



ACADEMIC
PRESS

Academic Press Ltd
24-28 Oval Road
London NW1 7DX, UK
Tel: +44 (0)171-482 2893
Fax: +44 (0)171-267 0362
E-mail: *initialsurname@apuk.co.uk*

C/FG

21 March 1996

Patricia Tamez-Guerra and Luis C Galan-Wong
Departamento de Microbiologia
Facultad de Ciencias Biologicas
Universidad Automoma de Neuvo Leon
S. Nicolas de los Garza
Nuevo Leon, AP 2790 64450
Mexico

Dear Dr Tamez-Guerra and Dr Galan-Wong

MANUAL OF TECHNIQUES IN INSECT PATHOLOGY edited by Dr L A Lacey

We have had a note from Dr Lacey informing us that you are now co-authors on Dr McGuire's chapter. Dr McGuire has already signed a contract with us (I enclose a copy for your information): Also, because he is a US Government employee he cannot accept any payment and the copyright in the contribution remains in the public domain. I wanted to let you know that even though you are not US government employees we have to treat the chapter's copyright as above but of course you will get the one time payment. I hope you will have no problem with this.

Yours sincerely

Francesca Georgiou
Contracts Department

Enc.

TABLE OF CONTENTS

III Bacteria

- 3 Bioassay of *Bacillus thuringiensis* against Lepidopteran larvae
 - A. Introduction
 - B. Diet-based bioassays
 1. Cup preparation
 2. Sample preparations
 - a. Concentrations
 - b. Making the dilutions
 3. Infestation, incubation and evaluation
 - C. Bioassay of granular formulations of *B. thuringiensis*
 1. Laboratory bioassays
 - a. *B. thuringiensis* extraction
 - b. Bioassays of extracted *B. thuringiensis*
 2. Greenhouse bioassays
 - a. Application and infestation
 - b. Incubation and evaluation
 - D. Bioassay of sprayable formulations of *B. thuringiensis* on leaf surfaces
 1. Application of *B. thuringiensis*
 - a. Track sprayer
 - b. Spreading
 - c. Leaf dipping
 2. Concentration of *B. thuringiensis*
 3. Disk bioassay
 - a. Removal of leaf disk
 - b. Addition of insects
 - c. Incubation and evaluation
 4. Measuring solar stability of foliar deposits of *B. thuringiensis*
 - a. Solar simulators
 - b. Treatment of leaves
 - c. Exposure
 5. Measuring rainfastness of foliar deposits of *B. thuringiensis*
 - a. Rain simulator
 - b. Preparation of plants
 - c. Rain application
 - E. Conclusions
 - F. References

Bioassay of *Bacillus thuringiensis* Against Lepidopteran Larvae

Michael R. McGuire, Luis J. Galan-Wong, Patricia Tamez-Guerra

A. Introduction

The order Lepidoptera contains some of the most damaging pests known to mankind. Control of these pests has relied almost exclusively on chemical pesticides. The discovery that *B. thuringiensis* was capable of killing certain species of lepidopteran larvae provided a true breakthrough in the management of these pests because *B. thuringiensis* is relatively easy to produce in large quantities and can be made commercially. However, as previously described, there is a wide diversity of *B. thuringiensis* isolates and new ones are continually discovered. The use of bioassay to ascertain activity of new isolates or formulations of bacteria is a necessary task if information related to pesticidal activity is desired. Although bioassays are principally used to assess the insecticidal activity of the protein toxins found in the parasporal inclusions of *B. thuringiensis*, bioassays may also be employed to determine the role of spores and spore/toxin interactions in the activity of a particular isolate or fermentation run. Bioassays can be used to determine host range, relative activity, speed of kill, and other factors that are important in the selection of strains, fermentation conditions, and formulation ingredients used to produce this very diverse species. Even within Lepidoptera, susceptibility can vary greatly depending on which type of toxin or combination of toxins is present (see III-A, Table 4, this Manual). Because the interaction between spore and crystal is not well understood and insects vary in their susceptibility to different spore/crystal combinations, it is important that spore counts are done in the initial phases of assessing activity. Ultimately, however, fermented bacteria must be assayed for insecticidal activity against the insect species of interest as well as non-target insects.

A clear understanding of what criteria will be used to assess activity (e.g. mortality, morbidity, growth reduction, etc.) must be delineated prior to starting bioassays. Also, statistical analysis of data recovered from the bioassays must be preplanned. There is a large number of statistical software packages available but statistical tests must be used judiciously and care must be taken to select the appropriate test. See Chapters II and III-2 in this Manual for a full discussion of the use of appropriate tests. In addition, Robertson and Preisler (1992) give an excellent overview of the relation of probit analysis to bioassay.

Most of the main parameters that must be considered in the design and implementation of bioassays for the evaluation of *B. thuringiensis* against Lepidopteran larvae are similar to those presented

elsewhere in this manual for a broad range of entomopathogens. There can be an infinite variety of procedures for considering the myriad potential targets and their feeding habits. One standard bioassay that has been adopted by industry to ensure consistency within and among products was developed by Dulmage et al. (1971) and should be read by all those interested in developing a bioassay screening protocol. However, this assay may not be appropriate for all phases of screening new isolates or formulations. Below, we present a framework of selected assays successfully used against a few insect species. It is up to the individual conducting the research to modify these approaches to fit the needs of the particular species, target host plant, and application conditions. In all cases, the test insects must be vigorous, free of pathogens, genetically representative of the natural population, and similarly aged.

B. Diet Based Bioassays

Diet incorporation assays are an excellent way to determine activity and host range of bacteria, viruses, and protozoa when a direct measure of activity is desired. This method can also be valuable when small quantities of bacteria are produced using less than commercial-scale fermentation equipment (e.g. shake flask cultures, solid phase agar, etc.) that is commonly available in most laboratories. In addition, diet-based assays remove the need to maintain a constant supply of plants in the greenhouse or field. However, insects that cannot be reared on artificial media cannot easily be tested with an artificial diet assay.

