

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: por ayudarme a llegar a esta meta, pero sobretodo, por estar siempre conmigo, haciéndome sentir su amor y presencia a cada momento. Gracias Dios mío, pues si de algo estoy segura, es que lo logrado hasta ahora es gracias a tu dirección y amor.

A MIS PADRES: quienes me han dado amor, apoyo, confianza y aliento. ¿Cómo podría haberlo hecho sin su ayuda? Este logro es gracia a Uds. Gracias por su amor incondicional!

A MIS DIRECTORES: Dr. Luis J. Galán Wong e Hiram Medrano Roldán. Gracias por su confianza. Gracias por todo el tiempo invertido para que este trabajo saliera adelante. Gracias por participar en mi formación como investigador.

A MI ASESOR EXTERNO: Dr. Michael McGuire de quien estoy profundamente agradecida, puesto que no solo se preocupó en analizar y revisar los experimentos, sino que trabajó conmigo codo con codo, tratando de obtener juntos un trabajo de calidad. Gracias Michael por todas las enseñanzas que me has dado, por compartir conmigo este trabajo, pero principalmente, gracias por tu amistad.

A LOS MIEMBROS DEL COMITE DE TESIS: Dr.. Rafael Castro Franco y Benito Pereyra Alférez, puesto que me ayudaron siempre a que mi trabajo saliera adelante, Rafael, en la parte de investigación de campo; y Benito, en la parte de caracterización de cepas. Gracias por darme su apoyo incondicional, gracias por su amistad.

A LA UANL Y AL CONACYT. A la Universidad, porque me permitió continuar avanzando como investigador. Al CONACYT, por el apoyo económico para la realización de este trabajo (proyecto 3559-N9311) y la beca del posgrado.

A MIS COMPAÑEROS DEL DPTO. DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA: Principalmente a Magda, Carlos Fco., Lucía, Alberto y Juanis, porque su ayuda en la parte experimental del mismo, pero principalmente por saber ser amigos.

A LOS COMPAÑEROS DEL ITD, quienes me ayudaron a realizar las puebas iniciales del trabajo de microcapsulación.

A LOS Dr. BARUCK S. SHASHA Y FERNANDO VEGA DEL USDA, Peoria, Ill., que me dieron importantes sugerencias con respecto a la parte experimental de la patente e incluso trabajaron conmigo, y además me brindaron su amistad, lo cual ayudó a sentirme como en casa a pesar de estar tan lejos.

AL M. C. CIPRIANO GARCIA DEL CIIDIR, IPN, Dgo. quien fue una pieza importante para lograr realizar el trabajo sobre conchuela del frijol, trabajando conmigo siempre con alegría y optimismo.

AL Dr. DAN MILLER: por ayudarme a revisar y corregir la mayor parte de los documentos en inglés. Gracias Danny.

A MI FAMILIA: A todos mis hermanos y cuñados, puesto que siempre me apoyaron, ayudaron y tuvieron confianza en que lo lograría. Gracias por todo el amor que me han dado.

A MIS HIJOS: José Eugenio, Alberto y Alejandra, porque sin saberlo, fueron el impulso mas grande, el mas fuerte. Cuantos días la pasamos separados para poder terminarlo! En cuantas ocasiones me pedían que regresara pronto, que me extrañaban mucho, que me necesitaban! Siempre me llenaron de amor, aún cuando no entendían porque tenía que estar lejos. Y soportaban mi enfado porque me sentía agotada después de un día de intenso trabajo. Y de pilón tener que enfrentar al maestro que los regañaba por no traer el trabajo completo! Gracias pequeños, **LOS QUIERO MUCHO!**

A RICARDO: porque su amor en estos momentos a sido el impulso que me ha permitido continuar, aún en los momentos más difíciles.

ABREVIACIONES

α	alfa
A	Amperes
ARS	Servicio de Investigación Agrícola
β	beta
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	grados centígrados
ca.	aproximadamente
CIIDIR	Centro de Invest. Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional
cm	centímetros
cps	centipoises
δ	delta
EPA	Agencia de Protección Ambiental
<i>et al</i>	colaboradores
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
FIFRA	Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas, EUA
g	gramo
h	hora
ha	Hectárea
Hr	Humedad relativa
IA	Ingrediente Activo
IB	Insecticida Biológico
IQ	Insecticida Químico
IPN	Instituto Politécnico Nacional
ITD	Instituto Tecnológico de Durango
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
Kp	Kilopound
Lab	laboratorio
LD ₅₀	Dosis letal media
LD ₉₀	Dosis letal para el 90 % de la población
l	litro

MIP	Manejo integrado de plagas
μg	microgramo
mg	miligramo
μl	microlitro
ml	mililitro
NCAUR	Centro Nacional para la Utilización de la Investigación en Agricultura
OD	Oxígeno Disuelto
PCI	Proteína cristalina insecticida
psi	Presión interna
r.p.m.	revoluciones por minuto
SECOFI	Secretaría de Comercio y Fomento Industrial
Serovar.	Serovariedad
TE	Temperatura de entrada
TS	Temperatura de salida
Ton	Tonelada
UI	Unidades internacionales
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Luz Ultravioleta
URUZA	Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas
UACH	Universidad Autónoma de Chapingo
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VA	Velocidad de alimentación
V	Voltaje
VVM	volumen de aire por volumen de medio por minuto

