendorf (1.5 mL) y se le adicionó 0.55 mL de isopropanol y se incubó a -20° C por 30 minutos. El ADN fue recuperado por centrifugación a 12,000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante fue eliminado y los tubos fueron invertidos sobre toallas de

papel, los precipitados se disolvieron en 30 μ L de TES (Tris 0.05, EDTA 0.005 M, NaCl 0.005 M, pH 8.0). Para visualizar el ADN se cargó con 10 μ L de muestra con 2 μ L de amortiguador de carga (azul de bromofenol) en geles de agarosa al 1 % y se dejó correr a 100 mV por 3 horas, los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 5 minutos y se revelaron con luz ultravioleta (Ragni y Delecluse, 1996).

6.14 DETERMINACIÓN DE GENES CRY.

La extracción del ADN se hizo por el método de Fenol cloroformo (Cheng y Jiang, 2006), a partir de un cultivo en caldo nutritivo de 72 h de crecimiento, se tomó 1 ml y a partir de allí se hizo la extracción de ADN, a la cual se le determinó la concentración y la pureza por medio de cromatografía (3000-3500 ng/ μ l). Para las reacciones de PCR se utilizaron los primers descritos por Ben Dov *et al.*, (1997) y las siguientes cantidades por reacción.

Tabla 6. Reacción de la extracción de ADN.

GoTaq	μ L
Buffer 10x	10
Deoxynucleótidos(5 milimolar)	1
Primer Forward, Reverse (20 micromolar)	5
Taq (5 Unidad de enzima/microlitro)	0.4
H ₂ O Mili-Q	28.6
Volumen Total	45

Tabla 7. Información de los Primers:

Gene(s) detected	Amplicon		5' CATGATTCATGCGGCAGATAAAC (dir) [5]
	size (bp)	Annealing temp. (°C)	
cry1	277	50	5' TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT (rev) 5' GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG (dir) [5] 5' CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT (rev)
cry2	689-701	50	

6.15 PRODUCCIÓN DE LA BETA EXOTOXINA.

6.15.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

Las cepas nativas que resultaron más tóxicas contra los insectos plaga evaluados y las cepas de referencia (IB-7, IB-62, HD-1) de *Bacillus thuringiensis* fueron activadas en tubos con agar nutritivo inclinado a pH 7.0 e incubadas a 37°C por 24 hrs, posteriormente, se inocularon dos asadas de cada una de las cepas activadas en 100 ml de Caldo nutritivo y se incubaron en agitación a 150 rpm y 37°C por 18 hrs. Como control positivo se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* HD-59, la cual fue producida en las mismas condiciones que las cepas anteriormente mencionadas. La cepa HD-1 es utilizada como control negativo.

6.15.2 MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA β EXOTOXINA.

Se tomaron 2 mL a partir del inóculo de cada una de las cepas (Control y Nativas); y se transfirieron a matraces de 1000 mL con 200 mL del medio de cultivo para la producción de la toxina, el cual consiste en un medio a base de sales minerales y Casaminoácidos mostrado en la Tabla 8. Los matraces se incubaron en agitación a 150 rpm durante 48 h a 37 °C. El tiempo de incubación se determinó por observación directa al microscopio (a las 48 h inicia la fase de esporulación de los cultivos). El medio de cultivo fue centrifugado a 10 000 rpm por 30 min. en una centrífuga refrigerada (Beckman Mod. J2-2), para separar el sobrenadante del paquete celular. El sobrenadante recuperado fue esterilizado a 120°C por 15 min. y filtrado a través de membranas Millipore de 0.22 μ de tamaño de poro. Las muestras obtenidas se mantuvieron en congelación a -2°C hasta el momento de su uso.

Tabla 8. Composición del Medio de Cultivo para la producción de la β exotoxina.

Ingredientes	g / l
Casaminoácidos	10
KH ₂ PO ₄	5.0
K ₂ HPO ₄	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05
CaCl ₂ .7H ₂ O	0.05
Na(NH ₄)HPO ₄ .4H ₂ O	1.5
Citrato de sodio	3.0
pH	7.0 \pm 0.1

6.15.3 PRECIPITACIÓN CON ETANOL.

Los sobrenadantes obtenidos fueron descongelados a temperatura ambiente, se tomaron 20 mL de cada uno de estos sobrenadantes y se transfirieron a vasos de precipitados de 100 mL. Posteriormente, se concentraron diez veces el volumen original en un baño metabólico a 90°C por 20 minutos. Los concentrados se mezclaron con un volumen igual de etanol absoluto (Merck) y se mantuvieron a 4°C por 24 h para acelerar la precipitación. Después de este tiempo, el sobrenadante se decantó y se llevó a una concentración de alcohol del 60%, manteniéndose a 4°C por 24 h. Posteriormente la concentración de etanol del sobrenadante decantado fue llevada a 90%, concentración a la cual se reporta que precipita la toxina. El precipitado obtenido con esta concentración de alcohol es disuelto en agua destilada para su análisis espectrofotométrico.

6.15.4 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO.

Tomando como base el espectro de absorción característico reportado para este compuesto, el cual por su estructura química presenta una absorción máxima a 260 nm y una mínima a 230 nm, aproximadamente, se realizó un barrido del patrón de referencia de la beta exotoxina en un espectrofotómetro Mod. DU-7, Marca Beckman, utilizando como blanco de ajuste agua destilada. El espectro de absorción obtenido es usado como referencia para el análisis espectrofotométrico de los precipitados etanólicos obtenidos de los sobrenadantes. Se tomó 1 mL de cada precipitado, respectivamente, llevándose a un volumen final de 25 mL con agua destilada para obtener una dilución de 0.04 mg/ml; posteriormente se realizó el barrido de absorción en la región de 200 a 300 nm, usando agua destilada como blanco de ajuste.

7. RESULTADOS

7.1 CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*. Se aislaron un total de 24 cepas nativas provenientes del Estado de Yucatán y 11 cepas nativas del Estado de Chiapas.

7.2 MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DE LAS CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*. El análisis de la morfología del cristal se realizó mediante una tinción simple y su observación al microscopio, las cepas nativas mostraron diversidad en su forma y tamaño, tomando como referencia su comparación con la espora las cuales se pueden observar en la Figura 2. El análisis microscópico nos permitió observar la presencia de cristales de forma bipiramidal (pequeños a grandes), cuadrados e irregulares de nuestras cepas nativas y las cuales se muestran en la Tabla 9.

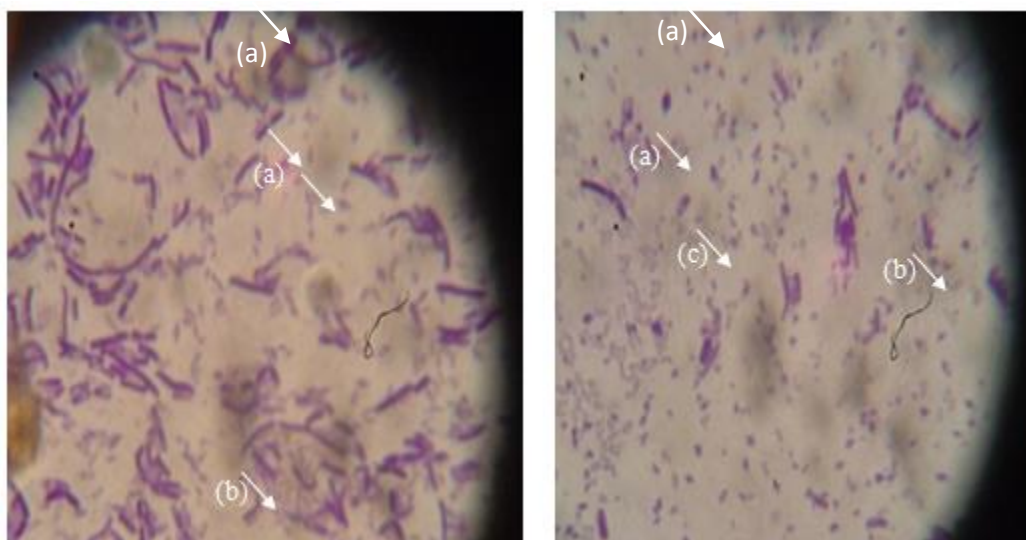


Figura 2. Fotografías al microscopio de la morfología de las cepas nativas de suelo de Yucatán y Chiapas de *Bacillus thuringiensis*. Se observa (a) la morfología bipiramidal (pequeño a grande), (b) cuadrada y (c) los cristales irregulares.

7.3 RENDIMIENTO DE LAS FERMENTACIONES DEL MEDIO MELAZA-HARINA DE SOYA. Las fermentaciones realizadas con las treinta y cinco cepas nativas presentaron un rendimiento promedio de 20 gramos por litro utilizando este medio de cultivo.

Tabla 9. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelo agrícola del Estado de Yucatán y Chiapas.

CEPA	FUENTE DE AISLAMIENTO	TIPO DE CRISTAL
YUC-2	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande y cuadrado
YUC-3	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande y cuadrado
YUC-4	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande y cuadrado
YUC-5	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande y cuadrado
YUC-6	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal y cuadrado
YUC-7	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande
YUC-8	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-9	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal y cuadrado
YUC-10	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal y cuadrado
YUC-11	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal grande
YUC-12	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño y grande
YUC-13	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-14	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande y cuadrado
YUC-15	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño-grande y cuadrado
YUC-16	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-17	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-18	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño y grande
YUC-19	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-20	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-21	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño y grande
YUC-22	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño y grande
YUC-23	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-24	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño
YUC-25	Cultivo de maíz	Cristal bipiramidal pequeño y grande
M2-1	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño e irregular redondeado
M2-2	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal grande
M2-3	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño
M2-4	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño
M2-5	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño
M2-6	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño
M2-7	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño
M2-8	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal grande y cuadrado
M2-9	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño
M2-10	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal grande
M2-11	Cultivo de mango	Cristal bipiramidal pequeño e irregular

7.4 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA LARVAS NEONATAS DE *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* Y *Helicoverpa zea*. En los bioensayos preliminares de toxicidad realizados para las treinta y cinco cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y evaluadas contra los insectos prueba se observó que las cepas nativas mostraron alta mortalidad a concentraciones de 50 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, con porcentajes de mortalidad superiores al 83.3% (Anexo I). Mientras que a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mostraron mortalidades del 16.6-95.8% contra *Trichoplusia ni*. Cabe mencionar que la única cepa que mostró baja mortalidad fue la YUC-6, que presentó de 4.16-16.6% de mortalidad. Los resultados de la evaluación preliminar contra larvas neonatas de *Spodoptera exigua* a las concentraciones de 50 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se presentan en el Anexo II encontrando porcentajes de mortalidad superiores al 66.6% mientras que a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mostraron mortalidades inferiores del 58.3%. Contra *Helicoverpa zea* (Anexo III) encontramos porcentajes de mortalidad superiores al 62.5% a concentraciones de 50 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, no logra superar el 50% de mortalidad. En la siguiente Figura 3 se muestra el efecto de toxicidad de la cepa IB-7 (A) contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, con respecto al control no tratado (B).

Los Análisis de Varianza realizados a los resultados de los bioensayos preliminares (3 replicas con 3 repeticiones cada uno) de cada especie expuesta a las cepas nativas aisladas de muestras de suelo de Yucatán se muestran en la Tabla 10, donde se observa que los valores de significancia encontrados no fueron mayores a 0.05, corroborando así que no hubo diferencia significativa entre los 3 bioensayos realizados, para poder agrupar y promediar estos resultados y determinar después la diferencia entre los diversos tratamientos (cepas) (SPSS versión 15). En el Anexo IV, se muestran los Análisis de Varianza del resto de las cepas nativas de Yucatán. De igual manera, el Anexo V corresponde a los Análisis de Varianza de los bioensayos preliminares de cada especie expuesta a las cepas nativas aisladas de muestras de suelo de Chiapas.



Figura 3. Efecto de la exposición de larvas neonatas de *Trichoplusia ni* a la cepa de referencia IB-7. (A) comparado contra el control no tratado (B). Nótese el tamaño de las larvas tratadas (A) que son minúsculas contra las del control no tratado (B).

Los bioensayos con extractos obtenidos de las cepas nativas de Yucatán y Chiapas contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* resultaron en mortalidades superiores del 91.6% a concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F=789.987$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=390.955$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=805.364$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo III). Sin embargo, la cepa YUC-6 fue quien mostró mortalidad inferior al 12.5% en esta misma concentración. Posteriormente, fueron probados en concentraciones de 5 y $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ encontrándose los resultados mostrados en el Anexo I; donde se observa que las cepas YUC-3, YUC-5, YUC-7, YUC-9 y YUC-11 mostraron significativamente mayor toxicidad contra *Trichoplusia ni* probadas a concentración de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que las cepas las restantes no superaron el 41.6% de mortalidad contra este insecto ($F=156.098$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=124.326$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=116.886$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo III). De igual manera, las cepas M2-7, M2-9 y M2-11 mostraron significativamente mayor toxicidad contra *Trichoplusia ni* con mortalidad superior del 75% probadas a concentración de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que las cepas restantes no superaron el 70.8% de mortalidad contra este insecto ($F=191.039$,

Tabla 10. ANOVA de las Cepas aisladas de Yucatán.

ANOVA cepa YUC 2						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.736	2	1.868	1.000	0.422
	Dentro de grupos	11.207	6	1.868		
	Total	14.492	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	35.002	2	17.501	0.756	0.510
	Dentro de grupos	138.893	6	23.149		
	Total	173.896	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	166.607	2	83.303	3.931	0.081
	Dentro de grupos	127.133	6	21.189		
	Total	293.740	8			
ANOVA cepa YUC 3						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.920	2	1.960	0.121	0.888
	Dentro de grupos	80.100	6	13.350		
	Total	84.020	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	0.000	2	0.000		
	Dentro de grupos	0.000	6	0.000		
	Total	0.000	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	80.927	2	40.63	1.905	0.229
	Dentro de grupos	127.413	6	21.236		
	Total	208.340	8			
ANOVA cepa YUC 4						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	12.836	2	6.418	1.015	0.417
	Dentro de grupos	37.947	6	6.324		
	Total	50.782	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	0.016	2	0.007	0.000	1.000
	Dentro de grupos	103.340	6	17.223		
	Total	103.356	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.766	2	5.880	0.278	0.766
	Dentro de grupos	126.860	6	21.143		
	Total	138.620	8			
ANOVA cepa YUC 5						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.920	2	1.960	0.147	0.866
	Dentro de grupos	80.100	6	193.350		
	Total	84.020	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	46.484	2	23.241	0.857	0.471
	Dentro de grupos	162.687	6	27.114		

	Total	209.171	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	0.007	2	0.003	0.000	1.000
	Dentro de grupos	103.340	6	17.223		
	Total	103.347	8			
ANOVA cepa YUC 7						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	27.069	2	13.534	0.881	0.462
	Dentro de grupos	92.133	6	15.356		
	Total	119.202	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	34.722	2	17.361	0.597	0.580
	Dentro de grupos	174.447	6	29.074		
	Total	209.169	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	108.087	2	54.043	4.020	0.078
	Dentro de grupos	80.653	6	13.442		
	Total	188.740	8			
ANOVA cepa YUC 8						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	80.649	2	40.324	4.164	0.073
	Dentro de grupos	57.967	6	9.661		
	Total	138.616	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	81.484	2	40.741	1.914	0.227
	Dentro de grupos	127.688	6	21.281		
	Total	209.172	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	80.937	2	40.463	1.905	0.229
	Dentro de grupos	127.406	6	21.236		
	Total	208.343	8			
ANOVA cepa YUC 9						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	34.722	2	17.361	0.596	0.581
	Dentro de grupos	174.727	6	29.121		
	Total	209.449	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	11.760	2	5.880	0.385	0.696
	Dentro de grupos	91.580	6	15.263		
	Total	103.340	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.760	2	5.880	0.600	0.579
	Dentro de grupos	58.800	6	9.800		

Total		70.560	8			
ANOVA cepa YUC 11						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	14.047	2	7.023	0.939	0.442
	Dentro de grupos	44.893	6	7.482		
	Total	58.940	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	34.722	2	17.361	1.500	0.296
	Dentro de grupos	69.447	6	11.574		
	Total	104.169	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	45.927	2	22.963	1.084	0.396
	Dentro de grupos	127.133	6	21.189		
	Total	173.060	8			
ANOVA cepa YUC 17						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	80.649	2	40.324	2.595	0.154
	Dentro de grupos	93.247	6	15.541		
	Total	173.896	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	15.309	2	7.654	0.440	0.663
	Dentro de grupos	104.447	6	17.408		
	Total	119.756	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	150.649	2	75.324	1.959	0.221
	Dentro de grupos	230.747	6	38.458		
	Total	381.396	8			
ANOVA cepa YUC 18						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	34.722	2	17.361	0.600	0.579
	Dentro de grupos	173.620	6	28.937		
	Total	208.342	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	80.649	2	40.324	4.174	0.073
	Dentro de grupos	57.967	6	9.661		
	Total	138.616	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.760	2	5.880	0.600	0.579
	Dentro de grupos	58.800	6	9.800		
	Total	70.560	8			
ANOVA cepa YUC 19						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	11.760	2	5.880	0.278	0.766

	Dentro de grupos	126.860	6	23.143		
	Total	138.620	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	3.736	2	1.868	0.044	0.957
	Dentro de grupos	253.987	6	42.331		
	Total	257.722	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	81.482	2	40.741	4.217	0.072
	Dentro de grupos	57.967	6	9.661		
	Total	139.449	8			
ANOVA cepa YUC 20						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.736	2	1.868	0.074	0.930
	Dentro de grupos	151.487	6	25.248		
	Total	155.222	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	73.087	2	36.543	1.004	0.421
	Dentro de grupos	218.433	6	36.406		
	Total	291.520	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	46.482	2	23.241	1.094	0.393
	Dentro de grupos	127.413	6	21.236		
	Total	173.896	8			

$gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=111.341$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=67.826$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo III).

Contra *Spodoptera exigua* la cepa YUC-3 mostró significativamente la mayor toxicidad, seguida de las cepas YUC-5, YUC-7 y YUC-8, en los tres bioensayos realizados a concentración de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F=90.979$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=49.557$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=28.460$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo III), al probarse en concentraciones de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ encontramos disminución de la mortalidad, altamente significativa entre las cepas encontrándose los resultados en Anexo II, donde se muestra que son 20 las cepas nativas que presentan actividad nula contra *Spodoptera exigua* a esta concentración ($F=397.832$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=246.531$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=374.060$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo III). De los extractos obtenidos de suelo de Chiapas, solo las cepas M2-2 y M2-5 son las que mostraron tener actividad superior del 66.6% de mortalidad contra *Spodoptera exigua* a

concentración de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, sin embargo las cepas restantes no superan el 58.3% de mortalidad contra este insecto. ($F=492.334$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=211.625$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=140.057$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo III).

Por otro lado, los resultados de la evaluación preliminar contra larvas neonatas de *Helicoverpa zea* se presentan en el Anexo III. Contra este insecto plaga, encontramos que las cepas nativas, causaron porcentajes de mortalidad inferiores que contra los dos insectos anteriormente evaluados. Se detectaron valores del 79.1-100% para todas las cepas en la concentración de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F=115.634$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=36.317$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=31.463$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo III), sobresaliendo la cepa YUC-17 y YUC-20 con mortalidad superior del 91.6% contra este insecto a esta concentración. Posteriormente, fueron probados en concentraciones de 5 y $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ donde se observa que las cepas anteriormente mencionadas mostraron significativamente la mayor toxicidad contra *Helicoverpa zea* probadas a concentración de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sin superar el 50% de mortalidad, mientras que las cepas las restantes presentaron mortalidad nula contra este insecto ($F=242.757$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=316.430$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=188.153$, $gl=24,50$, $p<0.0001$, Bioensayo III).

Por otra parte, las cepas originarias de Chiapas, M2-1 y M2-11, fueron las que presentaron la mayor actividad tóxica contra *Helicoverpa zea* con mortalidades superiores al 41.6% al utilizar la concentración de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que el resto de las cepas nativas evaluadas; no superaron el 37.5% de mortalidad contra este insecto problema ($F=128.693$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo I), ($F=140.118$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo II), ($F=89.423$, $gl=11,24$, $p<0.0001$, Bioensayo III).

7.5 DETERMINACIÓN DE CL_{50} DE CEPAS CULTIVADAS EN EL MEDIO MELAZA. El análisis de varianza indicó que sí existió diferencia significativa en la toxicidad de las cepas nativas probadas para cada insecto prueba. Las cepas nativas que mostraron mayores porcentajes de mortalidad en bioensayos preliminares fueron sometidas

a nuevos bioensayos para conocer su CL_{50} y cuyos resultados se muestran en la Tabla 11 y 12.

Tabla 11. Comparación de CL_{50} y CL_{90} , de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* de Yucatán; y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros.