The choice of diet incorporation or surface contamination really relates to the behavior of the test insect. *Heliothis virescens*, for example, feeds by grazing across the surface of the diet and surface contamination may be preferable. An insect like *Ostrinia nubilalis*, however, often spends little time on the surface and will bore into the medium. Thus, diet incorporation is preferable for this type of insect. One factor that is consistent across both tests is that the active agent must be stable in the diet. Many recipes for diets contain antimicrobial agents that can suppress the activity of bacteria. Conversely, the diet should not support the germination and growth of bacterial spores over time. Sometimes this can be a dilemma because ingredients in the diet that suppress growth of *B. thuringiensis* may also inhibit activity after ingestion. Careful screening of diet ingredients may be necessary to determine the role of diet ingredients in the activity of *B. thuringiensis*. A suggested diet for rearing and for bioassay of *H. virescens*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni* and others is presented in Table 1.

Chapter II in this Manual gives an excellent graphical interpretation of both surface contamination and diet incorporation assays. Below, we present some of the more technical information that is essential to obtaining reliable and consistent results from diet-incorporation bioassay of *B. thuringiensis*.

1. Cup preparation: Containers for larvae should be uniform, clean, and able to hold larvae individually. Disposable 5 dram, clear plastic cups are preferable but care must be taken to ensure lids are fastened securely enough to prevent escapes. Often, when a larva feeds on *B. thuringiensis*, it begins wandering and will find a way out of the cup if possible. Plastic jelly trays with sealing Mylar lids also work well. For development of data suitable for LC_{50} determination, a minimum of 50 cups per dilution is required.

2. Sample preparation. All suspensions should be prepared and diluted in sterile distilled water or in a buffered saline solution containing 0.85% NaCl, 0.6% K_2HPO_4 , and buffered to pH 6.5 with citrate buffer solution. If the test sample is difficult to wet, 2.5 ml of a 1% Tween 80 solution may be added to each 100 ml of the saline solution.

a. Concentrations. Selection of suitable concentrations for accurate LC_{50} determination may require some preliminary experimentation with high and low concentrations of the test sample. Once a suitable range of concentrations is established, six or seven serial dilutions of test material should be made. As has been previously discussed, concentrations at the extreme ends of the dose response curve are less informative to the probit model than data points in the linear phase. In general at least two concentrations above and two concentrations below the LC_{50} concentration should be used. Control samples using water or saline are essential for correct interpretation of any bioassay. In general, no corrections to the final mortality of each dilution are necessary if control mortality is less than 5%. However, treatment data may be corrected for control mortality above 5% by using the formula developed by Abbott (1925). Experiments where control mortality exceeds 20% should be repeated.

b. **Making the dilutions.** It is very easy to make errors in dilution and in keeping track of dilutions while setting up an experiment. The following set of procedures is offered as guidance to minimize these errors.

i) Tubes with the diluted sample should be labeled with masking tape with the final concentration in the diet.

ii) Each suspension is homogenized with a vortex mixer just prior to making the next dilution in the series and again just before adding it to the diet.

iii) The diet should be cooled to 55°C and maintained at that temperature until used. Samples are diluted 1:10 into aliquots of diet and mixed thoroughly by blending 4 min at high speed in a Waring blender (a variable speed transformer should be used to bring the blender up to speed to avoid splashing) or blending 2 min at high speed in a malted milk mixer. While mixing, the tape is transferred to the mixing container. Timers should be used to precisely control the amount of mixing that occurs.

iv) The diet/dilution can then be poured into cups and allowed to solidify and dry before addition of larvae. The amount of diet in each cup should be sufficient to maintain the life of the insect throughout the incubation phase but is not otherwise critical because the concentration of *B. thuringiensis* is constant throughout the diet. An amount of approximately 5 ml is usually sufficient for most species. If plastic jelly trays are used, diet is added to each cavity and allowed to set for about an hour. After larvae are added, a sheet of Mylar is then pressed onto the surface and heated with an iron to bond the surfaces. Small holes can then be punched in the Mylar over each cavity by using a small board with small brads.

v) The masking tape can then be transferred to the tray containing the cups.

3. **Infestation, incubation and evaluation.** Larvae should be similarly aged, free from pathogens or other contaminants and highly vigorous. Larvae must be carefully transferred individually to cups using a camel's hair brush. If possible, the

larva should be allowed to 'silk' off the brush and onto the diet surface. Damage to the insect from this transfer process is difficult to observe but will affect the results. While infesting, larvae should be transferred to the most dilute sample first. If the brush touches the diet surface, it should be cleaned to avoid contaminating subsequent larvae. The cups containing larvae should be incubated at constant temperature and humidity and no movement of larvae among cups should be allowed.

Temperature and humidity levels will vary for different species but, in general, 25-30°C and 40-60% RH are acceptable. Assays are evaluated after 4-7 d by examining each cup. Because the plastic covers are clear, there is usually no need to open the cup to assess mortality. If there is any question, the larva should be prodded to ascertain mortality. If any movement is observed, the larva must be scored as alive.

C. Bioassay of granular formulations of *B. thuringiensis*

1. Laboratory bioassays. Granular formulations present a challenging case for determining the activity of *B. thuringiensis* on or in the granules. In our experience, *B. thuringiensis* granules (even those formulated with feeding deterrents) placed in an enclosed dish with neonate larvae will kill all larvae, probably because larvae sample their environment by tasting. Therefore the *B. thuringiensis* must be extracted from the granule to determine its activity in a laboratory setting.

a. *B. thuringiensis* extraction. If *B. thuringiensis* is simply sprayed onto the outside of the granule, as is the case with many corn grit or sand based formulations, soaking the granules in water with a detergent such as Tween followed by vigorous agitation (e.g. a Waring Blender) is suitable. The suspension that is recovered by filtering can then be used for bioassay. If, however, the granules contain the *B. thuringiensis* within a matrix such as cornstarch or other polymer, the granule must be digested to liberate the *B. thuringiensis*. In the case of cornstarch granules, α -amylase will digest the material sufficiently to retrieve the *B. thuringiensis*. Two ml of a 1 mg/ml suspension of α -amylase can be added to 100 mg granules and incubated at 37°C for 1 h. This mixture is then ground up with a tissue homogenizer for 10 s.

b. Bioassay of extracted *B. thuringiensis*. Once the *B. thuringiensis* is extracted from the granules, it can be tested either through diet incorporation as previously described or it can be tested with the droplet feeding method (Fig. III-3-1) described in Chapter II. (Also, see McGuire et al. 1994).