RESUMEN

Se caracterizaron y probaron ocho cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuatro cepas mexicanas y cuatro de la colección clave HD. Las ocho cepas se seleccionaron por ser tóxicas contra lepidópteros y dos contra coleópteros. El trabajo se basó en los lineamientos recomendados por la EPA de los EUA para Bt. De acuerdo al antígeno-flagelar se encontró que las cepas C-4 y C-9 pertenecen a la serovariedad *kumomatoensis*; GM-7 y GM-10 a *aizawai*; HD-187 y HD-263 a *kurstaki*; HD-193 a *galleriae* y la HD-530 a *morrisoni*. Las cepas C-4 y C-9 mostraron citotoxicidad (úlceras abiertas) en ratones Balb/C, similar a la cepa control (productora de la β -exotoxina). La inmunodetección de las PCI reveló que las cepas tóxicas a lepidópteros dieron reacción positiva con un antisuero policlonal antiCryIAb en una banda de proteína de ca. 120-130 KDa. Las cepas C-9 y HD-193 produjeron una proteína de ca. 120 y 70 KDa que mostraron reacción con un antisuero policlonal antiCryIAc. Sólo las cepas C-4 y C-9 desarrollaron toxicidad contra larvas de *Epilachna varivestis*. A partir de los bioensayos a nivel de laboratorio, se procedió a elaborar dos tipos de formulados para ser evaluadas en campo. Con el complejo spora-cristales se elaboraron formulados granulados y microcapsulados, ambos a base de harina de maíz nixtamalizado. Mediante bioensayos se comprobó que la actividad tóxica de las cepas en los granulados se conservó (mortalidad del 100%, con 50 μ g/ml, después de dos años de preparado). La evaluación de los granulados se realizó en cultivos de maíz en dos períodos de siembra, usando formulados al 2 y 4% de IA en 1994; y 3% del IA en 1995. Los resultados se evaluaron tomando en cuenta el rendimiento de grano de maíz (Kg/ha). En 1994, con GM-10 se obtuvieron rendimientos de 7,948.8 y 8,825.5, al 2 y 4% respectivamente, comparable al obtenido con la cepa HD-263 (8,972.2 al 4%), y con el insecticida químico se alcanzó un rendimiento de 8,616.7, y superó al biológico comercial Dipel[®] (5,628.6). En 1995 se probaron formulaciones al 3% de IA y, nuevamente, el rendimiento con las cepas GM-10 y HD-262 fue muy similar, alcanzando producción de 6,344.6 y 5,583.3, respectivamente; aún y cuando los formulados tenían dos años de haber sido producidos. Lo anterior indica que ambas cepas aisladas son efectivas en campo, es posible usar harina de maíz nixtamalizado para producir formulados granulados económicos y el producto propuesto tiene una aceptable vida de anaquel. Con respecto a las microcápsulas, éstas se produjeron con diferentes matrices (distintos tipos de almidón y harina de trigo; tres agentes antioxidantes y protectores solares) y dos tipos de secado. Los microcapsulados se evaluaron contra larvas de *Ostrinia nubilalis*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua* y *Trichoplusia ni* y se realizaron pruebas de estabilidad a rayos solares y lavado por lluvia. Los resultados indicaron que es posible microcapsular Bt con esta técnica; se pueden adicionar hasta el 50% del IA sin pérdida de actividad; es factible su aplicación por aspersión y el producto es 35% más económico que el producto actual en el mercado. Los microcapsulados con la cepa C-9 se aplicaron por aspersión en cultivo de frijol en 1994 en Vicente Gro, Dgo.; y en 1995 en Bermejillo, Dgo., sin observarse ataque de la plaga o diferencias en rendimiento de grano. Solo se observó reducción en número de larvas (de 80 a menos de 10). Ensayos de persistencia, realizando infestaciones artificiales semanales, comprobaron estabilidad de Bt formulado de ca. una semana.

ABSTRACT

Eight *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains were characterized, four Mexican Bt strains and four HD strains. These strains were selected for high toxicity against lepidopteran and/or coleopteran larvae. This work was done according to the Environmental Protection Agency (US-EPA, 1988) published a guidelines for those strains. By the antigen-flagellar test GM-7 and GM-10 were identified as the serotype *aizawai*, HD-187 and HD-262 as *kurstaki*, C-4 and C-9 as *kumamotoensis*, HD-193 as *galleriae* and HD-530 as *morrisoni*. Moreover, C-4 and C-9 showed cytotoxicity in mice (ulcers) similar to the β -exotoxin control. Immunoblot of insecticidal crystal proteins (ICP's) showed that strains killing lepidopteran larvae crossreacted with a polyclonal antiCryIAb antiserum in a 120-130 KDa protein band, but the HD-193 produced one 70 KDa protein that crossreacted with an antiCryIAC antiserum. However, only the C-4, and C-9 strains were toxic against the coleopteran *Epilachna varivestis* larvae. From these results were prepared formulations by field trials, Microencapsulated and granular formulations were prepared using the spore-crystal complex as active ingredient (AI) and nixtamalized corn as matrix. The granules were used for lepidopteran pest control on corn plots (*Zea mays*). The field experiment was performed in a semi-arid region in central Mexico in two years, using AI at 2 and 4 % (1994) and 3% (1995), respectively. Bioassays indicated that Bt survived in the gelatinized starch matrix complex (100% mortality with 50 μ g/ml, two years after preparation). Field results (yield, Kg/ha) were similar (7,948.8 and 8,825.5, 2 and 4% GM-10 respectively) to carbaryl (8616.7), and higher than Dipel (5,628.6). In both periods, the highest yields of corn were obtained with strain HD-263 (8,972.3, at 4% in 1994, and 6,344.6 at 3% in 1995) which had originally shown the highest efficacy in bioassays, also by using the strain GM-10 (5,583.3 at 3% in 1995 versus 4,720.3 -control); the latter as a two year old formulation. All this suggested that strains of Bt isolated in Mexico are as toxic as the HD strains; it is possible to use nixtamalized flour and the proposed product has an acceptable shelf-life. The matrices for microcapsules were both cornstarch and nixtamalized corn flour. The stability to artificial solar and rain of Bt in the microcapsules were tested in bioassays with lepidopteran larvae of *Ostrinia nubilalis*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni*. Microcapsules were produced also using several starch types and wheat flour; variable percentages of AI; three antioxidant agents; and solar protectants. Toxic activity was compared before and after the spray dry process. Moisture content in each microcapsule was measured as an indication of shelf-life for commercialization. The results obtained shown that it is possible microencapsulate Bt using spray dry technique. The AI can be used at a percentage of 50% without losing activity. It is possible to be sprayable on any crop, and the product is 35% less expensive than the actual market products. Microencapsulated C-9 was field tested on beans infested with *E. varivestis* in both 1994 and 1995. After applications, damage by this pest was not observed, and no difference in yield was observed. Differences were observed in larvae number after application only (80 to below 10 after application). Persistency assays were conducted through infestation each week demonstrate the longer residuality of microencapsulated Bt.