<i>Trichoplusia ni</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL_{50}	IC 95%	CL_{90}	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
YUC-3	504	72	0.136ab	0.01-0.18	0.426	0.16-4.07	1.95±0.85	1.23
YUC-5	504	72	0.108a	0.29-0.19	0.412	0.44-3.94	2.27±0.84	0.27
YUC-7	504	72	0.136ab	0.10-0.18	0.378	0.17-1.65	2.92±0.85	0.69
YUC-9	504	72	0.162ab	0.09-0.38	0.459	0.28-1.23	2.94±0.95	0.29
YUC-11	504	72	0.220bcd	0.16-0.30	0.412	0.33-1.12	3.51±0.91	0.73
GM-7	504	72	0.278d	0.12-0.86	23.698	0.33-3.52	1.81±0.87	0.32
IB-7	504	72	0.178abc	0.12-0.61	0.819	0.45-14.77	2.01±0.80	0.55
IB-62	504	72	0.147ab	0.10-0.37	1.019	0.23-35.33	2.51±0.55	2.48
HD-1	504	72	0.254cd	0.21-0.34	0.649	0.36-1.96	3.39±0.86	1.06
<i>Spodoptera exigua</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL_{50}	IC 95%	CL_{90}	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
YUC-3	504	72	2.781d	1.80-4.88	9.504	2.31-38.31	2.71±0.97	0.17
YUC-5	504	72	0.489ab	0.33-0.77	0.939	0.39-1.82	4.78±1.37	3.37
YUC-7	504	72	2.983d	2.23-4.01	9.491	1.31-76.95	2.69±0.84	0.33
YUC-8	504	72	1.719c	0.27-15.53	32.263	0.09-4.52	1.13±0.86	0.12
GM-7	504	72	0.343a	0.26-0.45	0.928	0.38-5.01	3.04±0.85	0.23
IB-7	504	72	0.900b	0.17-6.24	2.383	0.08-45.74	3.04±1.70	0.16
IB-62	504	72	0.757ab	0.25-4.70	1.790	0.23-29.13	3.49±1.56	0.08
HD-1	504	72	0.398ab	0.31-0.57	1.078	0.41-9.67	3.37±0.88	0.91
<i>Helicoverpa zea</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL_{50}	IC 95%	CL_{90}	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
YUC-17	504	72	2.294b	1.75-3.02	3.820	3.32-12.03	3.90±0.93	0.55
YUC-20	504	72	2.511c	1.88-3.43	7.017	3.31-39.61	3.28±0.87	0.58
GM-7	504	72	0.287a	0.20-0.42	0.906	0.29-6.00	2.58±0.94	0.90
IB-7	504	72	0.245a	0.16-0.39	1.048	0.25-74.78	2.54±0.85	0.27
IB-62	504	72	0.322a	0.27-0.38	0.663	0.41-1.59	4.17±0.90	1.11
HD-1	504	72	0.269a	0.21-0.32	0.564	0.37-1.25	5.77±0.88	2.92

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL_{50} y CL_{90} en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del complejo espора- cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

En esta Tabla 11 se observa que se seleccionaron 8 cepas nativas para la determinación de las CL_{50} . En la comparación de medias de las CL_{50} de las cepas nativas contra las de referencia, se encontró que la cepa nativa YUC-5 ($F=3.9207$, $gl=8,18$, $p<0.008$) mostró ser significativamente más tóxica contra *Trichoplusia ni* con CL_{50} de $0.108 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que la cepa de referencia GM-7, presentó la menor toxicidad contra este insecto, con CL_{50} de $0.278 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las cepas YUC-3, YUC-7 y YUC-9 fueron significativamente similares a la cepa de referencia IB-62. Por otra parte, la cepa YUC-11 presentó mortalidad parcialmente semejante a las cepas IB-7 y HD-1 contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*.

Los resultados de la comparación de CL_{50} contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de la cepa nativa YUC-5 fue significativamente similar a las cepas de referencia IB-62 y HD-1 pero menos tóxica que la cepa de referencia GM-7. Las restantes cepas aisladas, YUC-3, YUC-7 y YUC-8, así como la IB-7; resultaron ser las menos tóxicas contra este insecto ($F=38.045$, $gl=7,16$, $p<0.0001$).

Contra *Helicoverpa zea*, las cepas nativas YUC-17 y YUC-20 mostraron CL_{50} significativamente mayores a las cepas de referencia HD-1, GM-7, IB-7 e IB-62 ($F=248.210$, $gl=5,12$, $p<0.0001$). Por lo que, ninguna de las cepas nativas aisladas de suelo de Yucatán producidas en medio melaza superó la actividad tóxica de las cepas de referencia.

Tabla 12. Comparación de CL₅₀ y CL₉₀, de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* de Chiapas y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros.

<i>Trichoplusia ni</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
M2-7	504	72	0.242a	0.17-0.34	0.667	0.33-2.64	3.06±0.86	2.08
M2-9	504	72	0.245a	0.17-0.33	0.703	0.33-2.81	2.85±0.85	0.34
M2-11	50	72	0.258a	0.17-0.40	1.021	0.27-16.75	2.19±0.83	0.21
GM-7	504	72	0.278a	0.12-0.86	23.698	0.33-3.52	1.81±0.87	0.32
IB-7	504	72	0.178a	0.12-0.61	0.819	0.45-14.77	2.01±0.80	0.55
IB-62	504	72	0.147a	0.10-0.37	1.019	0.23-35.33	2.51±0.55	2.48
HD-1	504	72	0.254a	0.21-0.34	0.649	0.36-1.96	3.39±0.86	1.06
<i>Spodoptera exigua</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
M2-2	504	72	2.627de	1.88-3.66	8.853	3.15-63.88	2.47±0.83	0.30
M2-5	504	72	3.210e	2.49-4.12	9.147	3.68-50.83	2.86±0.83	0.79
GM-7	504	72	0.343a	0.26-0.45	0.928	0.38-5.01	3.04±0.85	0.23
IB-7	504	72	0.900cd	0.17-6.24	2.383	0.08-45.74	3.04±1.70	0.16
IB-62	504	72	0.757c	0.25-4.70	1.790	0.23-29.13	3.49±1.56	0.08
HD-1	504	72	0.398b	0.31-0.57	1.078	0.41-9.67	3.37±0.88	0.91
<i>Helicoverpa zea</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
M2-1	504	72	1.697b	0.85-5.05	7.235	2.32-173.54	2.32±0.87	0.28
M2-11	504	72	1.701b	0.75-5.26	6.146	2.52-26.88	2.29±0.91	0.49
GM-7	504	72	0.287a	0.20-0.42	0.906	0.29-6.00	2.58±0.94	0.90
IB-7	504	72	0.245a	0.16-0.39	1.048	0.25-74.78	2.54±0.85	0.27
IB-62	504	72	0.322a	0.27-0.38	0.663	0.41-1.59	4.17±0.90	1.11
HD-1	504	72	0.269a	0.21-0.32	0.564	0.37-1.25	5.77±0.88	2.92

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del complejo espóra-cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

En esta Tabla 12 se observa que se seleccionaron 6 cepas nativas para la determinación de las CL₅₀. En la comparación de medias de las CL₅₀, se encontró que las cepas nativas aisladas de suelo del Estado de Chiapas presentaron la misma actividad tóxica que las cepas de referencia contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* ($F=1.660$, $gl=6,14$, $p=0.203$).

Los resultados de la comparación de CL_{50} contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de las cepas nativas, M2-2 y M2-5, fue significativamente menor a las cepas de referencia, con CL_{50} en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 2.627 y 3.210; respectivamente. La cepa de referencia GM-7, fue la más tóxica contra este insecto prueba, presentando CL_{50} de 0.343 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las cepas restantes, HD-1, IB-62 e IB-7; resultaron ser más tóxicas que las nativas contra este insecto ($F=106.431$, $gl=5,12$, $p<0.0001$).

Contra *Helicoverpa zea*, las cepas nativas M2-1 y M2-11 mostraron CL_{50} significativamente mayores a las cepas de referencia HD-1, GM-7, IB-7 e IB-62 ($F=28.086$, $gl=5,12$, $p<0.0001$). Por lo que, ninguna de las cepas nativas aisladas de suelo de Chiapas superó la actividad tóxica de las cepas de referencia.

7.6 DETERMINACIÓN DE CL_{50} DE CEPAS CULTIVADAS EN EL MEDIO SOLUBLE (JARABE DE MAÍZ).

Las mismas 8 cepas seleccionadas fueron cultivadas en el nuevo medio soluble a base de jarabe de maíz, polvo de remojo de maíz soluble y harina de girasol, en las mismas condiciones utilizadas en el medio anterior (Tabla 13 y 14).

Los resultados obtenidos en el nuevo medio soluble, balanceado con tasa de C:N (7:1) utilizando Jarabe de maíz y polvo de remojo de maíz, indican disminución de la toxicidad de los extractos de todas las cepas nativas y las de referencia, en relación al medio melaza, exceptuando la cepa YUC-3, en la cual su actividad biológica se vió incrementada contra *Spodoptera exigua*, con 0.391 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra 2.781 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentado en medio melaza, Tabla 13.

Tabla 13. Comparación de CL₅₀ y CL₉₀, de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* de Yucatán; y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros producidos en el medio con Ingredientes Solubles.

<i>Trichoplusia ni</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
YUC-3	504	72	2.484a	1.97-3.13	5.282	3.55-10.87	3.95±0.90	1.11
YUC-5	504	72	1.820a	1.07-3.10	5.243	2.96-15.33	2.83±0.90	0.22
YUC-7	504	72	2.787a	2.20-3.54	6.757	3.70-22.18	3.52±0.87	0.30
YUC-9	504	72	6.665b	3.07-1.09	18.634	2.99-59.08	2.92±1.09	0.29
YUC-11	504	72	3.122a	2.48-3.92	8.203	3.82-32.99	3.06±0.84	0.38
GM-7	504	72	3.013a	2.33-3.89	8.709	3.58-48.06	2.86±0.83	0.44
IB-7	504	72	38.431c	31.12-47.51	83.281	43.80-284	4.00±0.90	2.31
IB-62	504	72	2.779a	2.17-11.80	7.307	3.66-25.64	3.06±0.84	1.42
HD-1	504	72	2.267a	1.71-3.01	5.084	3.35-10.95	3.74±0.91	1.61
<i>Spodoptera exigua</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
YUC-3	504	72	0.391a	1.65-3.13	5.712	3.37-14.74	3.21±0.88	0.34
YUC-5	504	72	2.276b	2.74-3.95	7.114	4.15-18.90	3.85±0.87	1.00
YUC-7	504	72	3.292b	1.37-3.22	6.153	3.13-22.13	2.80±0.87	0.34
YUC-8	504	72	2.097b	1.91-3.98	10.857	2.81-160.79	2.19±0.82	0.16
GM-7	504	72	2.442b	32.38-68.01	118.37	41.02-218.63	3.81±0.93	0.87
IB-7	504	72	45.900c	1.56-3.16	5.881	3.30-16.89	3.04±0.87	0.47
IB-62	504	72	2.217b	2.84-3.92	6.493	4.24-13.96	4.45±0.89	1.69
HD-1	504	72	3.341b	1.65-3.13	5.712	3.37-14.74	3.21±0.88	0.34
<i>Helicoverpa zea</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
YUC-17	504	72	1.781ab	0.89-3.85	7.388	2.53-62.79	2.14±0.85	0.64
YUC-20	504	72	1.432a	0.60-3.64	5.382	2.41-41.01	2.48±0.95	0.48
GM-7	504	72	4.467c	3.21-6.25	11.788	4.11-107.66	3.22±0.89	0.43
IB-7	504	72	4.416c	3.03-6.52	13.351	3.72-211.45	2.80±0.86	1.03
IB-62	504	72	1.603a	0.86-2.99	4.410	2.77-10.57	2.97±0.64	0.53
HD-1	504	72	2.120b	1.44-3.11	5.740	3.19-17.13	3.01±0.88	1.14

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en µg/cm² del complejo espора- cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

En la comparación de medias de las CL₅₀ de las cepas nativas contra las de referencia utilizando el nuevo medio de cultivo (Tabla 13), se encontró que las cepas nativas aisladas presentaron CL₅₀ mayores por lo tanto menos tóxicas en comparación a las

producidas en medio melaza ($F=288.809, glf=8,18, p<0.0001$). Las cepas YUC-3, YUC-5, YUC-7 y YUC-11 fueron significativamente iguales a las cepas de referencia HD-1, GM-7 e IB-62 contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, donde la cepa de referencia IB-7, presentó la mayo CL_{50} , por lo tanto la menor actividad tóxica contra este insecto al ser producida en este medio de cultivo con $38.431 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, seguida de la cepa YUC-9 con CL_{50} de $6.665 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Los resultados de la comparación de CL_{50} contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de la cepa nativa YUC-3 fue significativamente superior a las cepas de referencia HD-1, GM-7 e IB-62 y al resto de las cepas nativas evaluadas. De igual manera, la cepa de referencia IB-7 resultó con menor actividad contra larvas neonatas de *Spodoptera exigua*, presentando CL_{50} de $45.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F=78.686, gl=7,16, p<0.0001$).

Contra *Helicoverpa zea*, la cepa nativa YUC-20 e IB-62 mostraron la mayor actividad contra este insecto mientras que, la cepa YUC-17 mostró CL_{50} parcialmente similar a las anteriormente mencionadas. El resto de las cepas evaluadas, HD-1, GM-7 e IB-7, resultaron con CL_{50} significativamente mayores ($F=72.421, glf=5,12, p<0.0001$).

De igual manera, las cepas nativas aisladas de Chiapas y producidas en el nuevo medio de cultivo se presentan en la Tabla 14. Los resultados obtenidos en este medio soluble, indican disminución de la toxicidad de todas las cepas nativas y las de referencia, exceptuando las cepas M2-9 y M2-1, en la cual su actividad biológica se ve incrementada contra *Trichoplusia ni* y *Helicoverpa zea*; respectivamente.

Tabla 14. Comparación de CL₅₀ y CL₉₀, de los Extractos Insecticidas de las Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* de Chiapas; y los Extractos de Cepas de Referencia, contra Larvas neonatas de Lepidópteros producidos en el medio con Ingredientes Solubles.

<i>Trichoplusia ni</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
M2-7	504	72	2.634b	2.09-3.32	6.178	3.60-17.24	3.66±0.88	1.69
M2-9	504	72	0.215a	0.16-0.30	0.460	0.32-0.86	3.87±0.95	0.99
M2-11	50	72	2.054ab	1.42-2.97	5.119	3.07-14.55	3.41±0.95	0.47
GM-7	504	72	3.013b	2.33-3.89	8.709	3.58-48.06	2.86±0.83	0.44
IB-7	504	72	38.431c	31.12-47.51	83.281	43.80-284	4.00±0.90	2.31
IB-62	504	72	2.779b	2.17-11.80	7.307	3.66-25.64	3.06±0.84	1.42
HD-1	504	72	2.059ab	1.71-3.01	5.084	3.35-10.95	3.74±0.91	1.61
<i>Spodoptera exigua</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
M2-2	504	72	2.747a	1.52-3.57	7.952	3.02-49.01	2.39±0.84	0.46
M2-5	504	72	2.308a	1.91-3.12	5.300	3.46-11.78	3.89±0.92	1.15
GM-7	504	72	2.442a	32.38-68.01	118.37	41.02-218.63	3.81±0.93	0.87
IB-7	504	72	45.900b	1.56-3.16	5.881	3.30-16.89	3.04±0.87	0.47
IB-62	504	72	2.217a	2.84-3.92	6.493	4.24-13.96	4.45±0.89	1.69
HD-1	504	72	3.341a	1.65-3.13	5.712	3.37-14.74	3.21±0.88	0.34
<i>Helicoverpa zea</i>								
Cepa	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
M2-1	504	72	1.568a	0.86-6.55	4.054	2.74-8.20	3.12±0.99	0.51
M2-11	504	72	1.995ab	1.02-4.06	6.553	2.19-191.54	1.85±0.83	0.24
GM-7	504	72	4.467c	3.21-6.25	11.788	4.11-107.66	3.22±0.89	0.43
IB-7	504	72	4.416c	3.03-6.52	13.351	3.72-211.45	2.80±0.86	1.03
IB-62	504	72	1.603ab	0.86-2.99	4.410	2.77-10.57	2.97±0.64	0.53
HD-1	504	72	2.120b	1.44-3.11	5.740	3.19-17.13	3.01±0.88	1.14

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del complejo espора- cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

En la comparación de medias de las CL₅₀ de las cepas nativas contra las de referencia utilizando un nuevo medio de cultivo, se encontró que las cepas nativas aisladas de suelo del Estado de Chiapas presentaron CL₅₀ menores contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* en comparación a cepas de referencia ($F=309.506$, $gl=6,14$, $p < 0.0001$). La cepa nativa M2-9 mostró ser la significativamente más tóxica seguida de la cepa M2-11 y HD-1 contra *Trichoplusia ni* con CL₅₀ de 0.215, 2.054 y 2.059 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. La

cepa M2-7 fue significativamente igual a las cepas de referencia, GM-7 e IB-62, la cepa de referencia IB-7, presentó la mayor CL_{50} , por lo tanto la menor actividad tóxica contra este insecto al ser producida en este medio de cultivo, con $38.431 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Los resultados de la comparación de CL_{50} contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de las cepas nativas M2-2 y M2-5 fueron significativamente iguales a las cepas de referencia HD-1, GM-7 e IB-62. De igual manera, la cepa de referencia IB-7 resultó con la menor actividad, presentando CL_{50} de $45.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F=76.880$, $gl=5,12$, $p<0.0001$).

Contra *Helicoverpa zea*, la cepa nativa M2-1 mostró la mayor actividad contra este insecto mientras que, las cepas M2-11 e IB-62 mostraron CL_{50} significativamente igual y parcialmente similar a la cepa HD-1. Mientras que las cepas IB-7 y GM-7 resultaron ser las menos tóxicas contra este insecto blanco ($F=62.961$, $gl=5,12$, $p<0.0001$).

Con el fin de determinar cuál de estos dos medios de cultivo promueven mayor mortalidad contra los insectos prueba se realizó una prueba t de Student, obteniéndose los siguientes resultados, presentados en la Tabla 15. Las fermentaciones realizadas con las cepas nativas en el nuevo medio de cultivo, presentaron un rendimiento promedio de 15 gramos por litro.

Tabla 15. Comparación de CL_{50} , en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, de las cepas de referencia y nativas de *Bacillus thuringiensis* producidos en medio melaza y en el nuevo medio soluble, contra larvas neonatas de insectos de prueba. Análisis de la t de Student (* indica diferencia significativa al nivel de 0.05).

<i>Trichoplusia ni</i>		
Melaza		Nuevo medio soluble
CL₅₀	Cepa	CL₅₀
0.136*	YUC-3	2.484
0.108*	YUC-5	1.820
0.136*	YUC-7	2.787
0.162*	YUC-9	6.665
0.220*	YUC-11	3.122
0.242*	M2-7	2.634
0.245	M2-9	0.215*
0.258*	M2-11	2.054
0.278*	GM-7	3.013
0.178*	IB-7	38.431
0.147*	IB-62	2.779
0.264*	HD-1	2.267
<i>Spodoptera exigua</i>		
Melaza		Nuevo medio soluble
CL₅₀	Cepa	CL₅₀
2.781	YUC-3	0.391*
0.489*	YUC-5	2.276
2.983	YUC-7	3.292
1.719	YUC-8	2.097
2.627	M2-2	2.747
3.210	M2-5	2.308
0.343*	GM-7	2.442
0.900*	IB-7	45.900
0.757*	IB-62	2.217
0.415*	HD-1	3.341
<i>Helicoverpa zea</i>		
Melaza		Nuevo medio soluble
CL₅₀	Cepa	CL₅₀
2.294	YUC-17	1.781
2.511	YUC-20	1.432
1.697	M2-1	1.568
1.701	M2-11	1.995
0.287*	GM-7	4.467
0.245*	IB-7	4.416
0.322*	IB-62	1.603
0.260*	HD-1	2.120

(ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

En la Tabla 16 se muestran las diferencias significativas entre las medias de CL_{50} presentada por cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, producidas en el medio melaza con respecto al nuevo medio soluble.

Tabla 16. Resumen de las pruebas t de Student de la comparación de CL₅₀ de los complejos espóra-cristal producidos en medio melaza y un nuevo medio soluble contra los insectos prueba.

Prueba t de Student	<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>Helicoverpa zea</i>
T calculada	-3.2464	-2.0536	-3.9355
T _{0.05}	1.990	2.001	2.015
T _{0.01}	2.637	2.661	2.693
Grados de libertad	70	58	46

Estos resultados indican que existe diferencia altamente significativa entre las medias de CL₅₀ presentada por las cepas nativas YUC-5 y M2-1 de *Bacillus thuringiensis* producidas en el medio melaza con respecto al nuevo medio soluble contra *Trichoplusia ni* y *Helicoverpa zea*, respectivamente. Contra *Spodoptera exigua* existe diferencia significativa al nivel del 0.05 únicamente al ser producido en estos medios sin embargo la cepa YUC-3 mostró mayor actividad contra este insecto al ser producida en el nuevo medio soluble (más de 5 veces). Por lo tanto, estas cepas nativas fueron seleccionadas para la formulación con diferentes polímeros naturales.

7.7 ACTIVIDAD TÓXICA DE LAS FORMULACIONES PREPARADAS CON LOS EXTRACTOS INSECTICIDAS DE YUC-5, YUC-3Y M2-1. Los resultados se muestran en la Tabla 17. La comparación de medias de CL₅₀ mostró que el formulado F2-5 presentó significativamente la menor CL₅₀ contra *Trichoplusia ni* en comparación con el producto comercial [®]Dipel 2X y el formulado F1-5 ($F=69.0259$, $gl= 2,6$, $p<0.0001$). Los resultados de la comparación de CL₅₀ obtenidos contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de los formulados F1-5 y F2-5 fue significativamente menor al producto comercial [®]Dipel 2X ($F=83.6941$, $gl=2,16$; $p<0.0001$) aunque mostrando mejor actividad el formulado F2-5 que el formulado F1-5. Así mismo, contra *Helicoverpa zea*, los formulados F1-5 y F2-5, mostraron actividad tóxica significativamente menor al producto comercial [®]Dipel 2X ($F=61.8286$, $gl= 2,6$, $p<0.0001$).

Tabla 17. Comparación de CL₅₀ y CL₉₀, en µg/cm², de los Formulados Preparados a partir de la cepa nativa YUC-5 de *Bacillus thuringiensis* y el Producto Comercial Dipel[®] 2X contra Larvas Neonatas.