2. Greenhouse Bioassays. While data gathered from the tests above will indicate survival of *B. thuringiensis* on or within the granules after exposure to specified conditions (e.g. sunlight), diet incorporation or droplet assays (Chapter II) will not indicate acceptance of the granule or the *B. thuringiensis* itself by target insects. Therefore, bioassay on foliar surfaces is a necessary part of any screening program dealing with the activity or acceptability of new *B. thuringiensis* isolates and formulations. The anti-feedant effects caused by *B. thuringiensis* are well known and formulations designed to stimulate feeding may help alleviate this problem (Bartelt et al 1990). In general, *B. thuringiensis* granules are used to control insect pests that attack plants with 'holding' structures such as the whorl or leaf axils of a corn plant. One example is the European corn borer, *O. nubilalis* in corn. Currently, the use of *B. thuringiensis* is increasing in corn and is starting to replace some of the more toxic synthetic chemical compounds.

a. Application and infestation. In the greenhouse, formulations can be tested on corn plants simply by placing an appropriate amount of granules in the whorl of V6-V7 (6-7 leaves present on the corn plant) stage plants and then introducing 20-25 neonate *O. nubilalis*. 75 mg granules per whorl will approximate actual field application rates of 11.2 kg/ha (10 lbs/A) in a typical field.

b. Incubation and evaluation. A week later, the live corn borers can be easily counted by unrolling the whorl of the plant. Most larvae will be within the whorl but a few may be in the leaf midrib or within the axils of the lower leaves (Fig. III-3-2). While about half of the corn borers in the controls will crawl off the plants, this test still gives a good approximation of formulation acceptance by insects in relation to the surrounding corn tissue and has been shown to yield results similar to those seen under

field conditions (Gillespie et al. 1994). Because of the high control mortality, at least 6 replications per treatment should be done. To analyze these data, analysis of variance followed by a multiple range test to examine differences among means (e.g. protected least significance difference test available on many computer statistical software packages) will indicate differences in activity of new preparations.

D. Bioassay of sprayable formulations of *B. thuringiensis* on leaf surfaces.

In Chapter II, Evans and Shapiro outlined a leaf disk method of bioassay wherein a larva was allowed to consume an entire leaf disk which had been contaminated with virus. This assay works well for larger instar insects, but for neonates, the disk is rarely eaten entirely and the anti-feedant effects of *B. thuringiensis* may inhibit full ingestion leading to variability in the amount of toxin obtained by each larva. Another example of a leaf disk test is to allow insects to live on the contaminated disk for a specified period of time and then assess mortality. One advantage to this method is the presence of uncontaminated leaf tissue (i.e. the underside of the leaf disk) which will give some information of feeding preference by insects. Cotton is an excellent choice, assuming the test insect will feed on and survive on the foliage, because it lasts well in sealed dishes, provides plenty of food and moisture, and will support insects such as *O. nubilalis* for up to a week. If other test insects will not survive on cotton, other plants can be used. However, some screening must occur prior to bioassay to ensure that the quality of the leaf tissue does not deteriorate to the point of weakening insects over the anticipated course of the study. It may be necessary to immerse the stem of the leaf in a sealed tube containing water, agar, or nutrient medium (KNOPS see appendix) to maintain the necessary leaf quality. Another aspect that must be considered in choice of leaf disk size and number of insects per leaf disk is the cannibalistic nature of the larvae. Insects such as *O. nubilalis* and *T. ni* will live in large numbers together without eating each other. Insects such as *H. virescens*, however, are cannibalistic and must be held individually.

1. Application of *B. thuringiensis*: There are three main ways of treating plants: spraying from overhead (e.g. track sprayer, Fig. III-3-3), spreading a known amount across a marked area of a leaf, or leaf dipping. Each offers different advantages.

a. **Track sprayer.** The track sprayer (Devries Research Track spray Booth, Hollandale, MN) can be used to simulate actual field applications. The nozzle is interchangeable, the spray pressure adjustable, and the track assembly has speed adjustment. Volumes of water applied can range from 46 L/Ha (5 gal/A) up to 460 L/Ha (50 gal/A) or higher depending on the above adjustments. Also, spray splashing, dripping, etc, is more likely to imitate field situations. This type of application is ideal for screening large numbers of *B. thuringiensis* isolates or formulations when absolute accuracy of dose response is not essential. This method will also give valuable data related to formulation performance coming through an agricultural-type nozzle. Care must be taken to ensure that all areas of each leaf in the chamber were contacted by the spray suspension. Areas not touched by the spray can be marked out with a permanent marker and not used in subsequent assays. Disadvantages to this method center around the amount of dripping and splashing that are involved that may lead to inconsistent deposition of toxin on the leaf surfaces. However, once a series of formulations has been tested under more precise conditions, this method can be used to more accurately reflect actual field conditions.

b. **Spreading.** The spreading method involves marking an area on a leaf surface, say 33 cm², with a permanent marker, and then applying a carefully measured amount of solution (100 μ l to simulate 233 L/Ha (25 gal/A)) to that area via pipet. The droplet is then carefully spread across the leaf surface with a glass rod and allowed to dry. If necessary to achieve even spreading, a small amount (0.1% v/v) of Tween 80 can be added. This method gives a carefully controlled dosage of active ingredient and can be used to do LC₅₀ determinations, or for examining subtle differences in activity and acceptance of *B. thuringiensis* or formulations. Disadvantages of this method include the labor intensiveness of the application and the use of only one disk per leaf to avoid contamination.

c. **Leaf dipping.** This method requires much larger volumes of material than either of the two previously

described methods. An excised leaf or entire plant is immersed in a suspension of *B. thuringiensis* and then allowed to dry. All surfaces of the plant are covered but there can be a very large difference in the amount of material adhering to the treated surfaces. Plants such as cabbage have very waxy leaves that may repel liquids and lead to a very low accumulation of toxin. Also, leaves on the same plant may have quite different characteristics based on growing conditions and age. This method should only be used if other methods are not available.