INTRODUCCION

Un problema principal que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas lo constituyen las plagas, las cuales atacan cultivos en pre y post-cosecha. Existen numerosos agentes que atacan los cultivos, los daños más severos son causadas por insectos, tanto por su diversidad como por su número, además de la extensa cantidad de cultivos que pueden dañar (Falcon, 1971). Tradicionalmente, el control de dichos insectos se lleva a cabo con insecticidas de origen químico (Byerly-Murphy y Bujanos-Muñiz, 1995). De hecho, en 1990 en los Estados Unidos se invirtieron alrededor de 400 millones de dólares en insecticidas a base de carbamatos y organofosforados (Goldburg y Tjaden, 1990). Los inconvenientes que presentan tales productos son su baja o nula especificidad, la rápida aparición de resistencia, alta toxicidad al hombre y animales, la potenciación de los residuos y la contaminación de suelos y mantos freáticos (Cunningham, 1988).

Debido a estos inconvenientes, hoy en día existe mucho interés en encontrar alternativas para evitar el uso excesivo de insecticidas químicos en favor del biocontrol (Payne, 1988; Simone, 1991). El biocontrol es un método más específico y seguro para el ambiente, además de reducir la aparición de resistencia por los insectos (Fox, 1989).

Control biológico en el Manejo Integrado de plagas

El concepto de manejo integrado de plagas (MIP) se originó en el área de entomología agrícola, como consecuencia de los efectos contaminantes de los plaguicidas químicos y aparición de plagas secundarias. Para el inicio de los 70's, el empleo del MIP se fue ampliando, y la aceptación del mismo ocurrió hasta que el empleo indiscriminado de químicos ocasionó el desastre de algunos cultivos, como el algodón, debido a la resistencia desarrollada por los insectos plaga (Flint y van der Bosch, 1981). Entre las alternativas de MIP se utilizan organismos entomófagos y entomopatógenos. Para el primer tipo de control sobresale la utilización de insectos como enemigos naturales de la plaga a controlar y en entomopatógenos tales como bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoarios (Daoust, 1990).

Se conoce como biocontrol al uso de organismos, genes o producto de genes, naturales o modificados, para reducir las poblaciones de organismos indeseables en favor de organismos benéficos (Gabriel y Cook, 1987). El control biológico ha venido

incrementándose en nuestro país a finales de los 70's y existen muchos programas de investigación en muy diferentes áreas (Valenzuela, 1987). Un ejemplo de ello se inició en la región del bajío guanajuatense, donde se utilizó un producto a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para controlar la "palomilla dorso de diamante" *Plutella xylostella* en cultivos de calabaza, obteniéndose protección comparable a la proporcionada por insecticidas químicos (Biever, 1995). Existe una gran cantidad de organismos entomopatógenos, y de ellos sobresalen las bacterias formadoras de endoesporas entre las que destaca Bt.

Empleo de Bt para control de insectos

Bt se encuentra distribuido en los suelos de todo el mundo, aunque se han encontrado en mayor proporción en suelos de Asia (Martin y Travers, 1989). Bt es un bacilo Gram positivo, con flagelos peritricos a excepción de un biotipo, esporulado, fase durante la cual sintetiza un cuerpo paraesporal de naturaleza proteica (cristal) de forma variable, ya sea bipiramidal, redonda, triangular, amorfa, ovoide, cuadrada o rectangular (Insell, 1983). A los péptidos que forman este cristal se les ha llamado proteínas del cristal insecticida (PCI). El cristal sintetizado por Bt puede estar formado por una o diferentes δ -endotoxinas, mismas que pueden causar parálisis intestinal y muerte al insecto. Se ha demostrado que esta toxina es inocua para el hombre y animales superiores, y desarrolla alta especificidad contra larvas de diferentes órdenes de insectos, principalmente Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros (Ignoffo, 1973).

Existen diversas formas de identificar las cepas de Bt, donde destaca la clasificación serológica en base al antígeno flagelar (H). De esta manera, se han logrado identificar 54 diferentes serotipos (Lecadet, 1994). Dentro de todos los serotipos de Bt, solamente ciertas cepas se producen a nivel comercial donde sobresalen las pertenecientes a las serovariedades *kurstaki* y *aizawai* para el control de lepidópteros; *israelensis* para dípteros y las subespecies "san diego" y "tenebrionis" contra coleópteros (Frankenhuysen *et al*, 1992).

Con respecto al empleo de bioinsecticidas, se han estipulado algunos criterios importantes para comercializar un agente microbiano, tales como:

1. Elevada patogenicidad e infección del insecto preferentemente por dentro, por ingestión del bioinsecticida, excepto en el caso de los hongos.
2. Efecto reproducible en condiciones de campo.