Insecto	Formulación	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
<i>Trichoplusia ni</i> ^c	F1-5 ^e	504	72	0.214b	0.15-0.30	1.085	0.39-9.76	1.93±0.48	0.95
	F2-5 ^e	504	72	0.133a	0.07-0.23	0.671	0.31-2.98	1.84±0.48	6.23
	Dipel [®] 2X	504	72	0.401c	0.27-0.59	1.824	0.48-27.62	1.99±0.52	1.66
<i>Spodoptera exigua</i> ^c	F1-5 ^e	504	72	4.971c	3.05-8.32	25.499	4.60-305.09	2.18±0.59	1.23
	F2-5 ^e	504	72	3.238b	2.20-4.80	20.860	4.07-146.51	1.74±0.49	0.88
	Dipel [®] 2X	504	72	0.671a	0.32-1.39	3.176	0.44-157.65	1.93±0.61	0.98
<i>Helicoverpa zea</i> ^c	F1-5 ^e	504	72	9.014b	0.96-122.10	23.770	0.28-610.17	3.26±2.05	0.07
	F2-5 ^e	504	72	7.505b	1.93-31.03	20.161	0.85-410.99	3.46±1.74	0.30
	Dipel [®] 2X	504	72	0.682a	0.29-25.24	5.583	0.31-462.59	2.20±0.68	0.28

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, p≤0.005).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en µg/cm² de los formulados por gramo de dieta. IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

^e Formulados con ingrediente activo YUC-5

7.7.1 DETERMINACIÓN DE CL₅₀ DEL FORMULADO YUC-3. Los formulados (F1-3 y F2-3) preparados a base de la cepa nativa YUC-3 y comparados con el producto comercial [®]Dipel 2X contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* se muestran en el Anexo VI. La comparación de medias de CL₅₀ mostró que el formulado F2-3 presentó significativamente igual CL₅₀ contra *Trichoplusia ni* en comparación con el producto comercial [®]Dipel 2X ($F=14.4409$, $gl=2,6$, $p=0.006$).

Los resultados de la comparación de CL₅₀ obtenidos en bioensayos contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de los formulados F1-3 y F2-3 fue significativamente mayor al producto comercial [®]Dipel 2X ($F=88.0469$, $gl=2,16$; $p<0.0001$).

Así mismo, contra *Helicoverpa zea*, los formulados, F1-3 y F2-3, mostraron actividad tóxica significativamente menor al producto comercial [®]Dipel 2X ($F=95.8265$, $gl=2,6$, $p<0.0001$).

7.7.3 DETERMINACIÓN DE CL₅₀ DEL FORMULADO M2-1. Los formulados (F1-M21 y F2-M21) preparados a base de la cepa nativa M2-1 y comparados con el producto comercial [®]Dipel 2X contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* se muestran en el Anexo VII. La comparación de medias de CL₅₀ mostró que el formulado F2-M21 presentó significativamente igual CL₅₀ contra *Trichoplusia ni* en comparación con el producto comercial [®]Dipel 2X y menor CL₅₀ que el formulado F1-M21 ($F=26.7893$, $gl=2,6$, $p<0.002$).

Los resultados de la comparación de CL₅₀ obtenidos en bioensayos contra *Spodoptera exigua* mostraron que la actividad tóxica de los formulados F1-M21 y F2-M21 fue significativamente menor al producto comercial [®]Dipel 2X ($F=64.3641$, $gl=2,16$; $p<0.0001$) aunque mostrando mejor actividad el formulado F2-M21 que el formulado F1-M21.

Así mismo, contra *Helicoverpa zea*, los formulados preparados con la cepa nativa M2-1, F1-M21 y F2-M21, mostraron actividad tóxica significativamente menor al producto comercial [®]Dipel 2X ($F=102.7024$, $gl= 2,6$, $p<0.0001$).

7.8 PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LOS EXTRACTOS INSECTICIDAS-POLÍMEROS.

Los formulados después del secado por aspersión presentaron los siguientes porcentajes de humedad (Tabla 18), donde se observa que los porcentajes variaron de 5.80 a 8.11%.

Tabla 18. Porcentaje de humedad de los formulados después del secado por aspersión.

	PESO VIDRIO RELOJ + PESO FORMULADO O HÚMEDO	PESO DE VIDRIO RELOJ + PESO FORMULA DO SECO	PESO DEL AGUA CONTENIDA	PESO DEL VIDRIO DE RELOJ	PESO DEL FORMULA DO SECO	PORCENTAJE DE HUMEDAD (%) ^a
F1^b	20.0869	20.0320	0.0549	19.0869	0.9451	5.8089
F2^b	19.8732	19.8158	0.0574	18.8732	0.9426	6.0895
F1-3^c	19.9663	19.8975	0.0688	18.9663	0.9312	7.3883
F2-3^c	19.9366	19.8676	0.069	18.9366	0.9310	7.4114
F1-5^d	20.0755	20.0081	0.0674	19.0755	0.9326	7.2271
F2-5^d	19.9211	19.846	0.0751	18.9211	0.9249	8.1198
F1-21^e	20.0094	19.9493	0.0601	19.0094	0.9399	6.3943
F2-21^e	19.9115	19.8367	0.0748	18.9115	0.9252	8.0847

^a promedio de tres repeticiones

^b Formulados sin ingrediente activo

^c Formulados con ingrediente activo YUC-3

^d Formulados con ingrediente activo YUC-5

^e Formulados con ingrediente activo M2-1

7.9 EFECTO DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS FORMULADOS E INGREDIENTE ACTIVO.

Después de los diferentes períodos de tiempo de 0, 30, 60 y 90 días, se puede observar que la actividad tóxica se mantiene estable, para las 3 cepas probadas; YUC-5, YUC-3 y M2-1 (Tabla 19,20 y 21).

Los formulados preparados con la cepa nativa YUC-5, F1-5 ($F=0.3115$, $gl=3,32$, $p=0.81$) y F2-5 ($F=1.2690$, $df=3,32$, $p=0.30$), evaluados contra larvas neonatas de *Trichoplusia niy* *Spodoptera exigua*, F1-5 ($F=0.9801$, $gl=3,32$, $p=0.58$) y F2-5 ($F=1.3170$, $gl=3,32$, $p=0.28$) y *Helicoverpa zea*, F1-5 ($F=0.3050$, $gl=3,32$, $p=0.82$) y F2-5 ($F=1.2039$, $gl=3,32$,

$p=0.32$), no mostraron pérdida de la actividad insecticida después del almacenamiento durante 90 días a temperatura de 25-30° C (Tabla 19).

Tabla 19. Mortalidad Presentada por Formulados e Ingrediente Activo de la Cepa YUC-5 de *Bacillus thuringiensis* sin Formular, Almacenados a 25-30°C durante Varios Días, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.

Formulación	Porcentaje de mortalidad ^d			
	<i>Trichoplusia ni</i> ^a			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	92.06a	91.14a	91.60a	92.06a
F1-5 ^c	75.00a	74.53a	75.45a	74.53a
F2-5 ^c	82.83a	83.3a	83.3a	83.76a
	<i>Spodoptera exigua</i> ^b			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	100a	99.53a	99.06a	100a
F1-5 ^c	71.26a	70.33a	71.26a	71.26a
F2-5 ^c	87.5ba	87.5ba	87.03a	87.95a
	<i>Helicoverpa zea</i> ^b			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	75.45a	75a	74.53a	75a
F1-5 ^c	46.26a	45.8a	45.8a	46.26a
F2-5 ^c	57.83a	58.3a	57.83a	58.76a

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

^aAplicado a 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^bAplicado a 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^cFormulados con ingrediente activo de la cepa YUC-5

^dPromedio de nueve repeticiones

Los formulados preparados con la cepa nativa YUC-5, F1-5 ($F=0.3115$, $gl=3,32$, $p=0.81$) y F2-5 ($F=1.2690$, $df=3,32$, $p=0.30$), evaluados contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua*, F1-5 ($F=0.9801$, $gl=3,32$, $p=0.58$) y F2-5 ($F=1.3170$, $gl=3,32$, $p=0.28$) y *Helicoverpa zea*, F1-5 ($F=0.3050$, $gl=3,32$, $p=0.82$) y F2-5 ($F=1.2039$, $gl=3,32$, $p=0.32$), no mostraron pérdida de la actividad insecticida después del almacenamiento durante 90 días a temperatura de 25-30° C (Tabla 19).

Tabla 20. Mortalidad Presentada por Formulados e Ingrediente Activo de la Cepa YUC-3 de *Bacillus thuringiensis* sin Formular, Almacenados a 25-30°C durante Varios Días, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.

Formulación	Porcentaje de mortalidad ^d			
	<i>Trichoplusia ni</i> ^a			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	91.14a	92.06a	91.14a	92.06a
F1-3 ^c	68.94a	69.86a	68.94a	69.4a
F2-3 ^c	78.64a	76.33a	77.72a	77.72a
<i>Spodoptera exigua</i> ^b				
Días	0	30	60	90
IA sin formular	99.53a	100a	99.53a	99.53a
F1-3 ^c	64.33a	62.94a	62.95a	63.41a
F2-3 ^c	69.87a	70.34a	71.26a	70.33a
<i>Helicoverpa zea</i> ^b				
Días	0	30	60	90
IA sin formular	62.00a	62.92a	62.93a	61.06a
F1-3 ^c	33.76a	32.83a	33.30a	34.23a
F2-3 ^c	42.54a	41.62a	42.53a	43.00a

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

^a Aplicado a 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^b Aplicado a 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^c Formulados con ingrediente activo de la cepa YUC-3

^d Promedio de nueve repeticiones

Los formulados preparados con la cepa nativa YUC-3, F1-3 ($F=0.2622$, $gl=3,32$, $p=0.85$) y F2-3 ($F=0.5219$, $gl=3,32$, $p=0.67$), evaluados contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, F1-3 ($F=0.4053$, $gl=3,32$, $p=0.75$) y F2-3 ($F=0.3408$, $gl=3,32$, $p=0.79$) y *Helicoverpa zea*, F1-3 ($F=0.8081$, $gl=3,32$, $p=0.50$) y F2-3 ($F=0.3225$, $gl=3,32$, $p=0.81$), de la misma manera, no mostraron pérdida de la actividad insecticida después del almacenamiento durante 90 días a temperatura de 25-30° C (Tabla 20).

Tabla 21. Mortalidad Presentada por Formulados e Ingrediente Activo de la Cepa M2-1 de *Bacillus thuringiensis* sin Formular, Almacenados a 25-30°C durante Varios Días, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.

Formulación	Porcentaje de mortalidad ^d			
	<i>Trichoplusia ni</i> ^a			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	72.66a	71.73a	72.20a	72.20a
F1-M21 ^c	54.11a	53.17a	53.64a	53.65a
F2- M21 ^c	60.16a	61.56a	61.11a	60.64a
	<i>Spodoptera exigua</i> ^b			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	31.90a	30.96a	30.96a	31.90a
F1-M21 ^c	15.68a	14.76a	15.68a	15.22a
F2- M21 ^c	19.86a	18.94a	19.40a	19.87a
	<i>Helicoverpa zea</i> ^b			
Días	0	30	60	90
IA sin formular	79.57a	77.73a	79.11a	79.57a
F1-M21 ^c	65.22a	64.28a	64.30a	64.75a
F2- M21 ^c	70.80a	69.86a	70.33a	71.26a

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

^a Aplicado a 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^b Aplicado a 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

^c Formulados con ingrediente activo de la cepa M2-1

^d Promedio de nueve repeticiones

Similarmente, los formulados preparados con la cepa nativa M2-1, F1-21 ($F=0.2654$, $gl=3,32$, $p=0.85$) y F2-21 ($F=0.2304$, $gl=3,32$, $p=0.87$), evaluados contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*; contra *Spodoptera exigua*, F1-21 ($F=0.2139$, $gl=3,32$, $p=0.88$) y F2-21 ($F=0.2896$, $gl=3,32$, $p=0.83$) y contra *Helicoverpa zea*, F1-21 ($F=0.1225$, $gl=3,32$, $p=0.94$) y F2-21 ($F=1.0980$, $gl=3,32$, $p=0.36$), no mostraron pérdida de la actividad insecticida después del almacenamiento durante 90 días a temperatura de 25-30°C (Tabla 21).

7.10 EFECTO DE LOS FORMULADOS BLANCO (SIN INGREDIENTE ACTIVO).

Al mismo tiempo se evaluaron las combinaciones polímeros/fotoprotector sin ingrediente activo, cuyos resultados mostraron una muy baja toxicidad variando del 1-12% para cada mezcla.

7.11 EFECTO DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS EXTRACTOS Y FORMULADOS DE YUC-3, YUC-5 Y M2-1 DE *Bacillus thuringiensis*.

Los formulados preparados con el ingrediente activo de la cepa YUC-5 de *Bacillus thuringiensis*, F1-5 y F2-5, después de la irradiación con luz ultravioleta presentaron menores reducciones en la actividad insecticida, comparados con el extracto insecticida sin formular, mostrado en la Tabla 22, donde se observa que este extracto irradiado presentó reducciones de mortalidad del 87.5% probado a concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, comparado con el extracto sin irradiar ($t_{\text{obs}}=-57.5$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10). Mientras que el formulado F1-5 irradiado ($t_{\text{obs}}=-2.7$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10) mostró menores reducciones en la mortalidad de larvas de *Trichoplusia ni* del 4.2%, así mismo; el formulado F2-5 irradiado ($t_{\text{obs}}=-3.7$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10) mostró reducción del 3.9% con respecto a los formulados no irradiados en la misma concentración. Por su parte, comparados entre sí, ambos formulados irradiados presentaron diferencia altamente significativa en la mortalidad de larvas ($t_{\text{obs}}=-5.9$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10), de tal manera que el formulado F2-5 presentó mejor actividad insecticida que el formulado F1-5 después de la irradiación con luz ultravioleta.

Contra larvas de *Spodoptera exigua* probados en concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, los resultados fueron similares encontrando reducciones en la mortalidad del 79.2% para el extracto irradiado en comparación con el extracto sin irradiar ($t_{\text{obs}}=-52.0$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10). Mientras que los formulados irradiados, F1-5 y F2-5, mostraron menores reducciones en la mortalidad contra este insecto plaga del 8.4% ($t_{\text{obs}}=-7.0$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10) y 12.5% ($t_{\text{obs}}=-7.8$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10), respectivamente. De igual manera, la comparación entre sí de ambos

formulados irradiados presentan diferencia significativa en la mortalidad contra larvas neonatas del insecto anteriormente mencionado ($t_{obs}=-4.5$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10).

Contra *Helicoverpa zea*, la reducción de la mortalidad del extracto sin formular irradiado fue del 54.2%, comparado con el no irradiado ($t_{obs}=-55.1$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10) al probarlo a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de concentración. Mientras que el formulado F1-5 irradiado mostró menores reducciones en la mortalidad contra larvas de este insecto del 12.5% ($t_{obs}=-9.5$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10) así mismo; el formulado F2-5 irradiado mostró reducciones del 12.5% con respecto al formulado no irradiado ($t_{obs}=-8.2$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10). Comparados entre sí, ambos formulados irradiados presentan diferencia altamente significativa en la mortalidad de larvas ($t_{obs}=-2.9$, $t_{0.05}=2.2$, g.l.=10).

Tabla 22. Efecto de Irradiación con Luz Ultra Violeta de 254 nm λ durante 72 Horas sobre el Extracto Insecticida sin Formular y Formulados Preparados de la Cepa Nativa YUC-5 de *Bacillus thuringiensis*, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.

Tiempo de exposición	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulado	Porcentaje de mortalidad ^a		% de reducción
			Irradiado	No irradiado	
<i>Trichoplusia ni</i>					
72 h	0.5	Bt sin formular	4.1	91.6	87.5
72 h	0.5	F1-5	70.8	75	4.2
72 h	0.5	F2-5	79.1	83	3.9
<i>Spodoptera exigua</i>					
72 h	5.0	Bt sin formular	16.6	95.8	79.2
72 h	5.0	F1-5	66.6	75	8.4
72 h	5.0	F2-5	75	87.5	12.5
<i>Helicoverpa zea</i>					
72 h	50.0	Bt sin formular	20.8	75	54.2
72 h	50.0	F1-5	66.6	79.1	12.5
72 h	50.0	F2-5	70.8	83.3	12.5

^aPromedio de tres repeticiones.

Los formulados preparados con el ingrediente activo de la cepa YUC-3 de *Bacillus thuringiensis*, F1-3 y F2-3, después de la irradiación con luz ultravioleta presentaron menores reducciones en la actividad insecticida, comparados con el extracto insecticida sin formular, mostrado en la Tabla 23, donde se observa que este extracto irradiado presentó reducciones de mortalidad del 84.0% probado a concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, comparado

con el extracto sin irradiar ($t_{\text{obs}}=-65.6215$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10). Mientras que el formulado F1-3 irradiado ($t_{\text{obs}}=-4.4721$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) mostró menores reducciones en la mortalidad de larvas de *Trichoplusia ni* del 5.6%, así mismo; el formulado F2-3 irradiado ($t_{\text{obs}}=-3.5082$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) mostró reducción del 5.5% con respecto a los formulados no irradiados en la misma concentración. Por su parte, comparados entre sí, ambos formulados irradiados presentaron diferencia altamente significativa en la mortalidad de larvas ($t_{\text{obs}}=-3.7963$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10).

Contra larvas de *Spodoptera exigua* probados en concentración de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, los resultados fueron similares encontrando reducciones en la mortalidad del 83.4% para el extracto irradiado en comparación con el extracto sin irradiar ($t_{\text{obs}}=-48.9898$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10). Mientras que los formulados, F1-3 y F2-3, mostraron menores reducciones en la mortalidad contra este insecto plaga del 6.2% ($t_{\text{obs}}=-3.5032$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) y 7.6% ($t_{\text{obs}}=-4.5675$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10), respectivamente. De igual manera, la comparación entre sí de ambos formulados irradiados no presentan diferencia significativa en la mortalidad contra larvas neonatas del insecto anteriormente mencionado ($t_{\text{obs}}=-2.0702$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10); lo que significa que ambos formulados presentaron la misma mortalidad.

Contra *Helicoverpa zea*, la reducción de la mortalidad del extracto sin formular irradiado comparado con el no irradiado fue del 61.1% ($t_{\text{obs}}=-37.1868$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) al probarlo a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de concentración. Mientras que el formulado F1-3 irradiado mostró menores reducciones en la mortalidad contra larvas de este insecto del 5.6% ($t_{\text{obs}}=-4.0000$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) así mismo; el formulado F2-3 irradiado mostró reducciones del 4.2% con respecto al formulado no irradiado ($t_{\text{obs}}=-3.3541$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10). Comparados entre sí, ambos formulados irradiados presentan diferencia altamente significativa con la mortalidad de larvas ($t_{\text{obs}}=-8.0000$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10).

Tabla 23. Efecto de Irradiación con Luz Ultra Violeta de 254 nm λ durante 72 Horas sobre el Extracto Insecticida sin Formular y Formulados Preparados de la Cepa Nativa YUC-3 de *Bacillus thuringiensis*, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.

Tiempo de exposición	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulado	Porcentaje de mortalidad ^a		% de reducción
			Irradiado	No irradiado	
<i>Trichoplusia ni</i>					
72 h	0.5	Bt sin formular	5.5	89.5	84.0
72 h	0.5	F1-3	63.8	69.4	5.6
72 h	0.5	F2-3	68.7	74.2	5.5
<i>Spodoptera exigua</i>					
72 h	5.0	Bt sin formular	10.3	93.7	83.4
72 h	5.0	F1-3	56.2	62.4	6.2
72 h	5.0	F2-3	60.4	68	7.6
<i>Helicoverpa zea</i>					
72 h	50.0	Bt sin formular	15.2	76.3	61.1
72 h	50.0	F1-3	29.1	34.7	5.6
72 h	50.0	F2-3	40.2	44.4	4.2

^aPromedio de seis repeticiones.

Los formulados preparados con el ingrediente activo de la cepa M2-1 de *Bacillus thuringiensis*, F1-M21 y F2-M21, después de la irradiación con luz ultravioleta presentaron menores reducciones en la actividad insecticida, comparados con el extracto insecticida sin formular, mostrado en la Tabla 24, donde se observa que este extracto irradiado presentó reducciones de mortalidad del 64.6% probado a concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, comparado con el extracto sin irradiar ($t_{\text{obs}}=-34.1875$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10). Mientras que el formulado F1-M21 irradiado ($t_{\text{obs}}=-5.4772$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) mostró menores reducciones en la mortalidad de larvas de *Trichoplusia ni* del 8.3%, así mismo; el formulado F2-M21 irradiado ($t_{\text{obs}}=-5.5816$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) mostró reducción del 6.3% con respecto al formulado no irradiado en la misma concentración. Por su parte, comparados entre sí, ambos formulados irradiados presentaron diferencia altamente significativa en la mortalidad de larvas ($t_{\text{obs}}=-5.0000$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10).

Contra larvas de *Spodoptera exigua* probados en concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, los resultados fueron similares encontrando reducciones en la mortalidad del 68.7% para el extracto irradiado en comparación con el extracto sin irradiar ($t_{\text{obs}}=-33.0000$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10). Mientras que los formulados, F1-M21 y F2-M21, mostraron menores reducciones

en la mortalidad contra este insecto plaga del 8.3% ($t_{obs}=-8.4853$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) y 8.3% ($t_{obs}=-4.6018$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10), respectivamente. De igual manera, la comparación entre sí de ambos formulados irradiados presentan diferencia significativa en la mortalidad contra larvas neonatas del insecto anteriormente mencionado ($t_{obs}=-2.8604$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10).

Contra *Helicoverpa zea*, la reducción de la mortalidad del extracto sin formular irradiado comparado con el no irradiado fue del 59.0% ($t_{obs}=-35.2943$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) al probarlo a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de concentración. Mientras que el formulado F1-M21 irradiado mostró menores reducciones en la mortalidad contra larvas de este insecto del 4.1% ($t_{obs}=-3.3541$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10) así mismo; el formulado F2-M21 irradiado mostró reducciones del 5.6% con respecto al formulado no irradiado ($t_{obs}=-3.1623$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10). Comparados entre sí, ambos formulados irradiados no presentan diferencia significativa en la mortalidad de larvas de *Helicoverpa zea* ($t_{obs}=-1.5811$, $t_{0.05}=2.228$, g.l.=10).