2. Concentration of *B. thuringiensis*. Concentration of *B. thuringiensis* should be tested to determine the dosage optimal for discerning differences among treatments. For example, field rates of *B. thuringiensis* will kill 100% of test *O. nubilalis* neonates when applied under laboratory conditions. To determine if a particular isolate or formulation is more or less effective than a commercial product, it is best to have a dosage of the commercial product that will not kill 100%. Ideally, a concentration that will kill insects in the straight line portion of the log dose curve will allow for optimal estimation of loss or gain of activity due to formulation or exposure to environmental factors. For *O. nubilalis*, a dosage of 20 mg Dipel 2X for every 50 ml spray solution applied at a rate of 233 L/Ha will kill approximately 80% of the test insects. However, for other insect species, this dosage may need to be changed depending on the susceptibility of the particular insect.

3. Disk bioassay. Following application and any subsequent treatments (e.g. solar exposure, rain test, see below), leaf disks can be removed and placed in plastic dishes.

a. Removal of leaf disk. Tools can be made by sharpening the edge of metal pipe to quickly cut the disk from the leaf. The size of the disk is not critical, because a certain amount of material has been applied per unit area, but the disk must be large enough to support the number of insects that will be placed in the dish. A piece of filter paper should be added to the dish and can be left dry to soak up moisture from a succulent leaf such as cotton, or water can be added to the paper to provide moisture to a thin or dry leaf.

b. Addition of insects. For *O. nubilalis*, ten neonates will survive well for the three day duration of the test on a leaf disk of 33 cm². Larvae should be added following the techniques described above. For cannibalistic insects, small disks and small dishes may be used to hold insects individually.

c. Incubation and assessment. After application of larvae, the dish is sealed and incubated for a time sufficient for mortality to occur (this will vary depending on species, size, *B. thuringiensis* dosage, etc. and must be ascertained for each situation). Self sealing dishes can be used, or seal the dish with two wraps of stretched parafilm. Dishes should be incubated at constant temperature amenable to insect development. Following a specified time, the dishes are unsealed and larvae counted. For *O. nubilalis* neonates, 3 days is sufficient for mortality to occur. Other, less susceptible insects may require longer incubation times.

4. Measuring solar stability of foliar deposits of *B. thuringiensis*. Inactivation of *B. thuringiensis* by sunlight is a well known phenomenon and has hindered acceptance of *B. thuringiensis* products. The effect of different strains or formulations of *B. thuringiensis* on sunlight stability can be measured in the laboratory by using equipment that is becoming increasingly available.

a. Solar simulators. Solar simulators such as the Suntest CPS (Heraeus, Hanau, Germany) shown in Fig III-3-4, will produce sunlight in both quality and quantity as seen in nature (McGuire et al. In Press). Generally, a xenon-based light source is used and then filtered through special glass to provide an adequate representation of sunlight.

b. Treatment of leaves. Cotton plants should be treated with the glass rod technique described above and then placed under the light source and exposed for designated periods of time. Plants must be staked up such that all leaves that are exposed are equidistant from the light source.

c. Exposure. Care must be taken to ensure the plant

does not get burned. This can be avoided by placing a piece of plastic called tefcel (DuPont Corp., Wilmington, DE) between the plant and light source. There is some loss of energy as the light passes through the plastic but the representation of wavelengths remains unchanged. For 50% loss of *B. thuringiensis* activity, 8 h exposure to the light at a distance of approximately 20 cm, is generally necessary but may vary depending on host plant, formulation, and distance from the source. After exposure, the leaf disks can be removed and bioassayed as described above. Untreated plants and plants treated with *B. thuringiensis* but no solar exposure must be included within the same assay to account for variability that occurs between assays.

5. Measuring rainfastness of foliar deposits of *B. thuringiensis*. Rainfall also washes *B. thuringiensis* deposits off of foliar surfaces. Fermentation conditions and formulation may greatly affect the rainfastness of *B. thuringiensis* so procedures to measure this characteristic could be useful.

a. Rain simulator. The spray chamber described above can be converted into a rain chamber. Water is fed to the line that provided air pressure to the spray nozzle, and, when turned on, water comes through the nozzle. An electronic switch can be installed that keeps the head traversing back and forth over the plants. Again, by changing speed, nozzle, pressure, etc, the rate of rainfall can be adjusted to mimic a light rain or a heavy downfall.

b. Preparation of plants. After plants are treated with *B. thuringiensis* and allowed to dry thoroughly, they can be placed in the rain simulator. It is important that the plants be placed in the center of the simulator at a distance of about 1 m from the spray nozzle. And 0.5 m from the ends of the chamber. Plants placed too close to the ends of the chamber may receive more water because the nozzle assembly briefly pauses at each end.

c. Rain application. A good test of rainfastness involves application of 5 cm rain over a 50 min period. This simulates a relatively heavy rain and gives a good

indication of the ability of a formulation to resist rain. Accumulation may be measured simply by placing a rain gauge in the simulator at the same height as the leaves. After drying, leaf disks can be cut and assayed for retention of activity as above.