3. Efectivo aún a baja densidad de población y amplio espectro de acción.
4. Controlar la plaga y evitar el daño económico a los cultivos.
5. Seguro a la vida silvestre, animales domésticos, a otros insectos y a humanos.
6. Capacidad de crecer en un medio simple, en cultivos sumergidos y económicos de producir en escala masiva a nivel comercial.
7. Persistencia después de la aplicación en el hábitat natural y fáciles de usar.
8. Capaces de reducir o eliminar la necesidad de un tratamiento químico.
9. Ofrecer una ventaja sobre los químicos, ya sea en el precio o en la liberación de regulación gubernamental sobre los residuos.
10. Resistencia para los rayos solares y otros factores ambientales.
11. Cepas libres de fagos y resistencia a bacteriófagos.
12. Manipulable y estable genéticamente.
13. Transportable a cualquier lugar del mundo.

Barack *et al* (1988), Debatov *et al* (1984), (Dulmage. 1967).

La implementación de programas permanentes de aislamiento y selección de cepas nativas de Bt, ha resultado en la obtención de cepas con mayor toxicidad y/o especificidad, alcanzándose más de 400 patentes en EUA. Así mismo, el empleo de herramientas de biología molecular e ingeniería genética en Bt, han permitido conocer a nivel molecular la toxina y los genes que la sintetizan, movilizar estos genes hacia otras bacterias y plantas, alterando las características originales; hechos que promovieron el registro de 22 patentes de cepas Bt transformadas (Feitelson *et al*, 1992; Benedict *et al*, 1992; Gasser y Fraley, 1992; Warren *et al*, 1992; Koziel *et al*, 1990).

Caracterización de cepas de Bt

Las cepas de Bt que hayan mostrado alta toxicidad y/o especificidad en ensayos a nivel de laboratorio, se deben someter a diversos tipos de caracterizaciones, donde sobresalen la caracterización bioquímica, serológica, espectro de acción, tipo de toxina, aspectos de bioseguridad, etc. Por lo anterior, para las autoridades reguladoras como la EPA, a través de FIFRA (Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas) en EUA, es prioridad el considerar los posibles impactos del plaguicida sobre la salud pública y el ambiente. En el caso de organismos no blanco, estos

coexisten de forma natural con las plagas y las aplicaciones a gran escala de organismos desarrollados industrialmente, pueden cambiar el balance natural de los agentes de control biológico y organismos residentes. Los requerimientos normativos para su registro y uso experimental como plaguicidas microbianos naturalmente encontrados, incluyen información de cinco grandes áreas: análisis del producto, análisis de residuos, toxicología, efectos ecológicos y destino ambiental (Betz *et al*, 1990).

Con fines de seguridad, para evitar posibles contaminaciones con productos elaborados a base de Bt, los EUA piden que los mismos se regularicen de la siguiente manera:

1. El organismo usado deberá ser una cepa auténtica de Bt.
2. Métodos de cultivo puro deberán ser usados con control adecuado para evitar cualquier cambio en las características de la cepa original o contaminación con otros organismos.
3. Antes de cualquier otra adición, cada lote deberá ser probado a través del uso de inyecciones subcutáneas de por lo menos un millón de esporas, en 5 ratones que tengan pesos de entre 17 a 23 g, no deberá producir evidencias de infección o daños después de 7 días.

(Betz *et al*, 1990)

Los datos requeridos que ha implementado la EPA de los EUA (US-EPA, 1988), en Diciembre de 1988, para el registro de cepas de Bt incluye lo siguiente:

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. Bioensayos para diversos tipos de insectos.
9. Pruebas de toxicidad intraperitoneal en ratón para la β -exotoxina.

Dentro de la caracterización, la prueba de toxicidad intraperitoneal en ratones para la β -exotoxina es importante, ya que estudios de seguridad realizados con dicha toxina demuestran que la misma provoca la muerte en ratas después de inyección intraperitoneal (Faust, 1973). Cabe destacar que solo algunas cepas de Bt producen este metabolito, y su formación se produce cuando el bacilo se encuentra en su estado de crecimiento vegetativo, liberándola al medio de cultivo. El efecto bioinsecticida de esta toxina se ha evaluado principalmente en control de *Musca domestica*, pero debido a que se ha comprobado que puede inhibir la ARN polimerasa su uso es restringido (Johnson, 1978).

Bt tóxico a lepidópteros

Desde que Berliner dio una descripción de Bt en 1911, cuando lo descubrió infectando larvas de lepidópteros en un cultivo de trigo en Alemania, llegó a la conclusión de que este microorganismo tenía potencial como control del insecto plaga. Poco después, en 1935, en Francia, se desarrolló un producto piloto a base de Bt para el control de lepidópteros en granos almacenados. El desarrollo industrial real vino al final de los 50's con el empleo de fermentaciones líquidas, mediante las cuales se inició el estudio de producción masiva y eficiente de Bt. Para alentar la producción del mismo, se realizó un experimento de campo para el control de la oruga de la alfalfa. Esto fue lo que motivó el interés industrial en los EUA, y se realizó una conferencia para persuadir a muchas firmas de industriales americanos, para producir Bt a nivel de planta piloto. En fechas recientes, en países europeos, Canadá y los EUA, es una recomendación rutinaria el empleo de este bioinsecticida en los invernaderos, en almácigos de tomate, cultivo de flores y otros vegetales para el control de *Trichoplusia ni*, *Plutella xylostella* y *Pieris rapae* (Lambert y Peferoen, 1992).