Tabla 24. Efecto de Irradiación con Luz Ultra Violeta de 254 nm λ durante 72 Horas sobre el Extracto Insecticida sin Formular y Formulados Preparados de la Cepa Nativa M2-1 de *Bacillus thuringiensis*, contra Larvas Neonatas de Insectos de Prueba.

Tiempo de exposición	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulado	Porcentaje de mortalidad ^a		% de reducción
			Irradiado	No irradiado	
<i>Trichoplusia ni</i>					
72 h	0.5	Bt sin formular	11.0	75.6	64.6
72 h	0.5	F1-M21	45.8	54.1	8.3
72 h	0.5	F2-M21	52.7	59.0	6.3
<i>Spodoptera exigua</i>					
72 h	5.0	Bt sin formular	18.7	87.4	68.7
72 h	5.0	F1-M21	42.3	50.6	8.3
72 h	5.0	F2-M21	46.5	54.8	8.3
<i>Helicoverpa zea</i>					
72 h	50.0	Bt sin formular	31.2	90.2	59.0
72 h	50.0	F1-M21	72.2	76.3	4.1
72 h	50.0	F2-M21	74.9	80.5	5.6

^aPromedio de seis repeticiones.

7.12 ANÁLISIS PROTEICO.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró que las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1 tuvieron un patrón proteico similar al informado para *Bacillus thuringiensis* serov. *kurstaki*, con proteínas de 130 y 70 kDa bien definidas, además se observan otras bandas de proteínas en el carril de la M2-1 de aproximadamente 100 kDa (Figura 4). La presencia de las bandas cercanas a los 65 y 70 kDa corresponde a las proteínas cry2, mientras que las proteínas con pesos moleculares de 130 kDa corresponden con el gen cry1.

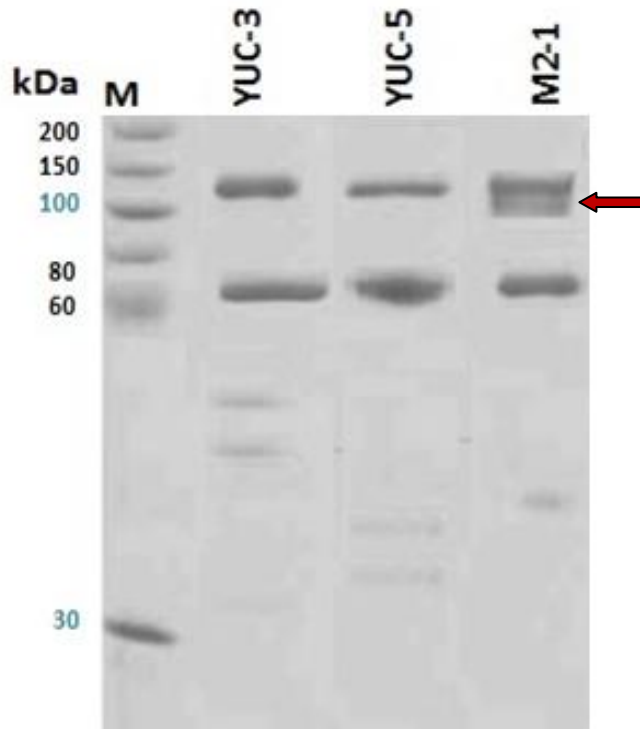


Figura 4. Análisis comparativo de la composición de los cristales de cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1 de *Bacillus thuringiensis* determinados mediante SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida. Carriles M: marcador de peso molecular.

7.13 PERFIL DE PLÁSMIDOS. El análisis de PCR de las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1 revela la presencia de fragmentos amplificados de 0.5-0.8 pb característicos de los genes Cry (Figura 5).

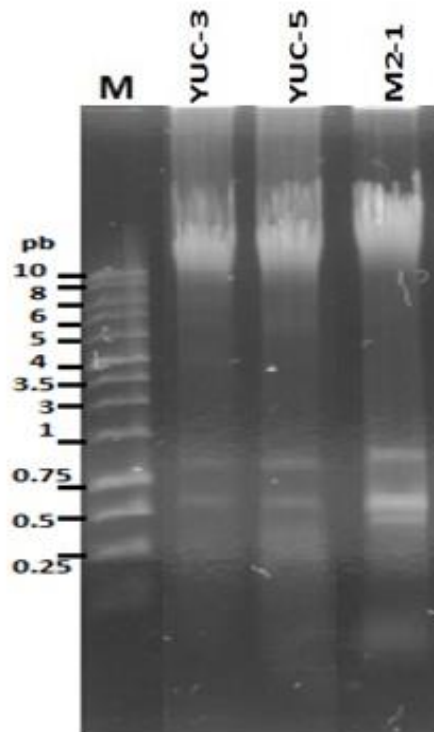


Figura 5. Gel de agarosa al 5%. Análisis comparativo de los fragmentos amplificados de los genes Cry de *Bacillus thuringiensis* YUC-3 (carril 2), YUC-5 (carril 3) y M2-1 (carril 4). Carril 1: marcador de peso molecular.

7.14 GENES CRY. Las tres cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* estudiadas en las formulaciones fueron posteriormente caracterizadas en términos de la presencia de genes cry, utilizando oligonucleótidos generales para los genes cry1 y cry2. La amplificación del gen cry1 se realizó a partir del DNA de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Los oligonucleótidos 5'CATGATTCATGCGGCAGATAAAC3' directo y el reverso 5'TTGTGACACTTCTGCTTCCATT3', se utilizaron para amplificar 277 pb que contienen el gen cry1. De igual manera, para el cry2 se utilizaron los oligonucleótidos 5'GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG3' directo y el reverso 5'CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT3' para amplificar 689-701 pb que contienen el gen cry2. El DNA extraído de las cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1 fueron

amplificadas con los oligonucleótidos para el gen cry1, obteniendo que estos tres aislados nativos fueran positivos para cry1 de igual manera, los amplificadas para cry2 dieron bandas bien definidas para las tres cepas nativas analizadas. En la Figura 6 se muestra el contenido de los genes examinados en las cepas nativas.

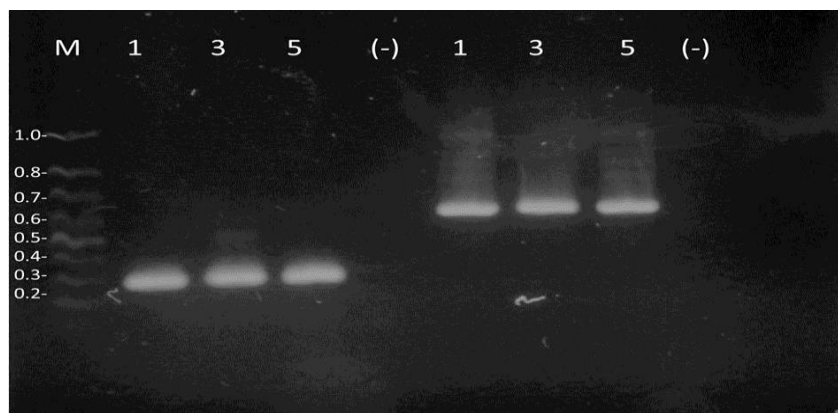


Figura 6. Gel de agarosa al 1%. Análisis de Genes Cry de las cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1 de *Bacillus thuringiensis*. M: marcador, 1: M2-1, 3: YUC-3, 5: YUC-5. Marcador de Peso Molecular (100 bp DNA Ladder, GenScript, Piscataway, NJ), unidades de la imagen en Megabases Mb

También es importante mencionar que en el gel de agarosa al 1% se logran observar la presencia de unas bandas más intensas que otras, estas diferentes intensidades podrían estar relacionado a la complejidad genética de *Bacillus thuringiensis* y que estas cepas nativas puedan contener subgrupos del gen cry que comparten homología con los cebadores o que podría tratarse de genes posiblemente nuevos y con potencial de ser tóxicos contra otros insectos plaga.

7.15 PRODUCCIÓN DE β -EXOTOXINA. Los resultados que se observan en la Tabla 25 indican la absorbancia de los precipitados etanólicos analizados de las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1, los cuales presentaron resultados similares al Control Negativo (HD-1), con una absorción de onda 0.0608, 0.0306 y 0.0372 nm, respectivamente. Mientras que *Bacillus thuringiensis* HD-59 (Control Positivo) presentó valores de absorbancia (Control Positivo) de 0.725 y 0.791 a 251 y 272 nm de λ ; respectivamente, lo que indica que las cepas nativas aisladas carecen de la producción de la β exotoxina.

Tabla 25. Espectro de absorción ultravioleta de los precipitados etanólicos de las cepas nativas y de referencia de *Bacillus thuringiensis*.

Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Medio Conner y Hansen	
	Absorbancia	
	251 nm	272 nm
YUC-3	-0.0230	0.0608
YUC-5	-0.0620	0.0306
M2-1	-0.0640	0.0372
IB-7	-0.0520	0.0277
IB-62	-0.0135	0.0234
HD-59 (+)	0.7250	0.7910
HD-1 (-)	-0.0650	0.0205

8. DISCUSIÓN

Frecuentemente las cepas de *Bacillus thuringiensis* son aisladas de muestras de suelo, utilizando técnicas simples con medio selectivo y análisis morfológico. La toxicidad puede variar significativamente de acuerdo al polimorfismo, incrementando o decreciendo la eficiencia y la especificidad hacia el organismo blanco. La característica más distintiva de *Bacillus thuringiensis* es la presencia de las inclusiones cristalinas de naturaleza proteica. La morfología, tamaño y número de las inclusiones paraesporales varían entre las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*. Aunque generalmente predomina la forma bipiramidal, es posible encontrar otros cristales de forma esférico-amorfo, rectangular y cuadrado. Carreras (2003) advirtió cristales bipiramidales de diferentes tamaños, así como cúbicos y amorfos en un grupo de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* estudiadas. Esto también coincide con los criterios de otros autores, al señalar que las subespecies de *Bacillus thuringiensis* pueden sintetizar más de una inclusión parasporal (Del Rincón-Castro *et al.*, 2006). Así mismo, Carreras (2003) reportó cristales bipiramidales de diferentes tamaños, además de cúbicos y amorfos en un grupo de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. El cristal bipiramidal se asocia a la toxicidad contra insectos lepidópteros y la presencia de la proteína Cry I, mientras que los cristales cúbicos y ovoides se asocian a la toxicidad tanto contra lepidópteros como dípteros y cuya inclusión está relacionada con la proteína Cry II (Federici, 1999).

Del Rincón-Castro *et al.* (2006), al analizar tres cepas nativas del estado de Guanajuato, México, también observaron cristales bipiramidales típicos de las cepas de *Bacillus thuringiensis*. Adicionalmente apreciaron una inclusión cuadrada aplanada más pequeña. En el análisis de la morfología del cristal de las cepas nativas aisladas de suelo de Yucatán y Chiapas permiten precisar la presencia de cristales de forma bipiramidal (pequeño a grande), cuadrado e irregular redondeado. Estos resultados nos muestran que las cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas sintetizaron más de una inclusión parasporal como se describe para la cepa HD-1, la cual presenta cristales bipiramidales acompañados de cristales cuboidales que son tóxicas a lepidópteros y dípteros.

Los ensayos biológicos son esenciales en la determinación de las cepas de *Bacillus thuringiensis* para posicionarlo en formulaciones de insecticidas biológicos (Melo *et al.*, 2013). Posteriormente, a nuestras cepas nativas se midió su actividad tóxica mediante bioensayos utilizando dieta artificial Shorey. Los resultados de la actividad tóxica de las de nuestras cepas nativas aisladas de suelo de Yucatán y Chiapas muestran que hubo una alta actividad contra tres plagas, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, mucho mayor en el caso de *Trichoplusia ni*. Al utilizar dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta encontramos mortalidad superior del 95.8% contra estos insectos para casi todas las cepas nativas. Al disminuir la dosis a 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en los bioensayos preliminares encontramos que algunas cepas nativas mantuvieron la misma mortalidad que con la dosis anterior, las cuales se fueron perfilando con mayor potencial tóxico contra cada uno de los insectos prueba, tal es el caso de las cepas YUC-3, YUC-5, YUC-7, YUC-9 y YUC-11 que mostraron significativamente mayor toxicidad contra *T. ni* probadas a concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, como también para las cepas YUC-3, YUC-5, YUC-7, YUC-8, M2-2 y M2-5 contra *Spodoptera exigua* probadas a concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, así como las cepas YUC-17, YUC-20, M2-1 y M2-11 contra *Helicoverpa zea* probadas a concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Sin embargo, al disminuir la concentración a 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ encontramos que estas cepas, no lograron superar el 70.8% de mortalidad contra estos insectos. En resultados de Flores *et al.*, 2011 aislaron 54 cepas nativas de suelo agrícola encontrando mortalidades del 71.93% al ser aplicado a concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Del mismo modo, De Luna, 2014 reportó CL_{50} de 68.5 y 77.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dieta para las cepas HD-551 y HD-133 contra *Spodoptera exigua* en bioensayos en laboratorio, por lo cual nuestras cepas mostraron mayor actividad tóxica.

Estas mortalidades obtenidas muestran la diferente susceptibilidad de los insectos hacia las distintas cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Suelo de Yucatán y Chiapas. Con estos resultados encontramos que *Trichoplusia ni*, es un lepidóptero muy susceptible a la mayoría de las cepas de *Bacillus thuringiensis* a diferencia de *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, en las cuales se han reportado resistencia a este bioinsecticida. A partir de estos resultados preliminares y en base a los análisis de varianza se determinó que existió una diferencia significativa en la toxicidad de las cepas nativas contra los insectos

prueba por lo que se decidió seleccionar algunas de estas cepas para la determinación de la CL_{50} .

Bajo las mismas condiciones de los bioensayo preliminares, se realizó la determinación de las concentraciones letales medias (CL_{50} y CL_{90}) donde se encontró que una de las cepas nativas, YUC-5, fue superior a las cepas de referencia HD-1 y GM-7 contra *Trichoplusia ni*, mostrando $0.108 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, las demás cepas nativas YUC-3, YUC-7, YUC-9 y YUC-11 también mostraron alta actividad, de 0.136 a $0.220 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, comparables a la actividad tóxica mostrada por las cepas de referencia. Contra *Spodoptera exigua*, de nuestras cepas nativas solo la YUC-5 mostró toxicidad parcialmente semejante a las cepas de referencia, mientras que las restantes mostraron valores mayores de CL_{50} . En lo que respecta a actividad toxica contra *Helicoverpa zea*, solo dos cepas nativas mostraron mediana toxicidad, las cepas YUC-17 y YUC-20 que presentaron 2.294 y $2.511 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente; sin embargo estas fueron casi 10 veces mayores que las cepas de referencia. Las cepas de referencia utilizadas, HD-1, GM-7, IB-7, e IB-62, han exhibido alta actividad insecticida contra las especies de lepidópteros probados (Galán Wong, 1993, Tamez-Guerra *et al.*, 1998, Maldonado Blanco *et al.*, 2012) sin embargo, encontramos diferentes valores de CL_{50} reportados por otros investigadores, que han utilizado estas mismas cepas en bioensayos contra los mismos insectos plaga, como Muñiz (2009) quien preparó el inóculo de sus fermentaciones a partir de Caldo Triptosa Fosfato y después cultivó las cepas en medio constituido por (g/l): 20 de melaza y 20 de harina de soya, reportando CL_{50} de 4.97 y $30.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para las cepas GM-7 y HD-1, respectivamente, contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, lo cual resulta en valores mucho mayores que las reportadas por nosotros: Quizá esto se pueda deber a las diferentes técnicas de bioensayo o los medios utilizados para la producción del complejo espora-cristal.

En relación a esto, Rosas-García (2008) reportó CL_{50} mayores para HD-1 contra *Spodoptera exigua* de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es más de 125 veces mayor que la CL_{50} encontrada por nosotros para HD-1 de $0.398 \text{ mg}/\text{cm}^2$ y que fue significativamente semejante a la toxicidad presentada por nuestra cepa nativa YUC-5 contra *Spodoptera exigua*. Contra *Helicoverpa zea*, las cepas nativas YUC-17, YUC-20, M2-1 y M2-11 mostraron CL_{50} significativamente mayores en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2.294 , 2.511 , 1.697 y 1.701 respectivamente) que las cepas de referencia, que fueron casi 10 veces más tóxicas. Encontrar cepas más tóxicas

contra este insecto es un reto, debido a la tolerancia natural que han desarrollado algunas poblaciones de campo, hacia la toxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* del algodón transgénico Bollgard®, que se cultiva en algunas regiones (Stone y Sims, 1993, Jackson *et al.*, 2004) y que contribuye al desarrollo de la resistencia debido al contacto continuo entre la poblaciones de campo y la toxina de *Bacillus thuringiensis*.

En la comparación de medias de las CL₅₀ de las cepas nativas contra las de referencia utilizando un nuevo medio de cultivo soluble, variando la Fuente de Carbono y Nitrógeno, en un medio balanceado con tasa de C:N (7:1), se encontró que las cepas nativas presentaron CL₅₀ mayores y por lo tanto con menor toxicidad contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* en comparación a las producidas en medio melaza. Solo la cepa M2-9, originaria del estado de Chiapas presentó menor CL₅₀ en medio soluble, de 0.215 µg/cm².

Cuando se evaluaron contra *Spodoptera exigua*, solo la cepa YUC-3 presentó menor CL₅₀, (0.391 µg/cm²) 7 veces menos, para el extracto producido en medio soluble que en medio de melaza, indicando mayor toxicidad, mientras que las restantes cepas nativas presentaron igual CL₅₀ en medio melaza que en medio soluble.

En la evaluación contra *Helicoverpa zea*, se encontró que las CL₅₀ de los extractos producidos en medio melaza fueron similares a las CL₅₀ de los extractos producidos en medio soluble, únicamente mostraron diferencia las CL₅₀ de las cepas de referencia, siendo casi 10 veces menores en medio de melaza que en medio soluble.

En el reporte de Swiecicka *et al.*, 2008 aislaron una nueva cepa (IS5056) de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo presentando CL₅₀ de 16.9 µg/mL contra *Trichoplusia ni* sin embargo, no presenta toxicidad contra larvas de *Spodoptera exigua*, lo que hace a este nuevo aislado específico contra *Trichoplusia ni*. Por su parte, en los trabajos de Zenner *et al.*, 2009 encontraron bajo condiciones de laboratorio respuesta de larvas neonatas de *Helicoverpa zea* al utilizar la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac obteniendo CL₅₀ de 6.12 µg/mL la cual es mayor a la presentada por nuestros aislados.

Es de interés mencionar que en un estudio realizado se comparó la producción de proteínas Cry por parte de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas y el estándar internacional HD-1 en dos medios de cultivo, GTE (glucosa-triptonaextracto de levadura) y el medio de referencia Luria-Bertani, encontrándose que la producción de proteínas Cry

dependen tanto del medio de cultivo como de la cepa y que diferentes fuentes de nutrientes pueden afectar la velocidad de síntesis de las δ -endotoxinas y el tamaño de los cristales, (Carreras, 2005).

Estos resultados sugieren que las diferencias en la toxicidad se deben a una variación natural de la bacteria entre los insectos más que a una variación causada por la resistencia que pudieran desarrollar los insectos a la δ -endotoxina, son consistentes con previas investigaciones realizadas por Delécluse *et al.*, 2000 donde sugieren que la variabilidad y la mortalidad causada por la δ -endotoxina es debido a diferencias genéticas entre las poblaciones de insectos. Saadoun *et al.*, 2001 a través de un estudio en respuesta a dos poblaciones de insectos comprobaron que los modelos de las potencias relativas entre las cepas no fueron similares entre las poblaciones probadas, lo que sugiere que los resultados obtenidos con una cepa no necesariamente predicen los resultados de otra cepa. Los valores altos de las pendientes, obtenidos en los bioensayos, son el resultado de una población homogénea mientras que los valores bajos reflejan una gran heterogeneidad de la población, comportamiento que refleja la resistencia de los insectos a un bioinsecticida (Hemingway, 2002).

A partir de los resultados de CL_{50} obtenidos, ya sea en medio de melaza o medio soluble, se determinó que los extractos de las cepas YUC-5, YUC-3 y M2-1, fueron los que presentaron la menor CL_{50} en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 0.108, 0.391 y 1.697 contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, respectivamente; por lo que, decidimos que estas cepas fueran posteriormente formuladas con polímeros naturales y un fotoprotector para probarlas contra los insectos de prueba. Por cada extracto nativo que mostró mayor actividad tóxica contra cada uno de los insectos plaga, se diseñaron dos formulaciones en donde se utilizó un 10% del complejo espora-cristal y se agregaron diferentes sustancias como polímeros naturales, acarreadores y protectores de la luz ultra violeta, para obtener dos formulaciones (F1 y F2) las cuales fueron secadas por aspersión.

En un estudio llevado a cabo por Rosas García *et al.*, 2009 con el fin de evaluar distintas formulaciones de *Bacillus thuringiensis* determinaron que la combinación de almidón modificado, gelatina porcina y mazorca de maíz presentaron mortalidad superior del 60% contra larvas neonatas de *Spodoptera exigua* al combinar estas matrices con 70g/kg de *Bacillus thuringiensis*. Otros intentos se han llevado a cabo, mediante el uso de

polímeros naturales, en el reporte de Morales Ramos *et al.*, 2000 determinaron que las formulaciones utilizando pectina o almidón produjeron al menos 94% de mortalidad larval contra *Spodoptera frugiperda* (Smith) y 72% de mortalidad al utilizar gelatina.