E. Conclusions

Laboratory bioassay can be an extremely useful tool to screen isolates of *B. thuringiensis* for activity against multiple insect species and to determine the effect on insects provided with a choice of potential feeding substrates. Ultimately, field tests which are often time consuming and expensive will have to be conducted. By using the full range of laboratory and greenhouse bioassays available, many potential treatments can be eliminated before the field work begins.

F. References

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267
- Bartelt, R. J., McGuire, M. R., and Black, D. A. (1990). Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Environ. Entomol.* 19, 182-189
- Dulmage, H. D., Boening, O. P., Rehnborg, C. S., and Hansen, D. G. (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. *J. Invert. Pathol.* 81, 240-245
- Gillespie, R. L. McGuire, M. R., and Shasha, B. S. (1994) Palatability of flour granular formulations to European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 452-457
- McGuire, M. R., Shasha, B. S., Eastman, C. E., and Oloumi-Sadeghi, H. (In press). Effect of starch and flour based formulations on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*
- McGuire, M. R., Shasha, B. S., Lewis, L. C., and Nelsen, T. C. (1994). Residual activity of granular starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 87, 631-637
- Robertson, J. L. and Priesler, H. K. (1992). "Pesticide Bioassays with Arthropods" CRC Press, Boca Raton. 144 pp.

Table 1. Diet used for rearing and bioassay of lepidopteran insects

Group	Ingredient ^a	Diet Quantity	Bioassay Quantity
I	Distilled H ₂ O (heated to boiling)	1,200 ml	1,200 ml
	4M KOH	18 ml	4N KOH 6 ml or 22% w/v
	Casein	126 g	0
	Alfalfa meal (entomological grade)	54 g	Soybean flour, 241.8 g
	Sucrose	126 g	43.80 g
	Wesson salts mixture	36 g	36 g
	Alphacel	18 g	0
	Wheat germ	108 g	108 g
	Ascorbic acid	14.5 g	1.92 g
	Aureomycin (250 mg/capsule)	0.5 g	Chlortetracycline-HCl 0.17 g
	Sorbic acid	4 g	3.4 g
	15% Methyl-p-hydroxybenzoate solution	35 ml	5.0 g
	10% choline chloride w/v solution	36 ml	15%, 24.9 ml
	10% formaldehyde w/v solution	13 ml	13.3 or 15.0
II	Agar dissolved in 2,500 ml boiling DW ^b	90 g	34.8 in 2,000 ml boiling DW
III	Vitamin solution A ^c	12 ml	4 ml ^d
IV	Vitamin solution B ^c	12 ml	0

^aDulmage et al., 1971. Prepare group I in a 1-gal Waring Blendor equipped with a variable speed transformer: add the components in the order listed with the blendor operating at very slow speed. Add group II, cool to about 60-65°C, and add groups III and IV. Adjust transformer to maximum output and continue blending at slow speed for 2 min. Final pH of diet will be about 5.2.

^b DW = distilled water.

° Vitamin solution A: Nicotinic acid amide, 12.0 g; calcium pantothenate, 12.0 g; thiamine hydrochloride, 3.0 g; pyridoxine hydrochloride, 3.0 g; biotin, 0.24 g; Vitamin B₁₂, 0.024 g; distilled water 1,000 ml.

Figure Legends

Figure III-3-1. Droplet feeding bioassay. Neonate larvae are allowed to feed on droplets of *Bacillus thuringiensis* suspensions. Those larvae that feed, as evidenced by the color in the gut, are removed to diet cups for incubation.

Figure III-3-2. Corn plants infested with European corn borer larvae. The plant on the right has been treated with granules containing *Bacillus thuringiensis* while the plant on the left is an untreated control. Note the amount of damage that has occurred in the control plant over a one week period.

Figure III-3-3. A Devries research track spray chamber. The control panel on the left allows modification of nozzle speed and direction while pressure is regulated externally in the air supply. To modify the chamber for rain, the air supply line is replaced with a water supply line, causing water to be expelled from the nozzle. A simple electronic addition to the unit creates a continually traversing nozzle and allows for rain simulation.

Figure III-3-4. A Suntest CPS solar simulator showing plants placed beneath the light source. The door is open to show the reflective sides of the chamber. In this modification, the floor to the chamber has been removed to allow light to pass onto the plants. A piece of Tefcel plastic is placed across the opening of the floor to prevent burning of the leaves. In normal operation, the plants are raised to just below the plastic.