La clave del MIP es permitir el desarrollo durante la primavera de los enemigos naturales de otras plagas, así como su permanencia y aumentar el desarrollo, hasta tener un máximo de población para el otoño. En lugares donde las plagas se han vuelto resistentes a la mayoría de los químicos el empleo del MIP es la única solución (Byerly-Murphy y Bujanos-Muñiz, 1995). Los productos a base de Bt que se usan para control de lepidópteros representan alrededor de la mitad del mercado actual, y solo dos se elaboran como formulados granulares, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Productos comerciales de *B. thuringiensis* para control de lepidópteros.

Nombre	Compañía	Tipo de formulado	Empleo
Bactospeine 16PB	Duphar	Polvo humectable	Agricultura
Bactospeine 85FLO	Duphar	Pasta	Agricultura
Bactospeine	Duphar	Polvo humectable	Agricultura
		Polvo asperjable	Plantas ornamentales
Bactucide-P	Ricerca chim	Polvo humectable	Agric. Salud. C. golf, Forestal
Bactucide-S	Ricerca chim	Líquido concentrado	Agric., Árboles, C. de Golf
Bernan Bt	Bactec	Polvo humectable	Agricultura
		Polvo asperjable	Alimentos almacenados
		Gránulos	Lepidópteros
Cutlas	Ecogen	Polvo humectable	Vegetales
Delfin	Sandoz	Microgránulos	Agric. Forestal, Jardinería
Dipel	Abbott	Polvo humectable	Agricultura, Árboles, Jardín
Dipel ES	Abbott	Susp.emulsificante	Agricultura
Dipel 2X	Abbott	Polvo humectable	Tabaco, girasol, cacahuete
Dipel 4L	Abbott	Susp.emulsificante	Agric.,Hortic., Invernadero
Dipel 6L	Abbott	Susp.emulsificante	Agric.,Hortic., Forestal
Novo Biobit 32B	Novo	Concentrado acuoso	
Novo Biobit 16K	Novo	Polvo humectable	Agric. C. de golf, Forestal
Novo Foray	Novo	Concentrado acuoso	Agric. C. de golf, Forestal
Thuricide 32B	Sandoz	Concentrado acuoso	Agricultura, Forestal
Thuricide 32LB	Sandoz	Concentrado acuoso	Campos de Golf, Forestal
Thuricide HP	Sandoz	Polvo humectable	Agric. C. de golf, Forestal
Thuricide SC	Sandoz	Concentrado acuoso	Agric. C. de golf, Forestal
Thuricide 48LV	Sandoz	Concentrado acuoso	Campos de Golf, Forestal
Thuricide HPC	Sandoz	Concentrado acuoso	Agric. C. de golf, Forestal

Bt tóxico a coleópteros

La toxicidad de Bt a coleópteros inicialmente se demostró contra el escarabajo colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Krieg *et al*, 1984), por la subespecie "tenebrionis". A partir de entonces se tienen más reportes con la misma variedad contra otros coleópteros (Robert *et al*, 1994). Otra subespecie reportada es la "san diego", ambas pertenecientes a la serovariedad *morrisoni*. Los trabajos realizados a nivel de campo con esta subespecie contra el escarabajo ya mencionado sólo dieron resultados positivos hasta que se emplearon formulaciones microcápsuladas (Zehnder *et al*, 1992). Recientemente se ha reportado la presencia de las serovariedades *mexicanensis*, *morrisoni*, *neolonensis* y *thuringiensis* en *Lasioderma sericorne* (F.), cuyas larvas atacan tabaco almacenado. Los resultados mostraron que con excepción de la *mexicanensis*, presentaban homología serológica con la subsp. *tenebrionis*. La variedad *thuringiensis* mostró homología con la serovar. *kurstaki* (Kaelin *et al*, 1994).

Con respecto al insecto ya mencionado, el escarabajo colorado de la papa (*L. decemlineata*), los resultados obtenidos con cepas de Bt mostraron que son una buena alternativa de control, al ser inactivo frente a otros insectos benéficos (Ferro y Gelernter, 1989). Posteriormente, empleando la formulación denominada M-ONE en cultivo de papa, se observó en general lo mismo que para el control de lepidópteros; que las larvas de los primeros estadios son más susceptibles a este tipo de bioinsecticidas que los últimos estadios o los adultos, y el resultado de su empleo aumenta significativamente el rendimiento del cultivo (Zehnder y Gelernter, 1989).

En el Noreste de México los cultivos de frijol son severamente dañados por la conchuela del frijol (*Epilachna varivestis*, Mulsant; Coleoptera: Coccinellidae) principalmente (INIFAP, 1992). Las pérdidas económicas por esta plaga ha motivado la implementación de un programa de control por medio de insecticidas químicos y control biológico. El empleo de insecticidas químicos ha tenido algunas dificultades debido a la gran cantidad de los mismos requerido para un control adecuado. En el control biológico, se están valorando dos estrategias: cultivo de variedades resistentes (INIFAP, 1992), y liberaciones de parasitoides naturales, como la avispa *Pediobius foveolatus* (C.), la cual es parásita de las pupas de la conchuela (García-Gutierrez *et al*, 1993). Una tercera alternativa dentro del control biológico es el empleo de cepas de Bt específicas a este insecto. Los reportes que existen a este respecto indican una actividad débil de la variedad *tenebrionis* a este insecto, y también se menciona la

susceptibilidad del mismo a la β -exotoxina (Keller y Langenbruch, 1993). A este respecto, aunque se desconocen reportes de toxicidad contra ellos por la serovariedad *kumomatoensis*; una cepa de Bt nativa de México de esta misma variedad ha mostrado ser una posibilidad como bioplaguicida contra este coleóptero (Medrano-Roldán, comunicación personal). Por lo anterior es necesario realizar una caracterización más amplia para definir el espectro de acción y nivel de actividad tóxica y su seguridad.