La comparación de medias de CL_{50} de formulados preparados con la cepa YUC-5 (F1-5 y F2-5) mostró que el formulado F2-5, con 1% de pectina y 5% de harina de maíz, presentó significativamente la menor CL_{50} contra *Trichoplusia ni* ($0.133 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), seguido del formulado F1-5, compuesto por 4% de pectina y 2% de harina de maíz, mostrando mejor actividad que el producto comercial [®]Dipel 2X.

Sin embargo, al ser aplicados contra *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, encontramos menor actividad tóxica de cada que el producto comercial[®]Dipel 2X.

Otros investigadores como Tamez-Guerra *et al.*, (1999) han reportado cepas que presentan menor mortalidad contra *Trichoplusia ni*, como es el caso de la cepa C-9, que mostró CL_{50} de 219 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dieta usando formulaciones asperjables..

Cuando la cepa YUC-3 se formuló con los mismos polímeros y en la misma proporción que los formulados de la cepa YUC-5, los formulados preparados (F1-3 y F2-3) mostraron que la actividad tóxica contra *Trichoplusia ni* fue significativamente igual al Dipel 2X, en el caso del formulado F2-3, mientras que para el formulado F1-3 fue menor. Sin embargo, cuando fueron probados contra *Spodoptera exigua*, la actividad de ambos formulados fue significativamente mayor al producto comercial [®]Dipel 2X. De igual manera, cuando se probaron contra *Helicoverpa zea* los formulados mostraron menor actividad que el [®]Dipel 2X.

Cuando la cepa M2-1 originaria de Chiapas fue formulada con los polímeros y proporciones ya mencionados anteriormente (formulados F1-M21 y F2-M21), la comparación de medias de CL_{50} mostró que el formulado F2-M21 presentó significativamente igual CL_{50} contra *Trichoplusia ni* en comparación con el producto comercial [®]Dipel 2X.

García Rodríguez *et al.* (2015) formularon la cepa HD-1 en microcápsulas de almidón de amaranto modificado por fosforilación y succinilación, donde encontraron CL_{50} de 885.4 ng/cm^2 contra larvas de 1er estadio de *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae).

Las condiciones óptimas de secado por aspersión han sido utilizadas por Aroonrat *et al.*, 2003 utilizando temperaturas de entrada de 60-85°C y temperatura de salida de 180°C.

Otros investigadores han reportado la preparación de formulaciones en forma de microcápsulas en un biogel, contra *Choristoneura rosaceana* Harris (Lepidoptera: Tortricidae), que fue diez veces más baja que el Dipel® (Byeong *et al.*, 2012).

Se han revisado también los efectos de biopolímeros con y sin fagoestimulantes que pueden tener influencia sobre la preferencia de *Spodoptera exigua*, como en el reportado por De Luna *et al.*, 2011 quienes mencionan que la larva tiene preferencia por las matrices de gelatina y pectina adicionadas con espiga de maíz sobre hojas frescas de col.

También Coté *et al.* (2001) formularon la cepa HD-1 en microcápsulas de alginato y encontraron baja toxicidad contra *C. rosaceana* que fue atribuida a la baja concentración de ingrediente activo agregada (3.5 µg/cm²) y a la biodisponibilidad del HD-1 en el intestino de las larvas.

Las combinaciones del ingrediente activo/polímeros/protector solar, de nuestros formulados, después del secado por aspersión presentaron los porcentajes de humedad de 5.8-6.08% en los formulados sin ingrediente activo, mientras que para los formulados que incluyen el ingrediente activo encontramos valores de 6.3-8.11%.

En nuestros bioensayos de laboratorio para determinar el efecto de almacenamiento en la actividad insecticida del complejo espora-cristal y de cada una de las formulaciones diseñadas, los resultados que se mantienen estables hasta por 90 días sin pérdida de la actividad insecticida. Rosas García (2006) encontró resultados semejantes al probar diferentes formulaciones mantenidas en condiciones de laboratorio.

Tamez-Guerra *et al.*, (1999) reportó la conservación de más del 90% de la actividad original de sus formulaciones de almidón de maíz y harina de maíz nixtamalizado después de 24 meses de almacenamiento a 25°C.

En los resultados obtenidos, del efecto de la luz ultravioleta de 254 nm λ sobre la actividad insecticida del extracto YUC-5 de *Bacillus thuringiensis* sin formular y formulados preparados, se encontraron reducciones significativas del extracto sin formular, respecto al no irradiado del 54.2-87.4% después de 72 horas de exposición a la luz ultravioleta, mientras que los formulados irradiados mostraron reducciones del 3.9-12.5%.

Los formulados preparados con el ingrediente activo YUC-3 de *Bacillus thuringiensis*, F1-3 y F2-3, después de la irradiación con luz ultravioleta presentaron menores reducciones en la actividad insecticida (4.2%-7.6%) comparados con el extracto insecticida sin formular, que presentó reducciones del 61.1%-84.0%.

De igual manera, los formulados preparados con el ingrediente activo M2-1 de *Bacillus thuringiensis*, (F1-M21 y F2-M21), después de la irradiación con luz ultravioleta presentaron menores reducciones en la actividad insecticida (4.1%-8.3%) comparados con el extracto insecticida sin formular, que presentó reducciones del 59%-68.7%.

Relacionado a esto, Zhang *et al.*, 2015 reportaron una disminución del 90% en la actividad tóxica de la δ endotoxina sin formular después de 8 horas de irradiación ultravioleta, mientras que cerca del 50% de la actividad tóxica permaneció en formulaciones preparadas con ácido poliláctico después de 12 horas de irradiación.

De esta manera se confirma que la adición de polímeros y fotoprotector protege la actividad de la toxina de *Bacillus thuringiensis* de la radiación ultra violeta, lo cual podría extender su actividad una vez aplicadas en campo.

Maldonado Blanco *et al.*, (2002) reportaron variaciones del 4-54% en la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* obtenida con formulaciones de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. De igual manera, Liu *et al.*, (1993) en formulaciones con *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, probó el pigmento melanina y encontró que después de la exposición a la luz ultravioleta, las formulaciones conteniendo 3.4 $\mu\text{g/ml}$ de melanina protege casi completamente la actividad larvicida de la radiación ultravioleta.

Respecto a la determinación del perfil de proteínas de las cepas nativas más tóxicas, YUC-5, YUC-3 y M2-1, los resultados obtenidos permitieron calcular el peso molecular de las toxinas presentes. La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las suspensiones de esporas y cristales muestra que las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1 tuvieron un patrón proteico similar al informado para *Bacillus thuringiensis* serov. *kurstaki*, con proteínas de 130 y 70 kDa bien definidas.

La caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* es de gran importancia ya que puede ayudar a conocer la distribución de genes *cry* y entender el rol de esta bacteria en el ecosistema y poder así predecir la actividad insecticida a partir de la identificación de genes *cry* y detectar nuevos genes *cry*. El análisis de PCR de las cepas YUC-3, YUC-5 y M2-1

revela la presencia de fragmentos amplificados característicos de los genes Cry comparados con un patrón de plásmidos similar a la cepa HD-1. Es importante mencionar que en algunas cepas se ha observado que las bandas son más intensas que otras, estas diferentes intensidades podrían estar relacionadas a la presencia de subgrupos en ella que no pueden diferenciarse con el uso de primers universales, también podría deberse a que en estas cepas el número de plásmidos es diferente o quizá a una diferencia en la cantidad del ADN en la muestra.

Las tres cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* estudiadas en las formulaciones fueron posteriormente caracterizadas en términos de la presencia de genes cry, utilizando oligonucleótidos generales para los genes cry1 y cry2. El análisis reveló que las cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1 contienen estos dos genes.

Por lo que se refiere a la β -exotoxina puede ejercer efectos dañinos en diferentes organismos inclusive especies benéficas; es particularmente activa contra especies de dípteros, pero también contra especies de coleópteros, lepidópteros y algunas especies de nemátodos. Los resultados de los análisis espectrofotométricos de los precipitados etanólicos de las cepas nativas YUC-3, YUC-5 y M2-1, presentaron resultados similares al control negativo (HD-1) con absorción de 0.0608, 0.0306 y 0.0372 nm, respectivamente, por lo que puede decirse que no producen β -exotoxina, que podría impedir su utilización futura en formulaciones.

Los resultados expuestos revelan que en suelos agrícolas del Estado de Yucatán y Chiapas existen bacterias formadoras de esporas y que sintetizan inclusiones cristalinas, con un alto potencial para utilizarse como bioinsecticidas, una alternativa para el control de lepidópteros los cuales afectan la productividad y causan grandes pérdidas en los cultivos agrícolas, lo que en consecuencia originaría problemas de abastecimiento de alimentos para una población que cada día aumenta su tasa de crecimiento.

9. CONCLUSIONES

1. Se han aislado 24 cepas nativas de suelo del Estado de Yucatán y 11 cepas nativas del Estado de Chiapas, ambas provenientes de suelo de cultivo agrícola y mostrando actividad tóxica contra tres insectos plaga, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*.
2. Las cepas estudiadas contienen una mezcla de cristales de diferentes tamaños y formas, desde bipiramidales, cúbicos y redondos amorfo.
3. Del total de cepas analizadas 3 fueron altamente tóxicas contra *Trichoplusia ni*, 4 contra *Spodoptera exigua* y 2 contra *Helicoverpa zea*, estas cepas fueron cultivadas en medio melaza y medio soluble de Jarabe de maíz para la producción de la δ -endotoxina, dando un rendimiento cercano a los 15 g/l.
- 4.- En bioensayos preliminares se seleccionaron 14 cepas para la determinación de CL_{50} , donde las cepas nativas más tóxicas fueron: la YUC-5 que mostró $0.108 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra *Trichoplusia ni*, la cepa YUC-3 presentó $0.391 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra *Spodoptera exigua* y la cepa M2-1 presentó $1.697 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra *Helicoverpa zea*.
5. La cepa YUC-5 presentó 0.108 de CL_{50} , contra *Trichoplusia ni*, siendo significativamente más tóxica que las cepas de referencia GM-7 y HD-1, mientras que contra *Spodoptera exigua* la toxicidad fue similar a IB-62 y HD-1
- 6.-Las cepas nativas YUC-17 y YUC-20 que se probaron contra *H. zea* resultaron casi diez veces menos tóxicas que las cepas de referencia.
- 7.- Cuando las cepas nativas y de referencia se cultivaron en medio soluble conteniendo jarabe de maíz y extracto de semilla de girasol, presentaron CL_{50} mayores y por lo tanto menos toxicidad en comparación a las producidas en medio melaza, a excepción de la cepa M2-9 y YUC-3, que presentaron CL_{50} menores en medio soluble.
8. Los extractos insecticidas más tóxicos resultaron ser los producidos por las cepas nativas YUC-5, YUC-3 y M2-1 contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, respectivamente, las cuales posteriormente se formularon con mezclas de polímeros naturales y fotoprotector.
9. La comparación de medias de CL_{50} de formulados preparados con la cepa YUC-5 mostró que el formulado F2-5, con 1% de pectina y 5% de harina de maíz, presentó significativamente la menor CL_{50} contra *Trichoplusia ni* ($0.133 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), seguido del

formulado F1-5, compuesto por 4% de pectina y 2% de harina de maíz, mostrando mejor actividad que el producto comercial [®]Dipel 2X.

10.- Los formulados F1-5 y F2-5 de la cepa YUC-5, al ser aplicados contra *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, presentaron menor actividad toxica que el Dipel 2X.

11.- Los formulados preparados de la cepa YUC-3 (F1-3 y F2-3) mostraron que la actividad tóxica contra *T. ni* fue significativamente igual al Dipel 2X, para el formulado F2-3 , mientras que para el formulado F1-3 fue menor.

12.-Cuando los formulados anteriores (F1-3 y F2-3) fueron probados contra *S. exigua*, la actividad de ambos formulados fue significativamente mayor al producto comercial [®]Dipel 2X.

13. Los formulados F1-3 y F2-3, cuando se probaron contra *Helicoverpa zea* mostraron menor actividad que el producto comercial [®]Dipel 2X.

14.- Los formulados F1-M21 y F2-M21, preparados con la cepa M2-1 cuando se probaron contra *S. exigua* y *H. zea*, no superaron la actividad del producto comercial [®]Dipel 2X .

15. El formulado F2-M21 presentó significativamente igual CL₅₀ contra *Trichoplusia ni* en comparación con el producto comercial [®]Dipel 2X y menor CL₅₀ que el F1-M21.

16. Las formulaciones preparadas de estas mantuvieron su actividad tóxica por 90 días sin pérdida significativa, almacenadas a temperatura de 20-35°C y 80% de Humedad relativa.

17. Los extractos insecticidas sin formular después de 72 horas de irradiación con luz ultravioleta presentaron reducciones del 59-87.4% en la mortalidad de larvas neonatas de los insectos prueba

18. Las formulaciones irradiadas presentaron menores reducciones (3.9-12.5%) en la mortalidad de las larvas neonatas en comparación con formulaciones no irradiadas.

19. Los genes *cry 1* y *cry 2* están presentes en las tres cepas nativas estudiadas (YUC-3, YUC-5 y M2-1), aunque posiblemente la cepa M2-1 pudiera tener otros plásmidos de tamaño diferente.

20. Las cepas posiblemente puedan tener actividad tóxica contra dípteros.

21. Las cepas caracterizadas podrían desarrollarse en el futuro como bioinsecticidas alternativos para el control de plagas que representan un problema importante en algunos cultivos y en las regiones de donde fueron aisladas donde estas plagas sean un problema para los cultivos.

10. PERSPECTIVAS

- 1.- Es necesario ampliar el estudio con mayor número de muestras que sean colectadas en otras regiones del País y otros hábitats, para conocer la distribución de la bacteria en un ambiente tan diverso como lo es nuestro País.
- 2.- Incrementar y apoyar las investigaciones sobre *Bacillus thuringiensis*, por sus potenciales aplicaciones en los campos de la salud, agricultura y medio ambiente.
- 3.- Realizar la caracterización genética utilizando *primers* específicos, para identificar a nivel de subespecies.
- 4.- Diseñar otras condiciones de cultivo, para obtener aislados de *Bacillus thuringiensis* con alta actividad insecticida para producir proteínas cristal a gran escala y aplicarla para biocontrol.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, S.R., Aref, A.A. y Smith M.S. 1992. Palatable solid pesticidal compositions of ethylene and vinyl acetate copolymer. US Patent. 5:135,744.
- Al-yahyaee, S. A. y Ellar, D. J. 1995. Maximal toxicity of cloned Cyt1A δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both N- and C-termini. *Microbiology*141:3141-3148.
- Angus, T.A. 1954. Use of methyl cellulose in laboratory tests of bacterial pathogens of insects. *Can. Ent.*86:206.
- Amin, G., Alotaibi, S., Narmen, Y. y Saleh, W. D. 2008. Bioinsecticide production by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. 1. Pattern of cell growth, toxin production and byproduct synthesis. *Arch. Agron. Soil. Sci.* 54(4): 387-394.
- Aroonrat, T. A., Manop, S. y Uthai, K. 2003. Preparation of Spray-Dried Wettable Powder Formulations of *Bacillus thuringiensis*-Based Biopesticides. *J. Econ. Entomol.* 96(2):292-299.
- Betz, F. S., Forsyth, S. F. y Stewart, W. E. 1990. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in North America. Safety of Microbial insecticides, Laird M., Lacey, L. y Davidson (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 3-10.
- Barrows, B.D, Haslam, S. M., Bischof, L. J., Dell, A. y Arojan, R. V. 2007. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in *Caenorhabditis elegans* from loss of fucose. *J. Biol. Chem.* 282, 3302–3311.
- Behle, R.W., McGuire, M.R. y Shasha, B.S. 1996. Extending the residual activity of *Bacillus thuringiensis* with casein based formulations. *J. Econ. Entomol.* 89:1399–405.
- Behle, R.W., McGuire, M.R., Gillespie, R.L. y Shasha, B.S. 1997. Effects of alkaline gluten on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 90:354–60.
- Behle, R.W., Tamez-Guerra, P., Shasha, B.S. y McGuire, M.R. 1999. Formulating bioinsecticides to improve residual activity. Formulations Forum'99. Orlando, FL, USA.

- Ben-Dov, E., Einav, M., Peleg, N., Boussiba, S. y Zaritsky, A. 1996. Restriction map of the 125-kilobase plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 2:3140–3145.
- Benintenden, G., López Meza, J., Cozzi, J., Piccinetti, C. e Ibarra, J. 2000. Characterization of INTA 51-3, a New Atypical Strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina, *Curr. Microbiol.* 41:396-401, EE.UU.
- Bohm, H.A. y Friend, D.R. 1988. Microcapsules containing insecticidal pathogen stabilised against UV lighth-comprising acrylate-type encapsulating agent wich retains sunscreen, e.g. malachite green. Lim Technical Laboratories. Patent # WO8904170.
- Bohm, H.A. y Friend, D.R. 1990. Microencapsulated insecticidal pathogens. United States Patent. 4:948,586.
- Boniolo, F.S., Rodrigues, R.C., Prata, A.M.R-, López, M.L., Jacinto, T., Silveira, M.M. y Berbert-Molina, M.A. 2012. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ endotoxin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 625-636.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. y Ppeferoen, M. 1992. Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60:247-254.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. y Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect. Biochem. Mol. Bio.* 41:423–431.
- Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortíz, A., Ortíz, M., Lina, L., Villalobos, J., Peña, G., Noez, V., Soberón, M. y Quintero, R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4965-4972.
- Bravo, A. y Soberón, M., 2003. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología Departamento de Biología Molecular. UNAM. www.microbiología.org.mx/micriobiosenlinea/CAPITULO_16/Capitulo_16.pdf
- Bravo, A., Soberón, M., Gómez, C., Muñoz, L., Pardo, L., Galán, L., Luna, H., Alcázar, A., Pereyra, B., Carrillo, J., García, R., L. Serrano, M. Patiño, E. Galindo, M. C. del

- Rincón, J. e Ibarra, E. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev. Latinoamerican. Microbiol.* 48(2):113-120.
- Byeong, Ll. K., W. J. Soon, G. L. Kyoung, J. P. Tae, Y. P. Jung, J. S. Jae, J. L. Seok, and S. L. Chang. 2012. Synthesis of bioactive microcapsules using a microfluidic device. *Sensors* 12: 10136-10147.
- Caballero, P. y Ferré, J. 2000. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Ed. Phytoma. España. pp. 318.
- Carlson, C., Caugant, D. y Kolston, A. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1719- 1725.
- Carr, M.E., Doane, W.M, Wing, R.E. y Bagley, E.B. 1993. Starch encapsulation of biological active agents by a continuous process. US Patent. 5:183,690.
- Carreras, B. 2003. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario. Tesis en opción al título de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana.
- Carreras, B. 2005. Cuantificación por densitometría de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*. *Fitosanidad.* 9:42-46.
- Carroll, J. y Ellar, D. J. 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a lights cattering assay. *Eur. J. Biochem.* 214, 771-778.
- Cheng, H. R. y Jiang, N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol. Lett.* 28: 55-59.
- Connick, W. J., Lewis, J. A. y Quimby, P.C. 1989. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 112.
- Couch, T. L. y Ignoffo, C. M. 1981. Formulation of insect pathogens. H.D. Burges (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases.* Academic. Press, N.Y. 621-634.
- Coté, J. C., C. Vincent, K. H. Son, and S. H. Bok. 2001. Persistence of insecticidal activity of novel bio-encapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Chroristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Phytoprotection* 82: 73-82.

- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, J. y Dean, D. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, J. y Dean, D. 2017. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponible en el sitio de red: http://www.biols.susx.ac.uk./Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. y Dean, D. H. 2017. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. (Consulta: Febrero, 2017).
http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html
- Cross JV, Poloneko DR. 1996. An industry perspective on registration and commercialization of biocontrol agents in Canada. *Can J. Plant. Pathol.*18:446–54.
- De Luna-Santillana, E. 2002. Desarrollo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* a partir de gelatina y/o pectina y evaluación tóxica contra el gusano barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología. FCB. División de Estudios de Postgrado, UANL. Monterrey, N. L. México.
- De Luna-Santillana, E., Rodríguez-Perez, M., Ali-Mahmoud, A., Morales-Ramos, L, Gopal, H. y Arevalo-Niño, K. 2011. Evaluation of Potential Microencapsulated Agents for Oral Entomopathogens with phagostimulant activity against *Spodoptera exigua* (Hüber). *Southwest. Entomol.*4: 432-442.
- DeLuna-Santillana, E. 2014. Desarrollo y evaluación de bioinsecticidas microencapsulados a partir de *Bacillus thuringiensis* y Neem para el control del gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hubner). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico.
- De Luna, E., M. Rodríguez, A. Mohamed, L. Morales, H. Gopal, and K. Arévalo. 2011. Evaluation of potential microencapsulated agents for oral entomopathogens with phagostimulant activity against *Spodoptera exigua* (Hüber). *Southwest. Entomol.* 36: 433-442.
- Del Rincón Castro, M. C., Méndez Lozano, Ibarra, J. E. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano

- cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae)). Folia Entomol. Mex.. 45(2):157-164.
- Delécluse, A., V. Juárez-Pérez y C. Berry. 2000. Vector-active toxins: structure and diversity, p. 101–125. In J.-F. Charles, A. Delécluse, and C. Nielsen-leRoux (ed.), Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Drop data analysis. http://www.dropdata.net/download/PestiSci_L3_6.PDF, cited 4 March, 2004.
- Dulmage, H. T. 1973. Assay and standarization of microbial insecticides. Procedural factors that effect the success of microbial insecticides. Ann. New York Acad. Sci. 217:187-199.
- Dulmage, H. T. 1973. U.S. Assay standard. Report on the adoption of a primary U.S. Reference standard for assay formulations containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Bull. Entomol. Soc. Am.. 19:200-202.
- Dulmage, H. T. 1977. Industrial standarization of microbial pesticides. 1. *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga. 22:121-129.
- Dulmage, H. T., Correa J. A. y Martínez A. J., 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 15:15-20.
- Dunkle, R.L. y Shasha, B.S. 1988. Starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol.17:120–6.
- Dunkle, R. L. y Shasha, B.S. 1989. Response of starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing ultraviolet screens to sunlighth. Environ. Entomol. 18:1035-1041.
- Ejiofor, A.O. y Okafor, N. 1991. Formulation of a flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 spores and crystals asmosquito larvicide. J. Appl. Bacteriol. 71:202–8.
- Ennouri, K., Ben, Hassen H. y Zouari N. 2013. Optimization of bioinsecticides overproduction by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using linear regression. Polish J. of Microbiol. 62: 287-293.