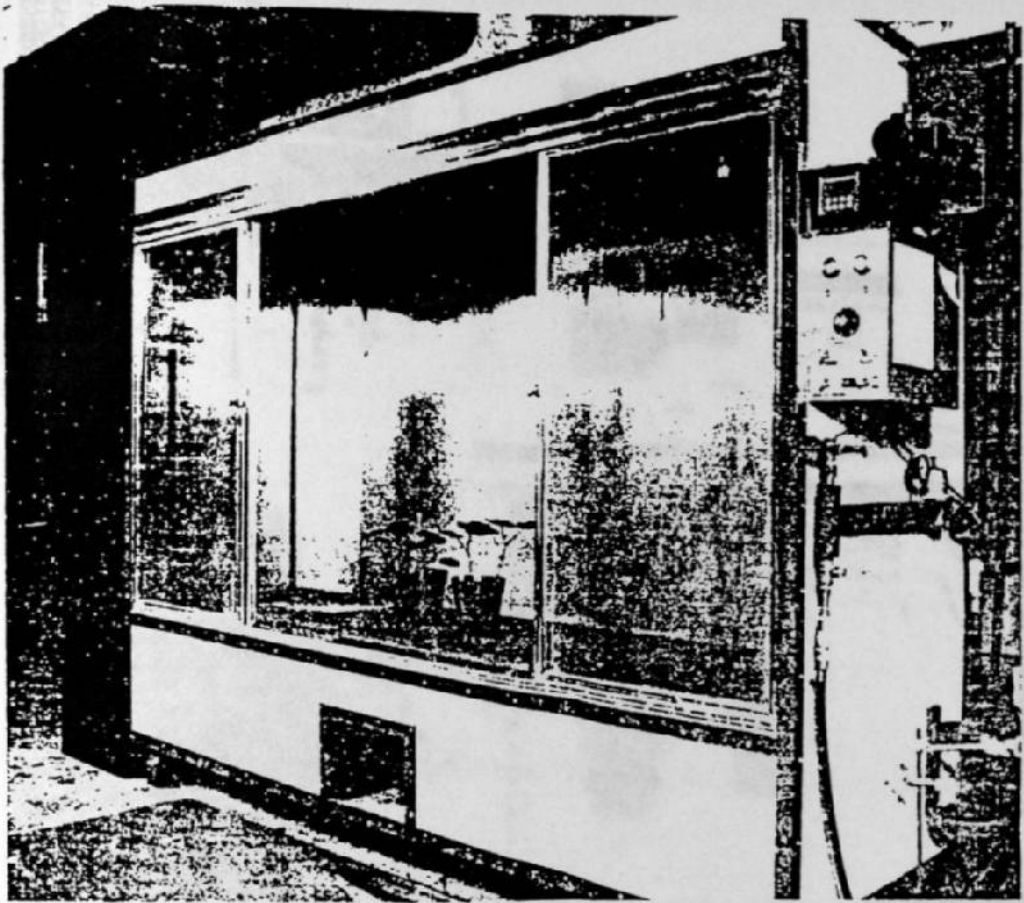
Fig. III-3-1



Fig. III-3-2

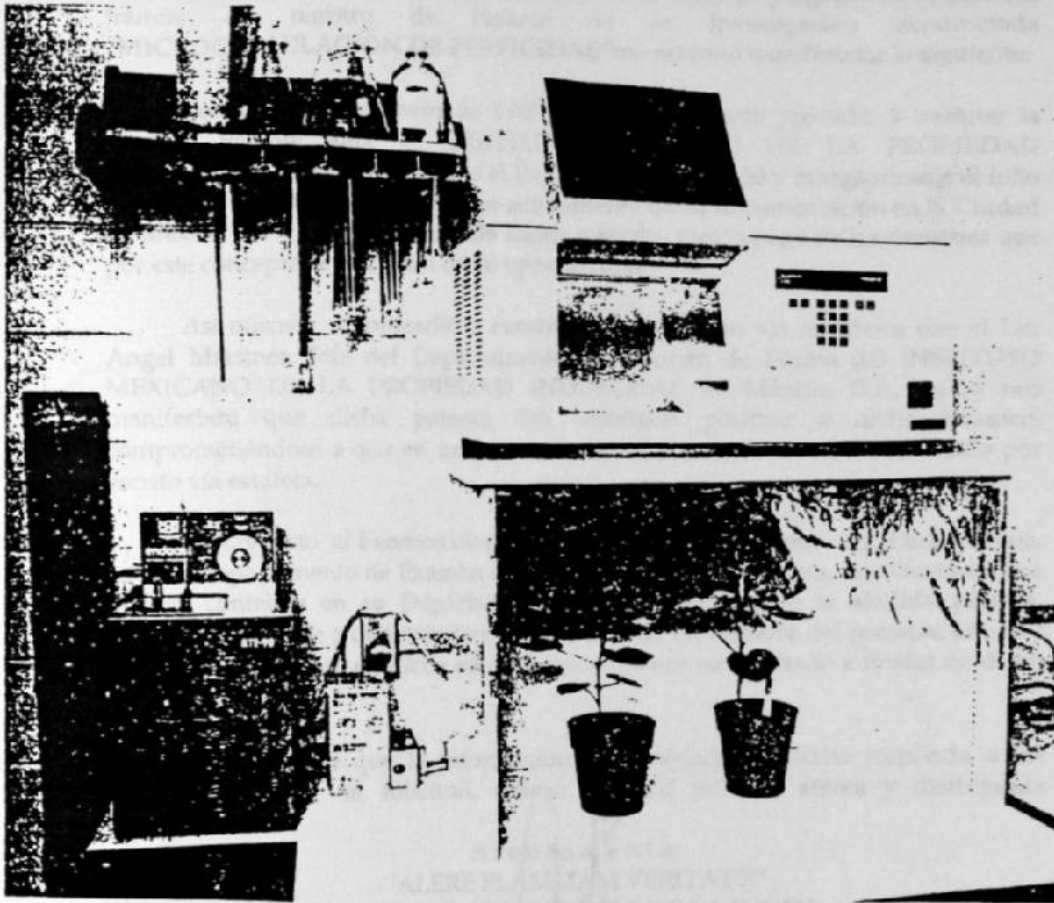


Fig. III-3-3





DR. PATRICIA TANIEL GILBERTO
FIELICIA



EL APODORADO DE LA U.A.N.L.

LIC. JESÚS ALBERTO CORDA PÉREZ

cc: Director de la Facultad de Biología de la U.A.N.L.
cc: Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DEPARTAMENTO JURIDICO

DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA
Presente.-

Por medio de la presente y en relación a su solicitud de grado de avance del trámite de registro de Patente de la Investigación denominada "MICROCAPSULACION DE PESTICIDAS" me permito manifestarle lo siguiente:

Con fecha 15 de enero de 1996 este Departamento procedió a tramitar la referida Patente ante el INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL, registrándose bajo el Expediente No. 960330 y otorgándosele el folio de entrada No. 4059, encontrándose actualmente dicha documentación en la Ciudad de México, D.F., para su examen de forma y fondo, previo pago de los derechos que por este concepto se efectuara en su oportunidad.

Así mismo, se procedió a entablar comunicación vía telefónica con el Lic. Angel Martínez, Jefe del Departamento de Examen de Forma del INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL en México, D.F., quien nos manifestara que dicha patente dió resultado positivo a dicho Examen, comprometiéndose a que en un lapso de un mes contaremos con el resultado por escrito vía estafeta.