Formulaciones a base de Bt

Un insecticida puede introducirse en el mercado en varias formas, y es necesario tomar en cuenta: a) el ambiente del insecto que va a ser controlado, b) el método de aplicación preferido, y c) el uso de formulaciones. Los tipos de aplicación de Bt a cultivos, se ha modificado notablemente en los últimos años. Inicialmente y hasta fechas recientes, se realiza la aplicación del ingrediente activo en forma líquida por aspersión (Lambert y Peferoen, 1992), mediante el uso del complejo espora-cristal mezclado con agua y otros emolientes o aditivos, basado principalmente en los empleados para los insecticidas químicos, aplicado directamente sobre la planta (Angus y Lüthy, 1971). El mercado de productos a base de Bt se ha incrementado notablemente en los últimos años, y aunque solo representa alrededor del 0.1% del mercado actual de pesticidas, las ventajas del producto sobre los químicos con respecto al bajo impacto en el deterioro de la ecología muestran un alto crecimiento anual. Actualmente en el mercado se encuentran alrededor de 50 productos a base de Bt, destacando en número los polvos humectables, seguidas de los concentrados acuosos (Morales-Ramos, 1994). En cuanto al insecto blanco a lepidópteros, seguido por dípteros y coleópteros. Aunque los polvos humectables los más comercializados, tienen la desventaja que el ingrediente activo queda expuesto al ambiente, y su inactivación es rápida (su actividad tóxica disminuye a la mitad en 24 horas). Es por este motivo principalmente que se han buscado alternativas para aumentar la estabilidad y residualidad de los productos a base de Bt, principalmente aquellos que se van a aplicar en campo.

Formulados granulares

Los tipos de aplicación de Bt a cultivos, se ha modificado notablemente en los últimos años, en un intento de aumentar la toxicidad, el número de insectos blanco y la residualidad del mismo. Hasta fechas recientes se realiza la aplicación del ingrediente activo en forma líquida por aspersión (Borgatti y Guyer, 1963), cuyo formulado estaba compuesto del complejo espora-cristal mezclado con agua y algún otro emoliente o aditivo, basado principalmente en los empleados para los insecticidas químicos, y la aplicación se efectuaba directamente sobre la planta por aspersión (Angus y Lüthy, 1971). Este método, tiene como desventaja que el ingrediente activo queda expuesto y su actividad insecticida disminuye drásticamente en poco tiempo (Ignoffo y García, 1978). Por esto se pensó en formular en forma de gránulos los bioinsecticidas elaborados a base de Bt. Los formulados granulares fueron probados exitosamente para Bt (Creighton *et al*, 1961), y fueron comercializados como Biotrol 2.5^R. Posteriormente, Raun y Jackson en 1966 (citados por Ignoffo y Batzer, 1971), utilizaron este método para formular insecticidas y mantener la viabilidad de las esporas de Bt en gránulos de talco, confirmándose su eficacia tanto en laboratorio como en campo. El empleo de harina de maíz como matriz del granulado se realizó con excelentes resultados en Georgia, sobre el cultivo de algodón (Cannerday *et al*, 1975).

La baja estabilidad y persistencia del Bt en el ambiente es un factor indeseable en las formulaciones. Como ya se mencionó, los factores climáticos, especialmente la intensidad de la luz solar, son destructivos debido a que afectan la persistencia de insecticidas microbianos. Diferentes estudios revelaron la inactivación de Bt después de 24 horas de exposición a luz solar simulada debido a la generación de radicales peróxido en los aminoácidos (Ignoffo y García, 1978). Esto propició la adicionar agentes de potenciación, estabilizadores o adherentes. Los resultados positivos fueron observados con cebos de harina de maíz, o adherentes, de los cuales se emplearon algunos carbohidratos, entre los que destacó la sacarosa (Norris, 1978). Levinson (1988), desarrolló un bioplaguicida a base de una mezcla de la toxina de Bt, un compuesto que liga taninos, tales como: poliamida sintética, suero, gelatina, polietilenglicol, un borato o urea y un soporte que puede ser agua o un sólido como piedra pómez. El compuesto que liga taninos asegura la permanencia del insecticida por mayor tiempo sobre la planta sin desnaturalizarse. También se han realizado

pruebas de campo con protectores como: Adjuvante San-285^R, Melazas P/yac^R, Lufilm^R, Triton X-100^R y ADWNP 66^R, carbón activado y colorantes como rojo congo; verde de malaquita, etc.; y también polímeros sintéticos que además de funcionar como protectores solares minimizan la desecación (Couch, 1978). De los más empleados en campo está el rojo congo. Al usar este o ácido fólico en formulaciones granulares se obtiene una estabilidad de 12 días (contra dos días sin capsular), con el 50% de la actividad original (Dunkle y Shasha, 1989), y la melanina en concentraciones líquidas para control de mosquitos (Liu *et al*, 1993).