- Farrar Jr RR y Ridgway RL. 1995. Enhancement of activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against four Lepidopterous insect pests by nutrient based phagostimulants. J. Entomol. Sci. 30:29–42.
- Federici, B.A.1999. *Bacillus thuringiensis* in Biological control. Handbook of Biological Control. T. S. Belows y T. W. Fisher (eds) Academic Press, San Diego. pp. 575-712.
- Fernández, Orietta, y Vega, Larrea. 2002. Tecnologías de Producción de *Bacillus thuringiensis*. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 63:110-115.
- Flores, A., Egúsqiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D., Jesus, Y. y Patiño, A. 2011. Biodiversity of *Bacillus thuringiensis* isolated from peruvian agroecosystem and evaluation of bioinsecticidal potential. *Ciencia e Investigación; 14(1): 29-34.*
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO; FAOSTAT. 2012. Trade. <http://www.fao.org/site/342/default.aspx>
- Galán Wong, L. J. 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hübner), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Doctorado, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- García-Rodríguez, A. P., P. Gaytán-Martínez, J. Barrera-Cortés, J. E. Ibarra, F. Martínez-Bustos. 2015. Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivative starches: studies on the propagation “in vitro”. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 38: 329-339.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernández, L., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M. y Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28(1):169-173.
- Guerrero, V. J., Gómez A., Castro J., González C. A. y Santos E. M., 2010. Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. *Tecnología Ciencia educación (imiq).* (11):32-39.

- Hemingway, J., Field, L. y Vontas, J. 2002. An overview of Insecticide resistance. *Science* 298:96-97.
- Huerta, Doris, Acosta, Oscar y Chang, Milagros. 2012. Genetic and molecular diversity of *Bacillus thuringiensis* strains and insecticidal activity potential against *Aedes aegypti*. *An. Fac. med.* 73(3):205-10.
- Ibarra, J., del Rincón, R., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliviera, C., Lanz, H., Rodriguez, M., Sánchez, J., Peña, G. y Bravo, A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *App. Environ. Microbiol.* 69:5269-5274.
- Ignoffo, C.M. y Batzer, O.F. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlighth stability of an insect virus. *J. Econ. Entomol.* 64:850-853.
- Jackson, R. E., J. R. Bradley, Jr., J. V. Van Duyn, and F. Gould. 2004. Comparative production of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) from transgenic cotton expressing either one or two *Bacillus thuringiensis* proteins with or without insecticide oversprays. *J. Econ. Entomol.* 97: 1719-1725.
- Jankevica J. y Zarins I. 1997. Biological control of *Malacosama neustria* L. population with Latvian isolate of nuclear polyhedrosis virus. In: Evans HF, editor. *Microbial insecticides: novelty or necessity?* Symposium Proceedings No. 68 British Crop Protection Council. 285–8.
- Kaelin, P. y Gadani, F. 1994. Ocurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured Tobacco Leaves. *Current Microbiology.* 40:205-209.
- Karamanlidou, G., Lambropoulos, A., Koliais, S., Manousis, T., Ellar D. y Kastritsis C. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8):2277-2282.
- Khedhe, S. Ben., r, Jaoua, S. y Zouari, N. 2014. Overcome of carbon catabolite repression of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* through adequate fermentation technology. *Biotech. Res.Int.* ID 698587:1-9.
- Kranthi, K., Dhawad, C., Naidu, S., Mate, K., Behere, G., Wadaskar, R. y Kranthi, S. 1992. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* . 32:615-636.

- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lasa, R., T. Williams, and P. López. 2009. The attractiveness of phagostimulants formulations of a nucleopolyhedrosis-based insecticide depends on prior insect on diet. *J. Pest. Sci.* 82: 247-250.
- Lebo, Jr. S.E y Detroit, W.J. 1996. Method for microencapsulation of agriculturally active substances. United States Patent. 5:552,149.
- Lisansky SG, Quinlan RJ, Tassoni G. 1993. The *Bacillus thuringiensis* production handbook. Newbury: CPL Press.124.
- Liu, Y. T., J. M. Sui, D. D. Ji, I. H. Wu, C. C. Chou, and C. C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 131-136.
- Losel P, Penners G, Weissmuller J. 1998. Insecticidal attract-and-kill formulations. US Patent 5,707,638.
- Maldonado Blanco, M. G., L. J. Galán Wong, C. Rodríguez Padilla, and H. Quiroz Martínez. 2002. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18: 352-358.
- Maldonado Blanco, M. G., J. F. Ornelas Pérez, M. Elías Santos, and M. Lozano Contreras. 2012. New *B. thuringiensis* isolates with high toxic activity against lepidopteran larvae in Mexico. Proceedings of the 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Buenos Aires, Argentina.
- McGuire, M.R., Gillespie, R.L. y Shasha, B.S. 1994. Survival of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) after exposure to *Bacillus thuringiensis Berliner* encapsulated in flour matrices. *J. Entomol. Sci.* 29:496-508.
- McGuire, M.R., Shasha, B.S. y Lewis, L.C. 1990. Field evaluations of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 83:2207–10.
- McGuire, M.R., Shasha, B.S., Lewis, L.C. y Nelson, T.C. 1994. Residual activity of granular starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 84:631–7.

- McGuire, M.R., Shasha, B.S., Lewis, L.C. y Nelsen, T.C. 1994. Residual activity of granular starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*. J. Econom. Entomol. 87:631-637.
- McGuire, M.R., Streett, D.A. y Shasha, B.S. 1991. Evaluation of starch encapsulation for formulation of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) entomopox viruses. J. Econ. Entomol. 84:1652-6.
- McMullan, P.M. 2000. Utility adjuvants. Weed Technol. 14:792-7.
- Meadows, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice* (ed. P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs). Pp. 193-220. John Wiley & Sons.
- Melo, A., López, A., Vieira, M., Fukunda, M., Soccol, V. y Soccol, C. 2013. Selection of *Bacillus thuringiensis* Berliner strains to control *Aedes aegypti* Linnaeus. J. Biotechnol. Biodiver. 4:78-83.
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P. y Burges, H. D. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. App. Environ. Microbiol. 58: 1344-1350.
- Montermini, A., Nanni, C. y Boselli M. 1993. Integrated defence of poplar: two years trials against *Hyphantria cunea* (Drury) with a new microbial formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* distributed by helicopter. ANNP-BCPC second international symposium on pesticide application techniques, Strasbourg. 433-6.
- Morales, L., M. McGuire, L. Galán, and F. Castro. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. Southwest. Entomol. 25: 59-67.
- Moreno Juárez, M. R. 2007. Tesis: "Caracterización de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* cepas IB62 a IB82". Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Morris, O.N., Converse, V. y Kanagaratnam, P. 1994. Chemical additive effects on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* against *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 88:815-24.

- Mounsef, J.M., Salameh, D., Louka, N., Brandam, C. y Lteif, R. 2015. The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient (K_{La}), on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. 210:100-106.
- Munson, D., Lew, C.W., Gaggero, J.M., y Branly, K. 1996. Aqueous solven encapsulation method, apparatus and microcapsules. US Patent. 5:571,522.
- Muñiz Villarreal, H. M. 2009. Formulación de *Bacillus thuringiensis* mediante el uso de polímeros naturales mediante el método de pasta húmeda y secado por aspersión. Tesis de Licenciatura, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Olivares-Sáenz, E. 1994. Paquetes de diseños experimentales FAUANL (Programa computarizado) Versión 2.5 Facultad de Agronomía Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, Nuevo León México.
- Parekh, S., Vinci, V.A, y Strobel, R.J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54:287–301.
- Pigott, C. y Ellar, D. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71:255-281.
- Prabakaran G, Padmanabhan V, Balaraman K. 2001. Development of a self floating slow release formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and its larvicidal activity. Indian J. Exp. Biol. 39(1):82–4.
- Ragni, A. y Delecluse, A. 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. *Curr Microbiol* 32: 48-54.
- Rhodes, D.J., Powell, K.A., Macqueen, M.P. y Graves, M.P.1990. Controlled Delivery of Biological Control Agents. Capítulo 11. "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M. Ed.) Taylor & Francis. London. N.Y. Philadelphia. 215-231.
- Rosas-García, N. 2006. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. Pest Manag. Sci. 62: 855-861.
- Rosas-García, N. 2008. Advances in developing *Bacillus thuringiensis* based insecticide formulations. Rev. Colomb. Biotechnol. 10: 49-63.

- Rosas-García, N., J. Villegas, and J. Torres. 2009. Design of a *Bacillus thuringiensis*-based formulation that increases feeding preference on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 102: 58-63.
- Saadoun, I.; F. Al-Momani; M. Obeidat; M. Meqdam y A. Elbetieha 2001. Assessment of Toxic Potential of Local Jordanian *Bacillus thuringiensis* Strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex sp.* (Diptera)». *J. App. Microbiol.* 90(6):866-872.
- Salazar-Magallón, Jesús, Víctor M. Hernández-Velázquez, Andrés Alvear-García, Iván Arenas-Sosa y Guadalupe Peña-Chora. 2015. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology.* 68 (1): 103-109.
- Saleh, S. M. Harris, R. F. y Alien, O. N, 1970. Recovery of *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis* from field soils. *Journal of Invertebrate Pathology.* 15:55-59.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T. y Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant. Biotechnol. J.* 9:283–300.
- Sarrafzadeh, M.H. y Navarro, J.M. 2006. The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22:305-310.
- Satinder, K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi y J.R. Vale'ro. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41:323–342.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON). SAGARPA. Mexico.
- Shasha, B.S., McGuire, M.R. y Behle, R.W. 1998. Lignin-based pest control formulations. US Patent 575,0467.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van, R., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. y Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal cristal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

- Schwartz, J., Potvin, L., Chen, X., Brousseau, R., Laprade, R. y Dean, D. 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. FEBS Lett 412:270-276.
- Shapiro, M. y Vaughn, J.L. 1995. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. J. Econ. Entomol. 88(2):265–9.
- Shorey, H. H. and R.L. Hale, 1965. Mass rearing of larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. J. Econ. Entomol. 58:522-524. USA.
- Smirnoff, W.A. y Valero, J.R. 1983. Characteristics of a highly concentrated *Bacillus thuringiensis* formulation against spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Can Ent. 115:443–4.
- Smith, K.L. y Herbig, S.H. 1998. Labile insecticide compositions. United States Patent. 5:750,126.
- Soberón, M., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Gómez, I., Porta, H. y Bravo, A. 2010. Pore formation by cry toxins. Adv. Exp. Med. Biol. 677:127–142.
- Soberón, M. y Bravo, A. 2003. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología Departamento de Biología Molecular. UNAM.
www.microbiología.org.mx/micriobiosenlinea/CAPITULO_16/Capitulo_16.pdf
- Stone, T. B., and R. S. Sims. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 86: 989-994.
- Swiecicka, I., Bideshi, D. y Federici, B. 2008. Novel Isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a Quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. App. Environ. Microbiol. 923–930.
- Tabashnik, B., Gassman, A., Crowder, D. y Carrière, Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: Evidence versus theory. Nat. Biotechnol. 26:199-202.
- Tabashnik, B. y Carrière, Y. 2004. Bt transgenic crops do not have favorable effects on resistant insects. J. Insect Sci. 4:4.
- Taborsky, V. 1992. Small-scale processing of microbial pesticides. FAO Agricultural Services Bulletin No. 96. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Tamez-Guerra, P., R. Castro-Franco, H. Medrano-Roldán, M. R. McGuire, L. J. Galán-Wong, and H. A. Luna-Olvera. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* (Lepidoptera). *J. Econ. Entomol.* 91: 86-93.
- Tamez-Guerra, P., Garcia-Gutierrez, C., Medrano-Roldan, H., Galan-Wong, L.J. y Sandoval-Coronado, C.F. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis*. *Mulsant. Southwest. Entomol.* 24:37-48.
- Tamez Guerra, P. M., R. McGuire, R. W. Behle, B. S. Shasha y L. J. Galán Wong, 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93:219-225.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M., Medrano-Roldan, H., Galan-Wong, L. J., Shasha, B. y Vegaz, F. 1996. Sprayable Granule Formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89(6): 1424-1430.
- Teera-Arunsiri, A., Suphantharika, M. y Ketunuti, U. 2003. Preparation of spray-dried wetttable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *J. Econ. Entomol.* 96(2):292-9.
- United States Applied and Environmental Health. 1989. Pest Management Program. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland.
- United States Enviromental Protection Agency. 1988. Guidance for the registration of *Bacillus thuringiensis*. Washington, DC.
- Van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1 -16.
- Vandekar, M. y H.T. Dulmage. 1983. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. UNDP/World Bank/W.H.O. Geneva, Switzerland.
- Vega-baudrit J., Delgado-Montero K., Sibaja Ballesterom., Alvarado-Aguilar P. y Barrientos RamirezS. 2008. Empleo de melaza de caña de azúcar para la obtención y caracterización de poliuretanos potencialmenteBiodegradables. *Rev. Iberoamericana dePolímeros.* 9 (4): 408-421.
- Velazco-Martínez, M., Angulo O., Vazquez-Couturier D.L., Arroyo-Lara A. y Monroy-Rivera A. 1997. Effect of dried solids of nejayote on broiler growth-poultry science. *76 (11): 1531-1534.*

- Yang, C-C., Pan, I-H., Chen, M-H., Kao, S-S. y Tsai, Y-S. 1995. Anti-ultraviolet biocidal composition. United States Patent. 5:427,787.
- Yáñez Fernandez J., Salazar Montoya J.A., Chaires Martínez L., Jiménez Hernández J., Márquez Robles M. y Ramos Ramírez E. G. 2002. Aplicaciones Biotecnológicas de la microencapsulación Avances y perspectivas 1.21:313-318.
- Yardin, M.R., Kennedy, I.R. y Thies JE. 2000. Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as biofertilisers and biopesticides. Rad. Phys. Chem. 57:565-8
- Zenner de Polania, I., Alvarez Rodriguez, J. A. y Arevalo Maldonado, H. A. 2009. Responses of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), from the Colombian Eastern Plains, to the Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* Toxin. Southwest. Entomol. 35(1):85-98.
- Zhang, W., H. Zou, L. Jiang, J. Yao, J. Liang, and Q. Wang. 2015. Semi-solid state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide. Biotechnol. Bioproc. E. 20: 1123-1132.

Anexo I. Mortalidad Presentada por Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*.

<i>Trichoplusia ni</i> Concentración 50 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	8.33	4.16	CONTROL	0	4.16	8.33	CONTROL	4.16	0	8.33
YUC-2	100	100	100	YUC-2	100	100	100	YUC-2	100	100	100
YUC-3	100	100	100	YUC-3	100	100	100	YUC-3	100	100	100
YUC-4	100	100	100	YUC-4	100	100	100	YUC-4	100	100	100
YUC-5	100	100	100	YUC-5	100	100	100	YUC-5	100	100	100
YUC-6	4.16	12.5	0	YUC-6	0	16.6	0	YUC-6	0	4.16	12.5
YUC-7	100	100	100	YUC-7	100	100	100	YUC-7	100	100	100
YUC-8	100	100	100	YUC-8	100	100	100	YUC-8	100	100	100
YUC-9	100	100	100	YUC-9	100	100	100	YUC-9	100	100	100
YUC-10	100	100	100	YUC-10	100	100	100	YUC-10	100	100	100
YUC-11	100	100	100	YUC-11	100	100	100	YUC-11	100	100	100
YUC-12	100	100	100	YUC-12	100	100	100	YUC-12	100	100	100
YUC-13	100	100	100	YUC-13	100	100	100	YUC-13	100	100	100
YUC-14	100	100	100	YUC-14	100	100	100	YUC-14	100	100	100
YUC-15	100	100	100	YUC-15	100	100	100	YUC-15	100	100	100
YUC-16	100	100	100	YUC-16	100	100	100	YUC-16	100	100	100
YUC-17	100	100	100	YUC-17	100	100	100	YUC-17	100	100	100
YUC-18	100	100	100	YUC-18	100	100	100	YUC-18	100	100	100
YUC-19	100	100	100	YUC-19	100	100	100	YUC-19	100	100	100
YUC-20	100	100	100	YUC-20	100	100	100	YUC-20	100	100	100
YUC-21	100	100	100	YUC-21	100	100	100	YUC-21	100	100	100
YUC-22	95.8	91.6	100	YUC-22	100	91.6	100	YUC-22	95.83	100	100
YUC-23	100	100	100	YUC-23	100	100	100	YUC-23	100	100	100
YUC-24	98.5	100	98.5	YUC-24	98.5	98.5	98.5	YUC-24	98.5	98.5	100
YUC-25	100	100	100	YUC-25	100	100	100	YUC-25	100	100	100
<i>Trichoplusia ni</i> Concentración 5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	0	8.33	4.16	CONTROL	0	4.16	4.16	CONTROL	4.16	8.33	0

YUC-2	87.5	100	100	YUC-2	87.5	91.6	91.6	YUC-2	91.6	100	95.8
YUC-3	100	95.8	91.6	YUC-3	95.8	95.8	91.6	YUC-3	100	91.6	87.5
YUC-4	100	91.6	100	YUC-4	100	79.1	95.8	YUC-4	95.8	91.6	91.6
YUC-5	100	100	100	YUC-5	100	100	100	YUC-5	100	100	100
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	4.16	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	100	100	100	YUC-7	100	95.8	95.8	YUC-7	100	91.6	95.8
YUC-8	100	100	100	YUC-8	91.6	95.8	87.5	YUC-8	100	79.1	87.5
YUC-9	100	100	100	YUC-9	100	95.8	95.8	YUC-9	100	91.6	91.6
YUC-10	100	100	100	YUC-10	91.6	87.5	83.3	YUC-10	100	87.5	91.6
YUC-11	100	100	100	YUC-11	100	100	79.1	YUC-11	100	91.6	95.8
YUC-12	100	95.8	100	YUC-12	95.8	95.8	95.8	YUC-12	95.8	91.6	91.6
YUC-13	95.8	91.6	100	YUC-13	91.6	100	100	YUC-13	91.6	87.5	87.5
YUC-14	100	100	100	YUC-14	98.5	98.5	87.5	YUC-14	91.6	91.6	75
YUC-15	95.8	87.5	87.5	YUC-15	87.5	83.3	83.3	YUC-15	83.3	95.8	91.6
YUC-16	33.3	20.8	25	YUC-16	37.5	25	33.3	YUC-16	29.1	20.8	25
YUC-17	95.8	91.6	79.1	YUC-17	95.8	83.3	83.3	YUC-17	91.6	91.6	79.1
YUC-18	83.3	91.6	79.1	YUC-18	83.3	83.3	87.5	YUC-18	87.5	87.5	79.1
YUC-19	100	91.6	95.8	YUC-19	91.6	91.6	95.8	YUC-19	95.8	87.5	100
YUC-20	91.6	91.6	95.8	YUC-20	95.8	91.6	87.5	YUC-20	95.8	91.6	91.6
YUC-21	100	100	100	YUC-21	91.6	91.6	95.8	YUC-21	95.8	91.6	75
YUC-22	91.6	91.6	91.6	YUC-22	91.6	95.8	83.3	YUC-22	95.8	91.6	91.6
YUC-23	100	100	100	YUC-23	95.8	87.5	91.6	YUC-23	95.8	83.3	91.6
YUC-24	100	83.3	91.6	YUC-24	95.8	83.3	91.6	YUC-24	87.5	91.6	91.6
YUC-25	95.8	91.6	91.6	YUC-25	91.6	91.6	87.5	YUC-25	83.3	95.8	95.8
<i>Trichoplusia ni</i> Concentración 0.5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	8.3	0	4.16	CONTROL	0	4.16	4.16	CONTROL	0	0	4.16
YUC-2	41.6	41.6	41.6	YUC-2	41.6	37.5	41.6	YUC-2	41.6	41.6	41.6
YUC-3	95.8	87.5	91.6	YUC-3	87.5	91.6	91.6	YUC-3	87.5	91.6	95.8
YUC-4	16.6	20.8	20.8	YUC-4	20.8	25	20.8	YUC-4	20.8	20.8	16.6
YUC-5	95.8	91.6	87.5	YUC-5	91.6	91.6	87.5	YUC-5	87.5	91.6	95.8
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	87.5	91.6	95.8	YUC-7	91.6	91.6	95.8	YUC-7	91.6	83.3	91.6
YUC-8	33.3	29.1	33.3	YUC-8	29.1	20.8	25	YUC-8	33.3	29.1	29.1