Con respecto al Examen de fondo, nos comunicamos con el Ing. Oscar Ochoa, Jefe del Departamento de Examen de Fondo en la capital del país, manifestándonos que ya contaban en su Departamento con la papelería de la aludida patente, comprometiéndose a que más tardar en el mes de Noviembre del presente año nos informará del avance de dicha patente, para obtener su resultado a finales de dicho mes.

En espera de que la información con antelación descrita respõnda a los requerimientos de su solicitud, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente,
"ALERE FLAMMAM VERITATIS"
EL APODERADO JURIDICO DE LA U.A.N.L.

LIC. JESUS ALBERTO CERDA PEREZ.

c.c.p.- Director de la Facultad de Biología de la U.A.N.L.

c.c.p.- Archivo.

css.

MICROCAPSULACIÓN DE PESTICIDAS

PROPIETARIO DE LA INVENCION

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología
Ciudad Universitaria
San Nicolás de los Garza, N. L.
México.

INVENTORES

M. en C. PATRICIA TAMEZ GUERRA, de nacionalidad mexicana, con domicilio en calle Loma Panorámica No. 321, Depto. 1, Col. Loma Larga. 64710. Monterrey, N. L., México.

DR. MICHAEL RAYMOND McGUIRE, de nacionalidad norteamericana, con domicilio en calle E. Pine No. 519. 61548. Metamora, Illinois, U.S.A.

DR. HIRAM MEDRANO ROLDÁN, de nacionalidad mexicana, con domicilio en calle Olmos No. 326, Col. Real del Prado. 34080. Durango, Dgo. México.

DR. LUIS JESÚS GALÁN WONG, de nacionalidad mexicana, con domicilio en calle Mayapán No. 653, Col. Lomas de Anáhuac. 64000. San Nicolás de los Garza, N. L. México.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La microcapsulación está definida como la tecnología de empaque de sólidos o gases en miniatura, lo que da como resultado microcápsulas que pueden liberar su contenido a rangos controlados, dentro de condiciones específicas (Spark, 1981). Este proceso es relativamente nuevo y se usa para protección, estabilización y liberación lenta. Debido a esto tiene una gran aceptación en la industria alimenticia, ya que es económico y flexible y el equipo es fácil de conseguir, produciendo microcápsulas de buena calidad (Taylor, 1985; Youngs, 1986). Los métodos de capsulación incluyen secado por aspersión, secado por congelamiento, cubierta en base fluidizada, extrucción, co-cristalización, inclusión molecular y co-acervación. El paso inicial en el proceso de microcapsulación es la selección del material más 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 adecuadas (viscosidad, fuerza de corte, tensión cortante, etc.; Rao, 1992), capacidad de dispersión, inertes, cubrir adecuadamente el material activo, etc. (Shahidi y Han, 1993).

Por otro lado, de los agentes de biocontrol de insectos, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es quizá la bacteria entomopatógena que se emplea e investiga con mayor énfasis, debido a su potencial para controlar en forma segura las poblaciones de insectos plaga, principalmente a nivel de campo. La forma de introducción del bacilo al campo es un factor clave, debido a la poca estabilidad del microorganismo a factores ambientales, ya que fácilmente es arrastrado por lluvia o inactivado por los rayos solares. Por este motivo se han elaborado formulaciones con ingredientes que ayuden a contrarrestar los efectos nocivos del ambiente y aumenten la residualidad del entomopatógeno. Existen reportes del empleo de harina o almidón de maíz como matriz para capsular *Bt* con buenos resultados (Dunkle y Shasha, 1988), pero tienen el inconveniente de que el formulado queda en forma de gránulos grandes que tienen que ser aplicados en seco, y solo son factibles en cultivos donde el gránulo queda retenido en el sitio donde se alimenta comúnmente la plaga (cogollo del maíz o algodón, pasto, etc.). La información sobre investigación para este tipo de capsulación de *Bt* incluye principalmente el empleo de protectores de rayos solares, adherentes y fagoestimulantes (Dunkle y Shasha, 1989; Liu et al, 1993; McGuire et al, 1989; McGuire et al, 1990); sin embargo, los formulados disponibles comercialmente tienen baja residualidad debido a la degradación por rayos solares o lavado por lluvia. La tecnología para elaborar formulaciones asperjables que se ha desarrollado anteriormente está basada en mezclar el Ingrediente Activo (IA) con adjuvantes, y requiere de una cantidad determinada de materiales por unidad de volumen asperjable, teniendo como producto final al IA atrapado dentro de pequeños gránulos. Estos gránulos se pueden disolver en agua y aplicarse por aspersión (McGuire y Shasha, 1990). La desventaja que ofrecen es que, como se mencionó anteriormente, se necesita cierta cantidad de sólidos por volumen de aspersión, la cual varía según las necesidades requeridas por el usuario final. Por ejemplo, un agricultor que requiere un kilo de material para protección de cultivo contra el ataque de la plaga, necesitará un volumen aproximado de 100 l/ha, o bien, cuatro Kg. para aplicar 400 l/ha, según la plaga a controlar y el tipo de cultivo; es decir, que el volumen requerido varía mucho para una misma área. Debido a estas características la comercialización de formulados granulares se ha desarrollado en forma limitada (McGuire y Shasha, comunicación personal).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A continuación se describirá el proceso para microcapsular pesticidas (químicos o biológicos), y los materiales que se probaron para seleccionar los óptimos necesarios.