Para incrementar el consumo por parte del insecto, una alternativa es el empleo de fagoestimulantes y/o atrayentes sexuales. De los primeros, el más comercializado es quizá el Coax^R, ya que actúa como atrayente alimenticio y muestra cierto efecto protector contra los rayos UV, (Moffat, 1990; McGuire *et al*, 1990); obteniendo resultados similares al disminuir en un 75% la cantidad de ingrediente activo mediante su empleo en formulaciones granulares (Bartelt *et al*, 1990). Además de los granulados ya mencionados a base de harina o almidón de maíz, otra forma de poder conservar varios agentes potenciadores en una sola matriz, es mediante alginatos arcillosos (Fravel *et al*, 1985; Bashan, 1986); llegándose a utilizar incluso alginatos bacterianos en formulaciones de biocontrol (De Lucca *et al*, 1989). Una de las formulaciones granulares que se puede usar en cultivos de gramíneas y pastos, es en la que se utiliza como matriz almidón de maíz en estado pregelatinizado (Dunkle y Shasha, 1988; McGuire *et al*, 1990; McGuire *et al*, 1991). La desventaja que tiene este tipo de matrices se debe a su forma (como panal de abeja), peso y volumen; fácilmente se precipitan al suelo durante su aplicación, recomendándose solo en los cultivos antes mencionados, puesto que la emergencia de la hoja permiten que el gránulo quede retenido, y en ese sitio se establecen las plagas a controlar. Además se ha capsulado la protoxina (cristal) de Bt (Lereclus *et al*, 1995).

Sobre estos aspectos, los trabajos de investigación realizados en el laboratorio para la producción de formulados granulares indican que la harina de maíz nixtamalizada es un soporte del formulado eficaz, se polimeriza en frío y forma redes matriciales adecuadas; y el verde de malaquita fue el mejor protector solar. Así también, el extracto de la planta *Agave lechuguilla* actúa como coadyuvante sinérgico con Bt, y el aceite vegetal evita la desecación y favorece la viscosidad del material (Castro-Franco, 1994).

Formulados microcapsulados

Entre las estrategias actualmente utilizadas para alcanzar el mayor potencial de bioinsecticidas se ha requerido el desarrollo de formulaciones más estables, dentro de las cuales la microcapsulación es un sistema muy versátil, ya que permite la elaboración de capsulados sólidos aspersables y fácilmente se le pueden incorporar fotoprotectores para extender la actividad insecticida, fagoestimulantes para atraer más al insecto blanco, agentes de adherencia que evitan la pérdida del insecticida por lavado del follaje etc. La microencapsulación está definida como la tecnología de empaque de sólidos, líquidos y gases en pequeños contenedores o cápsulas; las microcápsulas pueden liberar su contenido a rangos controlados, dentro de condiciones específicas (Sparks, 1981). Esta tecnología se usa para protección, estabilización y liberación lenta (Taylor, 1985; Youngs, 1986). Actualmente es aplicado en alimentos, saborizantes, resinas adhesivas y reactivas, drogas, perfumes, insecticidas, etc. (Flinn y Nack, 1967). Los métodos de capsulación incluyen secado por aspersión, secado por congelamiento, cubierta en base fluidizada, extrusión, co-cristalización, inclusión molecular y co-acervación (Taylor, 1985; Youngs, 1986).

El paso inicial en el proceso de microcapsulación es la selección del material adecuado, referido como la matriz de capsulación. Los materiales comúnmente empleados son el almidón, derivados del almidón, proteínas, gomas, lípidos o cualquier combinación de ellos. Estos materiales deben tener propiedades reológicas importantes, tales como: viscosidad, fuerza de corte, tensión cortante, capacidad de dispersión, cubrir el material activo, etc. (Rao, 1992; Shahidi y Han, 1993). Los materiales tipo polímeros no-iónicos, enriquecidos con otros agentes como la albúmina, ayudan a mejorar la gravidez específica (Baker *et al*, 1989); microesferas de este tipo (poliméricas) se han probado con éxito para formular herbicidas con rangos de liberación controlados (Tefft y Friend, 1993).

Las formulaciones aspersables de Bt están basadas en mezclar el IA con adyuvantes, y requiere de una cantidad determinada de materiales por unidad de volumen requerido. El producto final es el IA atrapado dentro de pequeños gránulos, los cuales se pueden disolver en agua y aplicarse por aspersión (McGuire y Shasha, 1990). Estos microcapsulados elaborados a base de Bt son reflejo de formulados granulares en cuanto a su constitución (Dunkle y Shasha, 1988). Otro ejemplo lo constituyen los alginatos arcillosos y bacterianos que han servido como matriz o

agente capsulante en formulaciones granulares, se han probado posteriormente para la elaboración de microcápsulas (De Lucca y Bland, 1990). También se ha utilizado un polímero llamado Eudragit[®] para elaborar microcápsulas suaves y digestibles. Además se les pueden incorporar protectores para la luz solar como verde de malaquita y pueden producirse con baculovirus o Bt como agentes insecticidas (Bohm y Friend, 1988).

Por otra parte, se han utilizado microorganismos transformados con la toxina de Bt, a partir de los cuales se desarrollaron dos productos basados en el sistema M-Cap[®], que consiste en transferir el gen responsable de la producción de la δ -endotoxina a *Pseudomonas fluorescens*. Mediante el uso de esta tecnología, al final de la fase de crecimiento las células de *Pseudomonas* se inactivan con calor y un tratamiento químico. Posteriormente se emplea la pared celular como microcápsula protectora que encierra la toxina de Bt. Los dos productos obtenidos con esta biotecnología son el MVP[®], que poseen la δ -endotoxina de Bt serovar. *kurstaki*, y el M-One[®], que posee la δ -endotoxina de Bt variedad "san diego" (Gelernter y Zehnder, 1989). De esta forma se incrementó la actividad residual de la toxina, como resultado de la protección de la cubierta celular (Frankenhuyzen y Ortíz, 1990; Gelernter, 1990). En 1990, la EPA, aprobó el uso experimental de este bioinsecticida, el cual fue desarrollado con tecnología de ADN recombinante.

Finalmente cabe aclarar que aunque la mayoría de estos formulados se nombran como microcapsulados, en realidad su tamaño de partícula es de alrededor de 0.5 - 1 mm, siendo quizá mas adecuado llamarlos microgránulos, como se indica en el producto comercial.