YUC-9	79.1	83.3	87.5	YUC-9	83.3	70.83	83.3	YUC-9	83.3	87.5	79.16
YUC-10	29.1	29.1	33.3	YUC-10	33.3	25	20.8	YUC-10	33.3	25	25
YUC-11	75	75	75	YUC-11	75	79.1	70.8	YUC-11	79.1	75	70.8
YUC-12	33.3	25	20.8	YUC-12	20.8	25	20.8	YUC-12	25	33.3	33.3
YUC-13	16.6	20.8	20.8	YUC-13	20.8	20.8	25	YUC-13	29.1	20.8	16.6
YUC-14	33.3	29.1	29.1	YUC-14	29.1	29.1	29.1	YUC-14	29.1	25	33.3
YUC-15	29.1	29.1	25	YUC-15	25	33.3	25	YUC-15	33.3	25	20.8
YUC-16	4.16	0	0	YUC-16	0	0	0	YUC-16	4.16	0	0
YUC-17	45.8	41.6	41.6	YUC-17	41.6	50	41.6	YUC-17	37.5	33.3	41.6
YUC-18	37.5	41.6	50	YUC-18	41.6	50	37.5	YUC-18	37.5	41.6	37.5
YUC-19	41.6	37.5	37.5	YUC-19	37.5	33.3	41.6	YUC-19	41.6	37.5	29.1
YUC-20	29.1	41.6	33.3	YUC-20	33.3	29.1	37.5	YUC-20	33.3	29.1	37.5
YUC-21	33.3	29.1	29.1	YUC-21	33.3	33.3	20.8	YUC-21	33.3	20.8	29.1
YUC-22	29.1	25	20.8	YUC-22	25	25	25	YUC-22	29.1	20.8	25
YUC-23	33	33.3	33.3	YUC-23	33.3	25	29.1	YUC-23	25	33.3	29.1
YUC-24	29.1	25	33.3	YUC-24	33.3	16.6	20.8	YUC-24	25	29.1	33.3
YUC-25	33	20.8	20.8	YUC-25	20.8	25	25	YUC-25	25	33.3	29.1
<i>Trichoplusia ni</i> Concentración 50 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	4.16	0	CONTROL	0	0	4.16	CONTROL	0	4.16	8.33
M2-1	100	100	100	M2-1	100	100	100	M2-1	100	100	100
M2-2	100	100	100	M2-2	100	100	100	M2-2	100	100	100
M2-3	100	100	100	M2-3	100	100	100	M2-3	100	100	100
M2-4	100	100	100	M2-4	100	100	100	M2-4	100	100	100
M2-5	100	100	100	M2-5	100	100	100	M2-5	100	100	100
M2-6	91.6	95.8	100	M2-6	100	95.8	95.8	M2-6	100	91.6	91.6
M2-7	95.8	100	100	M2-7	100	91.6	95.8	M2-7	95.8	91.6	95.8
M2-8	95.8	91.6	91.6	M2-8	91.6	91.6	91.6	M2-8	95.8	95.8	91.6
M2-9	100	100	100	M2-9	100	100	100	M2-9	100	100	100
M2-10	100	100	100	M2-10	100	100	100	M2-10	100	100	100
M2-11	100	100	100	M2-11	100	100	100	M2-11	100	100	100
<i>Trichoplusia ni</i> Concentración 5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			

	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	4.16	4.16	CONTROL	0	4.16	0	CONTROL	0	0	4.16
M2-1	100	100	100	M2-1	91.6	95.8	95.8	M2-1	95.8	95.8	100
M2-2	95.8	95.8	95.8	M2-2	95.8	91.6	95.8	M2-2	95.8	91.6	91.6
M2-3	95.8	100	95.8	M2-3	100	98.5	98.5	M2-3	100	91.6	95.8
M2-4	83.3	95.8	83.3	M2-4	83.3	83.3	95.8	M2-4	95.8	91.6	91.6
M2-5	100	100	100	M2-5	100	91.6	98.5	M2-5	95.8	95.8	100
M2-6	91.6	83.3	91.6	M2-6	83.3	91.6	83.3	M2-6	91.6	83.3	95.8
M2-7	100	100	100	M2-7	100	100	100	M2-7	100	100	100
M2-8	100	100	100	M2-8	100	98.5	91.6	M2-8	91.6	98.5	100
M2-9	100	100	100	M2-9	100	100	100	M2-9	100	100	100
M2-10	83.3	100	95.83	M2-10	98.5	91.6	91.6	M2-10	100	83.3	83.3
M2-11	100	100	100	M2-11	100	100	100	M2-11	100	100	100
<i>Trichoplusia ni</i> Concentración 0.5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	4.16	4.16	CONTROL	0	0	0	CONTROL	4.16	0	0
M2-1	75	75	70.8	M2-1	70.8	70.8	70.8	M2-1	75	70.8	70.8
M2-2	70.8	70.8	70.8	M2-2	66.6	66.6	75	M2-2	75	66.6	70.8
M2-3	70.8	66.6	66.6	M2-3	66.6	66.6	62.5	M2-3	70.8	66.6	70.8
M2-4	58.3	58.3	54.1	M2-4	58.3	62.5	54.1	M2-4	62.5	62.5	58.3
M2-5	70.8	70.8	70.8	M2-5	70.8	66.6	66.6	M2-5	70.8	70.8	75
M2-6	62.5	58.3	58.3	M2-6	62.5	58.3	50	M2-6	50	62.5	58.3
M2-7	79.1	83.3	75	M2-7	79.1	79.1	79.1	M2-7	83.3	83.3	70.8
M2-8	70.8	75	66.6	M2-8	66.6	66.6	75	M2-8	66.6	70.8	75
M2-9	79.16	79.1	79.1	M2-9	75	79.1	83.3	M2-9	87.5	79.1	75
M2-10	54.1	50	50	M2-10	50	50	50	M2-10	50	62.5	58.3
M2-11	75	79.1	83.3	M2-11	79.1	83.3	75	M2-11	83.3	79.1	79.1

Anexo II. Mortalidad Presentada por Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas neonatas de *Spodoptera exigua*.

<i>Spodoptera exigua</i> Concentración 50 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	0	4.16	4.16	CONTROL	4.16	8.33	0	CONTROL	4.16	8.33	8.33
YUC-2	100	100	100	YUC-2	100	100	100	YUC-2	100	100	100
YUC-3	100	100	100	YUC-3	100	100	100	YUC-3	100	100	100
YUC-4	95.8	100	100	YUC-4	100	100	100	YUC-4	95.8	95.8	100
YUC-5	100	100	100	YUC-5	100	100	100	YUC-5	100	100	100
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	4.16	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	100	100	100	YUC-7	100	100	100	YUC-7	100	100	100
YUC-8	100	100	100	YUC-8	100	100	100	YUC-8	100	100	100
YUC-9	79.1	79.1	91.6	YUC-9	83.3	79.1	79.1	YUC-9	75	79.1	87.5
YUC-10	100	83.3	87.5	YUC-10	95.8	83.3	91.6	YUC-10	95.8	95.8	79.1
YUC-11	100	100	100	YUC-11	100	100	100	YUC-11	100	100	100
YUC-12	100	100	100	YUC-12	100	100	100	YUC-12	100	100	100
YUC-13	100	95.8	95.8	YUC-13	95.8	95.8	91.6	YUC-13	95.8	91.6	100
YUC-14	100	100	100	YUC-14	100	100	100	YUC-14	100	100	100
YUC-15	100	100	100	YUC-15	100	100	100	YUC-15	100	100	100
YUC-16	50	58.3	70.83	YUC-16	50	54.1	75	YUC-16	54.1	62.5	58.3
YUC-17	100	100	100	YUC-17	100	100	100	YUC-17	100	100	100
YUC-18	100	100	100	YUC-18	100	100	100	YUC-18	100	100	100
YUC-19	100	100	100	YUC-19	100	100	100	YUC-19	100	100	100
YUC-20	100	100	100	YUC-20	100	100	100	YUC-20	100	100	100
YUC-21	79.1	79.1	75	YUC-21	79.1	75	70.8	YUC-21	87.5	75	70.8
YUC-22	100	100	100	YUC-22	100	100	100	YUC-22	100	100	100
YUC-23	100	100	100	YUC-23	100	100	100	YUC-23	100	100	100
YUC-24	95.8	91.6	91.6	YUC-24	91.6	87.5	95.8	YUC-24	95.8	83.3	91.6
YUC-25	91.6	79.1	83.3	YUC-25	91.6	83.3	75	YUC-25	95.8	75	91.6
<i>Spodoptera exigua</i> Concentración 5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III

CONTROL	0	8.33	4.16	CONTROL	8.33	8.33	0	CONTROL	4.16	8.33	12.5
YUC-2	87.5	91.6	79.1	YUC-2	95.8	87.5	87.5	YUC-2	87.5	83.3	87.5
YUC-3	100	100	100	YUC-3	100	100	100	YUC-3	100	100	100
YUC-4	91.6	87.5	95.8	YUC-4	87.5	95.8	91.6	YUC-4	95.8	87.5	91.6
YUC-5	83.3	100	95.8	YUC-5	100	100	95.8	YUC-5	95.8	95.8	95.8
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	95.8	95.8	100	YUC-7	95.8	100	83.3	YUC-7	95.8	100	95.8
YUC-8	95.8	95.8	100	YUC-8	100	100	95.8	YUC-8	83.3	95.8	95.8
YUC-9	70.8	70.8	79.1	YUC-9	79.1	75	75	YUC-9	79.1	70.8	75
YUC-10	79.1	83.3	83.3	YUC-10	75	66.6	75	YUC-10	75	62.5	70.8
YUC-11	83.3	79.1	83.3	YUC-11	79.1	83.3	83.3	YUC-11	83.3	91.6	83.3
YUC-12	91.6	87.5	87.5	YUC-12	58.3	70.8	70.8	YUC-12	70.8	58.3	70.8
YUC-13	83.3	87.5	87.5	YUC-13	70.83	66.6	70.83	YUC-13	70.8	62.5	62.5
YUC-14	91.6	91.6	75	YUC-14	62.5	66.6	62.5	YUC-14	62.5	91.6	66.6
YUC-15	91.6	91.6	95.8	YUC-15	83.3	62.5	54.1	YUC-15	87.5	54.1	50
YUC-16	20.8	33.3	25	YUC-16	20.8	25	16.6	YUC-16	33.3	25	25
YUC-17	87.5	83.3	87.5	YUC-17	83.3	95.8	87.5	YUC-17	87.5	83.3	87.5
YUC-18	75	79.1	83.3	YUC-18	70.8	75	75	YUC-18	70.8	70.8	75
YUC-19	83.3	79.1	91.6	YUC-19	79.1	87.5	83.3	YUC-19	91.6	75	83.3
YUC-20	79.1	62.5	66.6	YUC-20	62.5	70.8	66.6	YUC-20	62.5	58.3	66.6
YUC-21	58.3	66.6	62.5	YUC-21	62.5	62.5	70.8	YUC-21	75	58.3	58.3
YUC-22	95.8	87.5	100	YUC-22	66.6	66.6	50	YUC-22	66.6	50	75
YUC-23	83.3	87.5	95.8	YUC-23	54.1	83.3	54.1	YUC-23	83.3	58.3	70.8
YUC-24	79.1	83.3	83.3	YUC-24	79.1	66.6	70.8	YUC-24	83.3	66.6	58.3
YUC-25	66.6	62.5	66.6	YUC-25	66.6	58.3	58.3	YUC-25	66.3	66.6	58.3
<i>Spodoptera exigua</i> Concentración 0.5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III	CONTROL	Rep I	Rep II	Rep III	CONTROL	Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	12.5	0	CONTROL	0	0	12.5	CONTROL	0	4.16	8.33
YUC-2	0	0	0	YUC-2	0	0	0	YUC-2	0	0	0
YUC-3	37.5	41.6	41.6	YUC-3	45.83	37.5	41.6	YUC-3	41.6	41.6	45.8
YUC-4	0	0	0	YUC-4	0	0	0	YUC-4	0	0	0
YUC-5	62.5	62.5	66.6	YUC-5	70.8	66.6	62.5	YUC-5	66.6	58.3	70.8
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	41.6	37.5	37.5	YUC-7	41.6	41.6	41.6	YUC-7	45.8	41.6	45.8

YUC-8	50	50	45.8	YUC-8	54.1	45.8	45.8	YUC-8	54.1	50	50
YUC-9	0	0	0	YUC-9	0	0	0	YUC-9	0	0	0
YUC-10	0	0	0	YUC-10	0	0	0	YUC-10	0	0	0
YUC-11	0	0	0	YUC-11	0	0	0	YUC-11	0	0	0
YUC-12	0	0	0	YUC-12	0	0	0	YUC-12	0	0	0
YUC-13	0	0	0	YUC-13	0	0	0	YUC-13	0	0	0
YUC-14	0	0	0	YUC-14	0	0	0	YUC-14	0	0	0
YUC-15	0	0	0	YUC-15	0	0	0	YUC-15	0	0	0
YUC-16	0	0	0	YUC-16	0	0	0	YUC-16	0	0	0
YUC-17	0	0	0	YUC-17	0	0	0	YUC-17	0	0	0
YUC-18	0	0	0	YUC-18	0	0	0	YUC-18	0	0	0
YUC-19	0	0	0	YUC-19	0	0	0	YUC-19	0	0	0
YUC-20	0	0	0	YUC-20	0	0	0	YUC-20	0	0	0
YUC-21	0	0	0	YUC-21	0	0	0	YUC-21	0	0	0
YUC-22	0	0	0	YUC-22	0	0	0	YUC-22	0	0	0
YUC-23	0	0	0	YUC-23	0	0	0	YUC-23	0	0	0
YUC-24	0	0	0	YUC-24	0	0	0	YUC-24	0	0	0
YUC-25	0	0	0	YUC-25	0	0	0	YUC-25	0	0	0
<i>Spodoptera exigua</i> Concentración 50 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	8.33	4.16	0	CONTROL	4.16	4.16	12.5	CONTROL	0	12.5	8.3
M2-1	95.8	95.8	91.6	M2-1	95.8	100	95.8	M2-1	95.8	91.6	91.6
M2-2	100	100	100	M2-2	100	100	100	M2-2	100	100	100
M2-3	100	100	100	M2-3	100	100	100	M2-3	100	100	100
M2-4	100	100	100	M2-4	100	100	100	M2-4	100	100	100
M2-5	100	100	100	M2-5	100	100	100	M2-5	100	100	100
M2-6	95.8	91.6	91.6	M2-6	91.6	91.6	91.6	M2-6	91.6	100	95.8
M2-7	100	100	100	M2-7	100	100	100	M2-7	100	100	100
M2-8	100	100	100	M2-8	100	100	100	M2-8	100	100	100
M2-9	100	100	100	M2-9	100	100	100	M2-9	100	100	100
M2-10	100	100	95.8	M2-10	100	100	100	M2-10	100	100	95.8
M2-11	100	100	100	M2-11	100	100	100	M2-11	100	100	100
<i>Spodoptera exigua</i> Concentración 5 µg/cm ²											

Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	8.33	12.5	CONTROL	8.33	8.33	4.16	CONTROL	12.5	12.5	8.33
M2-1	91.6	87.5	91.6	M2-1	91.6	87.5	87.5	M2-1	87.5	91.6	95.8
M2-2	100	100	100	M2-2	100	100	95.8	M2-2	95.8	95.8	100
M2-3	87.5	87.5	91.6	M2-3	87.5	91.6	83.3	M2-3	83.3	91.6	91.6
M2-4	91.6	87.5	95.8	M2-4	91.6	91.6	83.3	M2-4	95.8	91.6	91.6
M2-5	95.8	95.8	95.8	M2-5	100	95.8	91.6	M2-5	100	95.8	95.8
M2-6	79.1	83.3	87.5	M2-6	83.3	79.1	79.1	M2-6	79.1	87.5	87.5
M2-7	83.3	91.6	95.8	M2-7	91.6	91.6	83.3	M2-7	95.8	91.6	91.6
M2-8	91.6	95.8	91.6	M2-8	91.6	91.6	83.3	M2-8	91.6	95.8	95.8
M2-9	100	100	100	M2-9	95.8	83.3	83.3	M2-9	95.8	91.6	91.6
M2-10	87.5	91.6	91.6	M2-10	91.6	83.3	87.5	M2-10	91.6	91.6	91.6
M2-11	87.5	95.	91.6	M2-11	87.5	87.5	95.8	M2-11	95.8	91.6	87.5
<i>Spodoptera exigua</i> Concentración 0.5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	8.33	8.33	8.33	CONTROL	12.5	8.33	0	CONTROL	12.5	8.33	8.33
M2-1	33.3	33.3	29.1	M2-1	29.1	29.1	29.1	M2-1	33.3	37.5	29.1
M2-2	70.8	66.6	66.6	M2-2	62.5	70.8	66.6	M2-2	70.8	75	62.5
M2-3	0	0	0	M2-3	4.16	0	0	M2-3	0	0	0
M2-4	58.3	58.3	54.1	M2-4	58.3	54.1	54.1	M2-4	58.3	58.3	54.1
M2-5	62.5	66.6	66.6	M2-5	62.5	66.6	66.6	M2-5	70.8	66.6	58.3
M2-6	0	0	0	M2-6	0	0	0	M2-6	0	0	0
M2-7	16.6	16.6	20.8	M2-7	20.8	20.8	25	M2-7	25	16.6	20.8
M2-8	37.5	37.5	33.3	M2-8	33.3	37.5	33.3	M2-8	37.5	41.6	37.5
M2-9	20.8	20.8	25	M2-9	25	25	29.1	M2-9	29.1	20.83	25
M2-10	8.33	8.33	8.33	M2-10	8.33	12.5	8.33	M2-10	8.33	12.5	2.5
M2-11	58.3	54.1	54.1	M2-11	58.1	54.1	58.1	M2-11	54.1	58.3	58.3

Anexo III. Mortalidad Presentada por Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas neonatas de *Helicoverpa zea*.

<i>Helicoverpa zea</i> Concentración 50 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	12.5	8.3	8.33	CONTROL	8.3	12.5	4.16	CONTROL	8.3	12.5	12.5
YUC-2	79.1	87.5	83.3	YUC-2	83.3	83.3	75	YUC-2	79.1	87.5	79.1
YUC-3	75	70.8	83.3	YUC-3	75	70.8	75	YUC-3	75	66.6	83.3
YUC-4	79.1	79.1	83.3	YUC-4	79.1	75	79.1	YUC-4	83.3	70.8	83.3
YUC-5	87.5	91.6	95.8	YUC-5	91.6	91.6	83.3	YUC-5	95.8	83.3	95.8
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	83.3	83.3	79.1	YUC-7	83.3	83.3	79.1	YUC-7	87.5	79.1	83.3
YUC-8	75	87.5	83.3	YUC-8	75	75	91.6	YUC-8	87.5	79.1	79.1
YUC-9	79.1	87.5	79.1	YUC-9	79.1	87.5	79.1	YUC-9	79.1	87.5	79.1
YUC-10	70.8	79.1	79.1	YUC-10	75	79.1	75	YUC-10	83.3	75	79.1
YUC-11	91.6	83.3	87.5	YUC-11	87.5	83.3	87.5	YUC-11	91.6	79.1	87.5
YUC-12	87.5	91.6	95.8	YUC-12	91.6	62.5	62.5	YUC-12	70.8	91.6	62.5
YUC-13	75	79.1	75	YUC-13	75	70.8	75	YUC-13	75	79.1	62.5
YUC-14	83.3	79.1	79.1	YUC-14	66.6	79.1	70.8	YUC-14	70.8	62.5	79.1
YUC-15	87.5	91.6	83.3	YUC-15	83.3	62.5	62.5	YUC-15	58.3	58.3	83.3
YUC-16	58.3	54.1	50	YUC-16	58.3	54.1	45.8	YUC-16	50	50	58.3
YUC-17	100	100	100	YUC-17	100	100	100	YUC-17	100	100	100
YUC-18	100	91.6	100	YUC-18	100	91.6	91.6	YUC-18	91.6	91.6	100
YUC-19	100	91.6	91.6	YUC-19	83.3	91.6	100	YUC-19	100	91.6	87.5
YUC-20	95.8	95.8	100	YUC-20	91.6	95.8	100	YUC-20	91.6	91.6	95.8
YUC-21	100	100	100	YUC-21	91.6	70.8	62.5	YUC-21	91.6	66.6	62.5
YUC-22	83.3	83.3	83.3	YUC-22	79.1	83.3	83.3	YUC-22	79.1	87.5	83.3
YUC-23	83.3	83.3	91.6	YUC-23	83.3	83.3	87.5	YUC-23	87.5	83.3	91.6
YUC-24	79.1	79.1	83.3	YUC-24	75	79.1	83.3	YUC-24	79.1	79.1	75
YUC-25	83.3	87.5	95.8	YUC-25	79.1	87.5	91.6	YUC-25	91.6	87.5	95.8
<i>Helicoverpa zea</i> Concentración 5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III