Evaluación de Bt en Campo

Las pruebas de campo son la última etapa en la evaluación experimental de un insecticida microbiano y generalmente se efectúan en forma simultánea con pruebas de seguridad que se requieren para su registro. En los EUA se realizan pruebas a escala pequeña (menos de 10 acres), cuando se utilizan cepas nativas. Éstas se pueden llevar a cabo sin notificar a la EPA. En cambio, experimentos con microorganismos modificados genéticamente requieren de notificación y permiso de uso a nivel de campo por la EPA, así como las pruebas que exceden de 10 acres. La información obtenida en este tipo de experimentos se utilizan como referencia para establecer las instrucciones de uso de los productos, tiempo de aplicación, rango de

uso, instrucciones de mezclado, aplicación, dosis recomendada en diferentes tipos de cultivos e insecto blanco (Daoust, 1990). Cabe aclarar que aumentar el uso combinado de Bt con nuevas formulaciones e ingeniería genética para mejorar su persistencia, sobre todo en lo que respecta a plantas transgénicas, podría traer como resultado inducir resistencia. Actualmente, el empleo de Bt debe enfocarse a programas de MIP. Lo anterior se demuestra por estudios con cultivos en apio y el MIP con Bt, que ha dado en California una ganancia neta de 1,047 dólares/ha, comparada con 393 dólares/ha para un programa convencional de plaguicida.

Para finalizar, en la FCB-UANL se estableció un convenio con el INIFAP y el ITD, el Departamento de Agricultura de los EUA (USDA; Peoria, Ill.) para realizar trabajos multidisciplinarios. Por tal se ha propuesto realizar investigaciones a nivel de campo con los cultivos que se siembran en mayor proporción en el estado de Durango: frijol (*Phaseolus vulgaris*, L) y maíz (*Zea mays*). La plaga a controlar en el primer cultivo la causada por el coleóptero *E. varivestis* (conchuela del frijol), la cual ocasiona graves pérdidas (del 25 al 100%) en la región del Llano de Durango (INIFAP, 1992); y en el segundo, las causadas por los lepidópteros de los géneros *Heliothis virescens* (gusano barrenador) y *Spodoptera exigua* (gusano soldado) y *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor). Las ventajas que ofrece Bt sobre control de plagas, como alta especificidad, baja residualidad y por ende menor posibilidad de desarrollo de resistencia por el insecto, así como su bajo impacto en el deterioro del ambiente son los principales motivos que nos llevaron a planear los trabajos de campo con este microorganismo. De cualquier forma, la estabilidad de Bt es muy baja (en un día su potencia disminuye a la mitad), e incrementar la misma en una proporción que permita mayor protección cultivo por el ataque de plagas es un punto clave dentro de su empleo como efectivo control biológico. Con respecto a esto nos preguntamos: ¿El empleo de maíz nixtamalizado como matriz de formulados granulares ayudará a aumentar la persistencia de Bt en campo? ¿Las cepas aisladas de México muestran actividad tóxica similar a la de los formulados comerciales a base de Bt a nivel de campo? ¿Dichas cepas son seguras para liberarse en campo? ¿Hasta que punto los formulados microcapsulados protegen la protoxina de Bt de los rayos solares y la lluvia? ¿Es el maíz nixtamalizado una buena matriz del microcapsulado o existen otras opciones mas viables? ¿Se reflejarán los resultados observados en bioensayos de laboratorio en evaluaciones de campo? Para responder a estas preguntas planteamos lo siguiente...

HIPOTESIS

Los formulados granulares y microcapsulados a base de maíz nixtamalizado ayudarán a proteger la protoxina de cepas nativas *Bacillus thuringiensis* de los factores ambientales y aumentarán la persistencia del mismo al aplicarse en campo para control efectivo de plagas, logrando tener un bioinsecticida que se pueda comercializar, aplicarse en cualquier tipo de cultivo y elaborado con materiales seguros y de menor costo.

OBJETIVO GENERAL

Elaborar formulados granulares y microcapsulados de diferentes serovariedades de *Bacillus thuringiensis* y evaluarlos a nivel de laboratorio, invernadero y campo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I) Caracterizar, en base a los lineamientos propuestos por la EPA para Bt, ocho cepas de las serovars. *aizawai*, *gallerie*, *kumomatoensis*, *krustaki* y *morrisoni* para su uso seguro en pruebas a nivel de campo.
- II) Evaluar a nivel de campo formulados granulares de diferentes serovariedades de Bt para el control de plagas de lepidópteros.
- III) Elaborar formulados microcapsulados a base de matrices de harina nixtamalizada y almidón de maíz, para su aplicación por aspersion.
- IV) Evaluar la actividad tóxica de los microcapsulados en pruebas de invernadero y campo para el control del coleóptero *Epilachna varivestis*

MATERIALES Y METODOS

La descripción de la metodología se encuentra dentro de los artículos que se generaron como resultado de la presente tesis. La forma en que se realizaron los bioensayos se encuentra descrita en el capítulo del libro editado por la Academic Press. El orden en que estos aparecen dentro del texto es el siguiente:

Artículos:

- I. Characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* toxic for lepidopteran and coleopteran larvae
- II. New granular formulations based on corn meal with different serovar. of *Bacillus thuringiensis*
- III. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*
- IV. *Bacillus thuringiensis* microencapsulated formulation for control of the coleopteran *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae)

Capítulo en Libro: *Bacillus thuringiensis* bioassays into artificial diets. 1996. In: Manual of techniques in insect pathology. L. A. Lacey . (ed.). Academic Press, England (en prensa).

Patente: Microcapsulación de pesticidas (en trámite).