CONTROL	8.33	12.5	4.16	CONTROL	4.16	4.16	4.16	CONTROL	12.5	4.16	8.33
YUC-2	83.3	70.8	75	YUC-2	70.8	66.6	62.5	YUC-2	66.6	66.6	70.8
YUC-3	58.3	62.5	58.3	YUC-3	62.5	70.8	66.6	YUC-3	54.1	66.6	62.5
YUC-4	70.8	66.6	62.5	YUC-4	66.6	66.6	62.5	YUC-4	75	62.5	66.6
YUC-5	70.8	75	79.1	YUC-5	79.1	75	70.8	YUC-5	79.1	70.8	75
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	66.6	70.8	70.8	YUC-7	70.8	66.6	62.5	YUC-7	75	70.8	79.1
YUC-8	62.5	66.6	75	YUC-8	66.6	62.5	58.3	YUC-8	70.8	70.8	66.6
YUC-9	66.6	70.8	75	YUC-9	70.8	66.6	70.8	YUC-9	75	70.8	70.8
YUC-10	66.6	62.5	66.6	YUC-10	66.6	62.5	62.5	YUC-10	62.5	70.	66.6
YUC-11	70.8	70.8	70.8	YUC-11	62.5	75	66.6	YUC-11	70.8	79.1	70.8
YUC-12	58.3	58.3	66.6	YUC-12	66.6	58.3	58.3	YUC-12	58.3	54.1	66.6
YUC-13	70.8	70.8	70.8	YUC-13	66.6	70.8	70.8	YUC-13	66.6	75	70.8
YUC-14	70.8	75	75	YUC-14	75	70.8	75	YUC-14	79.1	75	75
YUC-15	79.1	75	79.1	YUC-15	83.3	75	79.1	YUC-15	83.3	75	83.3
YUC-16	45.8	29.1	41.6	YUC-16	33.3	29.16	45.8	YUC-16	33.3	50	41.6
YUC-17	95.8	91.6	91.6	YUC-17	91.6	95.3	100	YUC-17	75	91.6	91.6
YUC-18	87.5	83.3	83.3	YUC-18	83.3	87.5	79.1	YUC-18	83.3	79.1	83.3
YUC-19	83.3	87.5	83.3	YUC-19	83.3	87.5	87.5	YUC-19	83.3	75	79.16
YUC-20	91.6	91.6	100	YUC-20	91.6	95.8	87.5	YUC-20	91.6	83.3	91.6
YUC-21	79.1	75	79.1	YUC-21	75	75	79.1	YUC-21	83.3	75	83.3
YUC-22	62.5	66.6	62.5	YUC-22	62.5	62.5	62.5	YUC-22	70.8	66.6	62.5
YUC-23	70.8	58.3	70.8	YUC-23	66.6	58.3	75	YUC-23	75	58.3	75
YUC-24	54.1	75	54.1	YUC-24	54.1	75	62.5	YUC-24	62.5	75	62.5
YUC-25	62.5	66.6	70.8	YUC-25	62.5	62.5	70.8	YUC-25	75	66.6	70.8
<i>Helicoverpa zea</i> Concentración 0.5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	12.5	4.16	4.16	CONTROL	8.33	8.33	4.16	CONTROL	12.5	4.16	0
YUC-2	0	0	0	YUC-2	0	0	0	YUC-2	0	0	0
YUC-3	0	0	0	YUC-3	0	0	0	YUC-3	0	0	0
YUC-4	0	0	0	YUC-4	0	0	0	YUC-4	0	0	0
YUC-5	0	0	0	YUC-5	0	0	0	YUC-5	0	0	0
YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0	YUC-6	0	0	0
YUC-7	0	0	0	YUC-7	0	0	0	YUC-7	0	0	0

YUC-8	0	0	0	YUC-8	0	0	0	YUC-8	0	0	0
YUC-9	0	0	0	YUC-9	0	0	0	YUC-9	0	0	0
YUC-10	0	0	0	YUC-10	0	0	0	YUC-10	0	0	0
YUC-11	0	0	0	YUC-11	0	0	0	YUC-11	0	0	0
YUC-12	0	0	0	YUC-12	0	0	0	YUC-12	0	0	0
YUC-13	0	0	0	YUC-13	0	0	0	YUC-13	0	0	0
YUC-14	0	0	0	YUC-14	0	0	0	YUC-14	0	0	0
YUC-15	0	0	0	YUC-15	0	0	0	YUC-15	0	0	0
YUC-16	0	0	0	YUC-16	0	0	0	YUC-16	0	0	0
YUC-17	45.8	50	41.6	YUC-17	45.8	45.8	37.5	YUC-17	50	50	41.6
YUC-18	0	0	0	YUC-18	0	0	0	YUC-18	0	0	0
YUC-19	0	0	0	YUC-19	0	0	0	YUC-19	0	0	0
YUC-20	45.83	41.6	41.6	YUC-20	45.8	45.8	41.6	YUC-20	45.8	50	50
YUC-21	0	0	0	YUC-21	0	0	0	YUC-21	0	0	0
YUC-22	0	0	0	YUC-22	0	0	0	YUC-22	0	0	0
YUC-23	0	0	0	YUC-23	0	0	0	YUC-23	0	0	0
YUC-24	0	0	0	YUC-24	0	0	0	YUC-24	0	0	0
YUC-25	0	0	0	YUC-25	0	0	0	YUC-25	0	0	0
<i>Helicoverpa zea</i> Concentración 50 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	12.5	12.5	12.5	CONTROL	8.33	8.33	12.5	CONTROL	8.33	4.16	12.5
M2-1	95.8	91.6	91.6	M2-1	91.6	91.6	91.6	M2-1	95.8	95.8	87.5
M2-2	83.3	83.3	83.3	M2-2	87.5	83.3	79.1	M2-2	91.6	83.3	75
M2-3	79.1	83.3	79.1	M2-3	83.3	83.3	75	M2-3	83.3	79.1	79.1
M2-4	91.6	83.3	83.3	M2-4	87.5	79.1	87.5	M2-4	83.3	83.3	83.3
M2-5	79.1	79.1	79.1	M2-5	83.3	79.1	79.1	M2-5	87.5	79.1	79.1
M2-6	79.1	79.1	75	M2-6	75	75	75	M2-6	83.3	79.1	79.1
M2-7	75	75	70.8	M2-7	75	83.3	75	M2-7	75	83.3	79.1
M2-8	83.3	83.3	83.3	M2-8	87.5	83.3	83.3	M2-8	91.6	83.3	83.3
M2-9	75	79.1	79.1	M2-9	70.8	75	75	M2-9	79.1	83.3	75
M2-10	83.3	83.3	79.1	M2-10	83.3	83.3	83.3	M2-10	79.1	75	83.3
M2-11	87.5	87.5	83.3	M2-11	83.3	87.5	87.5	M2-11	91.6	87.5	87.5
<i>Helicoverpa zea</i> Concentración 5 µg/cm ²											

Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	4.16	12.5	8.33	CONTROL	8.33	8.33	0	CONTROL	12.5	4.16	12.5
M2-1	79.1	79.1	79.1	M2-1	83.3	75	79.1	M2-1	70.8	79.16	83.3
M2-2	62.5	62.5	62.5	M2-2	66.6	62.5	62.5	M2-2	70.8	62.5	62.5
M2-3	58.3	62.5	62.5	M2-3	58.3	58.3	66.6	M2-3	66.6	58.3	58.3
M2-4	66.6	66.6	66.6	M2-4	66.6	62.5	62.5	M2-4	66.6	66.6	62.5
M2-5	70.8	66.6	66.6	M2-5	66.6	75	62.5	M2-5	66.6	62.5	66.6
M2-6	75	75	70.83	M2-6	70.8	75	70.8	M2-6	79.1	79.1	70.8
M2-7	70.8	70.8	66.6	M2-7	66.6	66.6	66.6	M2-7	75	70.8	70.8
M2-8	70.8	66.6	66.6	M2-8	70.8	66.6	75	M2-8	75	70.8	70.8
M2-9	66.6	70.8	70.8	M2-9	70.8	75	70.8	M2-9	70.8	66.6	66.6
M2-10	75	70.8	70.8	M2-10	70.8	66.6	75	M2-10	75	75	70.8
M2-11	79.1	79.1	70.8	M2-11	83.3	75	83.3	M2-11	75	83.3	83.3
<i>Helicoverpa zea</i> Concentración 0.5 µg/cm ²											
Bioensayo I				Bioensayo II				Bioensayo III			
	Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III
CONTROL	0	4.16	12.5	CONTROL	0	4.16	4.16	CONTROL	8.33	8.33	8.33
M2-1	45.8	45.8	45.8	M2-1	41.6	45.8	45.8	M2-1	45.8	41.6	37.5
M2-2	29.1	29.1	25	M2-2	25	20.8	20.8	M2-2	29.1	20.8	20.8
M2-3	4.16	8.33	4.16	M2-3	4.16	4.16	4.16	M2-3	8.33	4.16	4.16
M2-4	16.6	20.8	20.8	M2-4	16.6	16.6	25	M2-4	25	25	16.6
M2-5	33.3	29.1	25	M2-5	29.1	29.1	29.1	M2-5	29.1	29.1	33.3
M2-6	0	0	0	M2-6	0	0	0	M2-6	0	0	0
M2-7	33.3	33.3	33.3	M2-7	33.3	29.1	29.1	M2-7	29.1	25	33.3
M2-8	0	0	0	M2-8	0	0	0	M2-8	0	0	0
M2-9	37.5	33.3	33.3	M2-9	33.3	29.1	33.3	M2-9	33.3	33.3	37.5
M2-10	0	0	0	M2-10	0	0	0	M2-10	0	0	0
M2-11	45.8	41.6	45.8	M2-11	50	41.6	41.6	M2-11	41.6	41.6	41.6

Anexo IV. Continuación de los Análisis de Varianza de bioensayos preliminares de cepas nativas aisladas de Yucatán.

ANOVA cepa YUC 6						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
<i>T.ni</i>	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	0.000
	Dentro de grupos	0.000	6	0.000		
	Total	0.000	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	0.000
	Dentro de grupos	0.000	6	0.000		
	Total	0.000	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	0.000
	Dentro de grupos	0.000	6	0.000		
	Total	0.000	8			
ANOVA cepa YUC 10						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	26.515	2	13.257	0.685	0.557
	Dentro de grupos	138.613	6	19.344		
	Total	165.128	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	257.160	2	128.580	6.615	0.055
	Dentro de grupos	139.723	6	19.437		
	Total	396.883	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.484	2	5.742	0.404	0.694
	Dentro de grupos	56.856	6	14.212		
	Total	68.340	8			
ANOVA cepa YUC 12						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	104.167	2	52.083	1.642	0.302
	Dentro de grupos	138.613	6	31.713		
	Total	242.780	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	988.652	2	494.326	10.273	0.28
	Dentro de grupos	219.539	6	48.115		
	Total	1208.191	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	3.926	2	1.962	0.078	0.925
	Dentro de grupos	172.781	6	24.922		
	Total	176.707	8			
ANOVA cepa YUC 13						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	15.495	2	7.747	0.307	0.752
	Dentro de grupos	104.447	6	25.177		
	Total	119.942	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	730.004	2	365.001	25.189	0.07
	Dentro de grupos	69.449	6	14.490		

	Total	799.453	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	3.930	2	1.964	0.401	0.696
	Dentro de grupos	47.043	6	4.898		
	Total	50.973	8			
ANOVA cepa YUC 14						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.828	2	1.914	0.247	0.792
	Dentro de grupos	46.208	6	7.724		
	Total	50.036	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	743.184	2	371.591	4.656	0.091
	Dentro de grupos	691.114	6	79.806		
	Total	1434.298	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	15.320	2	7.660	0.992	0.552
	Dentro de grupos	34.723	6	7.721		
	Total	50.043	8			
ANOVA cepa YUC 15						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.828	2	1.914	0.099	0.907
	Dentro de grupos	138.060	6	19.206		
	Total	141.888	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	1551.609	2	775.804	5.727	0.068
	Dentro de grupos	1309.906	6	135.455		
	Total	2861.515	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.762	2	5.880	2.000	0.250
	Dentro de grupos	91.577	6	2.940		
	Total	103.339	8			
ANOVA cepa YUC 16						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.846	2	1.922	1.000	0.554
	Dentro de grupos	23.074	6	1.922		
	Total	26.920	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	81.482	2	40.741	1.409	0.345
	Dentro de grupos	162.132	6	28.912		
	Total	243.614	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	46.482	2	23.241	0.257	0.785
	Dentro de grupos	441.297	6	90.162		
	Total	487.779	8			
ANOVA cepa YUC 21						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	11.481	2	5.740	0.199	0.827
	Dentro de grupos	196.855	6	28.843		
	Total	208.336	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	11.762	2	5.880	0.092	0.913

	Dentro de grupos	266.301	6	63.633		
	Total	278.063	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	27.070	2	13.535	2.829	0.172
	Dentro de grupos	68.336	6	4.784		
	Total	95.406	8			
ANOVA cepa YUC 22						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	0.002	2	0.0009	0.0001	1.000
	Dentro de grupos	68.894	6	8.681		
	Total	68.896	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	2055.500	2	1027.750	0.763	0.36
	Dentro de grupos	588.340	6	117.283		
	Total	2643.84	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	26.609	2	13.304	1.743	0.285
	Dentro de grupos	45.648	6	7.629		
	Total	72.257	8			
ANOVA cepa YUC 23						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>T.ni</i>	Entre grupos	34.722	2	17.360	1.008	0.444
	Dentro de grupos	68.892	6	17.222		
	Total	103.614	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	1001.609	2	500.804	2.117	0.236
	Dentro de grupos	961.851	6	236.542		
	Total	1963.46	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	15.687	2	7.843	1.000	0.446
	Dentro de grupos	429.538	6	7.838		
	Total	445.225	8			
ANOVA cepa YUC 24						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	61.973	2	30.987	0.785	0.517
	Dentro de grupos	219.821	6	39.461		
	Total	281.794	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	258.648	2	129.324	2.056	0.243
	Dentro de grupos	416.950	6	62.884		
	Total	675.598	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	47.035	2	23.517	1.999	0.250
	Dentro de grupos	616.578	6	11.760		
	Total	663.613	8			
ANOVA cepa YUC 25						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	49.846	2	24.923	0.680	0.559
	Dentro de grupos	150.372	6	36.613		
	Total	200.218	8			

<i>S.exigua</i>	Entre grupos	26.980	2	13.490	1.010	0.443
	Dentro de grupos	103.062	6	13.349		
	Total	130.042	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	49.855	2	24.928	1.521	0.323
	Dentro de grupos	115.649	6	16.379		
	Total	165.504	8			

Anexo V. Análisis de Varianza de bioensayos preliminares de cepas nativas aisladas de Chiapas.

ANOVA cepa M2-1						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>T.ni</i>	Entre grupos	11.766	2	5.882	2.002	0.250
	Dentro de grupos	23.520	6	2.938		
	Total	35.286	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	11.484	2	5.742	0.506	0.639
	Dentro de grupos	56.851	6	11.341		
	Total	68.335	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	3.711	2	1.855	0.074	0.930
	Dentro de grupos	115.543	6	25.087		
	Total	119.254	8			
ANOVA cepa M2-2						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.922	2	1.960	0.142	0.870
	Dentro de grupos	82.319	6	13.720		
	Total	86.241	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	0.000	2	0.000		
	Dentro de grupos	0.000	6	0.000		
	Total	0.000	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.480	2	5.740	0.999	0.554
	Dentro de grupos	57.133	6	5.741		
	Total	68.613	8			
ANOVA cepa M2-3						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	26.980	2	13.490	2.806	0.173
	Dentro de grupos	34.730	6	4.807		
	Total	61.710	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	3.844	2	1.921	0.118	0.891
	Dentro de grupos	91.577	6	16.264		
	Total	95.421	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	0.000	2	0.000		
	Dentro de grupos	0.000	6	0.000		
	Total	0.000	8			
ANOVA cepa M2-4						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>T.ni</i>	Entre grupos	27.437	2	13.719	6.996	0.051
	Dentro de grupos	58.801	6	1.961		
	Total	86.238	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	27.085	2	13.543	0.705	0.548

	Dentro de grupos	92.124	6	19.201		
	Total	119.209	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.207	2	5.603	2.000	0.250
	Dentro de grupos	22.414	6	2.800		
	Total	33.621	8			
ANOVA cepa M2-5						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	27.441	2	13.720	2.799	0.174
	Dentro de grupos	23.523	6	4.901		
	Total	50.964	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	3.937	2	1.969	0.402	0.695
	Dentro de grupos	47.031	6	4.894		
	Total	50.968	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	15.500	2	7.750	0.349	0.726
	Dentro de grupos	104.172	6	22.168		
	Total	119.672	8			
ANOVA cepa M2-6						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	15.308	2	7.654	0.208	0.820
	Dentro de grupos	173.612	6	36.636		
	Total	188.920	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	27.441	2	13.720	0.823	0.504
	Dentro de grupos	94.074	6	16.659		
	Total	121.515	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	26.523	2	13.262	2.773	0.176
	Dentro de grupos	69.445	6	4.782		
	Total	95.968	8			
ANOVA cepa M2-7						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>T.ni</i>	Entre grupos	0.004	2	0.001	0.0001	1.000
	Dentro de grupos	138.617	6	14.491		
	Total	138.621	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	26.984	2	13.492	0.400	0.696
	Dentro de grupos	138.609	6	33.717		
	Total	165.593	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	47.035	2	23.517	7.992	0.41
	Dentro de grupos	23.524	6	2.942		
	Total	70.559	8			
ANOVA cepa M2-8						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.918	2	1.959	0.086	0.918
	Dentro de grupos	117.601	6	22.540		
	Total	121.519	8			

<i>S.exigua</i>	Entre grupos	50.320	2	25.160	2.3759	0.209
	Dentro de grupos	69.446	6	10.589		
	Total	119.766	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	27.441	2	13.720	1.750	0.284
	Dentro de grupos	58.800	6	7.839		
	Total	86.241	8			
ANOVA cepa M2-9						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	4.019	2	2.009	0.072	0.932
	Dentro de grupos	115.649	6	27.908		
	Total	119.668	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	236.726	2	118.363	8.777	0.36
	Dentro de grupos	115.929	6	13.484		
	Total	352.655	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	27.453	2	13.726	1.751	0.284
	Dentro de grupos	35.278	6	7.837		
	Total	62.731	8			
ANOVA cepa M2-10.						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>T.ni</i>	Entre grupos	80.928	2	40.464	2.013	0.248
	Dentro de grupos	92.133	6	20.092		
	Total	173.061	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	26.609	2	13.304	1.275	0.374
	Dentro de grupos	45.655	6	10.431		
	Total	72.264	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	11.761	2	5.881	0.500	0.642
	Dentro de grupos	58.804	6	11.761		
	Total	70.565	8			
ANOVA cepa M2-11						
<i>T.ni</i>	Entre grupos	3.750	2	1.875	0.097	0.909
	Dentro de grupos	80.648	6	19.225		
	Total	84.398	8			
<i>S.exigua</i>	Entre grupos	3.742	2	1.871	0.067	0.936
	Dentro de grupos	114.828	6	27.771		
	Total	118.57	8			
<i>H.zea</i>	Entre grupos	35.289	2	17.644	0.512	0.636
	Dentro de grupos	137.776	6	34.442		
	Total	173.065	8			

Anexo VI. Comparación de CL₅₀ y CL₉₀, en µg/cm², de los Formulados Preparados a partir de la cepa nativa YUC-3 de *Bacillus thuringiensis* y el Producto Comercial Dipel[®] 2X contra Larvas Neonatas.

Insecto	Formulación	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL ₅₀	IC 95%	CL ₉₀	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
<i>Trichoplusia ni</i> ^c	F1-3 ^e	504	72	0.600b	0.32-1.21	2.026	0.34-10.41	3.07±0.98	0.08
	F2-3 ^e	504	72	0.405a	0.25-6.59	2.101	0.20-71.99	1.85±0.82	0.12
	Dipel [®] 2X	504	72	0.401a	0.27-0.59	1.824	0.48-27.62	1.99±0.52	1.66
<i>Spodoptera exigua</i> ^c	F1-3 ^e	504	72	0.316a	0.25-0.38	0.811	0.47-2.33	3.17±0.60	3.20
	F2-3 ^e	504	72	0.234a	0.17-0.31	0.940	0.42-4.73	2.16±0.49	2.16
	Dipel [®] 2X	504	72	0.671b	0.32-1.39	3.176	0.44-157.65	1.93±0.61	0.97
<i>Helicoverpa zea</i> ^c	F1-3 ^e	504	72	7.947c	2.70-24.11	21.475	2.11-121.42	3.03±1.31	0.12
	F2-3 ^e	504	72	6.241b	3.15-13.55	20.768	3.34-270.59	2.89±0.95	0.32
	Dipel [®] 2X	504	72	0.682a	0.29-25.24	5.583	0.31-462.59	2.20±0.68	0.28

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, p≤0.005).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en µg/cm² de los formulados por gramo de dieta. IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

^e Formulados con ingrediente activo YUC-3

Anexo VII. Comparación de CL_{50} y CL_{90} , en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, de los Formulados Preparados a partir de la cepa nativa M2-1 de *Bacillus thuringiensis* y el Producto Comercial Dipel® 2X contra Larvas Neonatas.

Insecto	Formulación	n ^a	Tiempo de exp ^d	CL_{50}	IC 95%	CL_{90}	IC 95%	Pendiente± EE	X ²
<i>Trichoplusia ni</i> ^c	F1-M21 ^e	504	72	0.766b	0.32-1.81	2.541	0.35-106.12	2.56±0.92	0.17
	F2- M21 ^e	504	72	0.508a	0.31-0.85	2.249	0.48-93.65	2.25±0.59	0.97
	Dipel® 2X	504	72	0.401a	0.27-0.59	1.824	0.48-27.62	1.99±0.52	1.66
<i>Spodoptera exigua</i> ^c	F1- M21 ^e	504	72	4.473c	2.99-6.75	19.083	4.92-534.34	2.27±0.57	1.44
	F2- M21 ^e	504	72	2.383b	1.64-3.52	14.756	3.75-510.61	1.80±0.48	2.67
	Dipel® 2X	504	72	0.671a	0.32-1.39	3.176	0.44-157.65	1.93±0.61	0.98
<i>Helicoverpa zea</i> ^c	F1- M21 ^e	504	72	6.632c	3.11-14.80	41.690	4.04-661.46	1.93±0.61	0.70
	F2- M21 ^e	504	72	2.659b	1.72-4.09	19.572	3.62-605.24	1.48±0.47	1.35
	Dipel® 2X	504	72	0.682a	0.29-25.24	5.583	0.31-462.59	2.20±0.68	0.28

Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas (ANOVA, DMS, $p \leq 0.005$).

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL_{50} y CL_{90} en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de los formulados por gramo de dieta. IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^d Tiempo de exposición

^e Formulados con ingrediente activo M2-1

RESUMEN BIOGRÁFICO

Candidato para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Tesis: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, PRODUCCIÓN,
EVALUACIÓN Y FORMULACIÓN DE CEPAS NUEVAS NATIVAS DE
Bacillus thuringiensis TÓXICAS CONTRA INSECTOS LEPIDÓPTEROS.

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacido en Cd. Anáhuac, N.L. el 30 de Mayo de 1984. Hijo de Pilar Ornelas Delgado y Ma. Herlinda Pérez Esparza.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas como Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

Experiencia Profesional: Químico Analista y Flebotomista por 11 años.