Ejemplo 1. Materiales y proceso de microcapsulación propuesto. Para elaborar alrededor de 250 g del microcapsulado a una proporción del 3% de IA a base de *Bt*, se propone lo siguiente: en un recipiente de alrededor de un litro de capacidad se agregan 100.0 g de azúcar pulverizada comercial (Valle Verde), 50.0 g de almidón de maíz comercial (Maicena) y 50.0 g de harina de maíz nixtamalizada comercial (Maseca), como matriz; 0.1 g de sales de oxalato de verde de malaquita (Merk), como protector de rayos UV; 3.6 gr. del IA (material técnico de Laboratorios Abbott⁺, con 64,000 UI/mg de *Bt*, cepa HD-1) y 20 ml de aceite vegetal de cártamo comercial (Capullo). Estos sólidos se homogeneizan con el aceite y se agregan 280 ml de agua a 60°C. Posteriormente se añaden 120 ml de alcohol isopropílico comercial (Capullo) y 0.5 ml de ácido láctico concentrado (Baker). Esta mezcla es entonces sometida al proceso de secado por aspersión (equipo Apex SSE), bajo las siguientes condiciones: Velocidad de Alimentación (VA), 10 ml/min; Temperatura de Entrada del aire (TE), 130°C ± 5°C; Temperatura de Salida del aire (TS), 75 ± 10°C; y Presión de Aire (PA), 4 Kilolíbras. La alimentación de la mezcla y la VA de la misma se realizó con la ayuda de una bomba peristáltica multicanales (Masterflex drives) modelo 07531-10, ajustando la velocidad de salida en forma manual y dejando el paso de la solución constante. Estas condiciones se consideraron como óptimas para el caso de microcapsulación de *Bt*, sin embargo se pueden cambiar de acuerdo al tipo de pesticida que se desea capsular. En este trabajo se eligió trabajar experimentalmente con la bacteria antes mencionada debido a que en el mercado actual de biopesticidas, que se considera de alrededor de US 100,000,000.00, la mayor parte la ocupan productos a base de *Bt*; y en forma general, tecnológicamente existe mayor dificultad para conservar la actividad tóxica de material biológico que de productos químicos.

Ejemplo 2. Propiedades reológicas del microcapsulado. Se probaron diferentes combinaciones de materiales y se realizaron mediciones reológicas para conocer el comportamiento y tipo de fluido de la mezcla y la factibilidad de microcapsular el material. La viscosidad se midió con un viscosímetro (Brookfield RVF), a 25°C. Se realizaron mediciones a los 30 min y dos horas después de realizar la mezcla inicial (Tabla 1). El tamaño de partícula del producto obtenido cuando se empleó solo almidón, a simple vista era pequeña y daba la apariencia de talco; al usar solo harina nixtamalizada, el tamaño de partícula era mayor, de aspecto granular, de aprox. 0.3 a 0.5 mm de diámetro; al emplear ambos materiales, el tamaño de la partícula quedaba intermedio, aunque más similar al obtenido al emplear únicamente almidón.

Tabla 1. Propiedades reológicas de agentes capsulantes al emplear diferentes materiales

	Harina de maíz nixtamalizada	Almidón de maíz	Ambos en proporción 50-50
Viscosidad (cp) ¹	1,434.18	11.26	49.28
Lectura	43.0	3.2	8.0
rpm*	2.0	20.0	20.0
Factor de corrección	33.35	3.52	6.25
Tipo de fluido	no-Newtoniano	Newtoniano	Newtoniano
Esfuerzo cortante	alto	bajo	medio

¹ centipoises.

* revoluciones por minuto

Ejemplo 3. Actividad tóxica a insectos del material microcapsulado. La actividad tóxica del material seco resultante se evaluó contra IA solo (*Bt*, en polvo, Lab. Abbott), empleando insectos lepidópteros-plaga de cultivos de importancia mundial: gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*) y gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*). Para lograrlo se diseñaron dos tipos de bioensayos. En el caso del gusano europeo se emplearon plantas de algodón bajo condiciones de invernadero, de aproximadamente dos meses de sembradas (con 6 a 8 hojas por planta). Se probaron dosis de 5.0 ó 10.0 mg/50 ml de IA, las cuales se adicionaron directamente sobre las hojas, en un sitio previamente marcado de alrededor de 4.5 cm de diámetro. Se cortó el sitio inoculado y se colocó en cajas petri desechables con papel filtro para absorber la humedad. Posteriormente se colocaron 10 larvas neonatas (del primer estadio) por caja, con 10 repeticiones por dosis. Esto se realizó de la misma forma para el testigo, pero sin inocular. Las cajas se incubaron por tres días a 28°C a 55% de humedad relativa, obteniéndose así el porcentaje de mortalidad. Para los demás insectos, los bioensayos se realizaron en medios artificiales, alimentados con la dieta modificada de Shorei, la cual contenía lo siguiente: harina de soya, 7.1 g; germen de trigo, 31.1 g; sales de Wesson, 10.6 g; sacarosa, 13.6 g; ácido sórbico, 1.0 g; metil-p-hidroxibenzoato, 1.6 g; ácido ascórbico, 4.26 g; agar-agar, 15.7 g; formaldehído al 10%, 4.4 ml; cloruro de colina al 15%, 7.3 ml; ácido acético al 25%, 12 ml; solución vitamínica, 3.5 ml; agua destilada, 1,000 ml. La solución vitamínica contenía lo siguiente: pantotenato de calcio, 12.0 ml; niacina, 6.0 ml; riboflavina, 3.0 ml; ácido fólico, 3.0 ml; tiamina, 3.0 ml; piridoxina, 1.5 ml; biotina, 0.12 ml; y vitamina B-12, 25.0 ml. Finalmente la mezcla de vitaminas se aforaba a 1,000 ml. Para estos bioensayos las dosis empleadas fueron: 0.0 (testigo), 0.5, 1.0, 5.0 ó 10.0 µg/ml, según la actividad tóxica del agente a cada insecto. El IA se adicionó directamente a la dieta en estado líquido (a 60°C aprox.). El experimento se realizó en vasos de plástico desechables del No. 00 con 5.0 ± 1.0 ml de la dieta. Cada vaso contenía una larva de cada insecto. Para cada dosis se emplearon 25 vasos y la prueba se realizó por triplicado. Cada lote de 25 vasos se guardó en bolsas de papel y se incubó por una semana bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura que para *O. nubilalis*. El porcentaje de mortalidad se obtuvo por conteo de

larvas muertas, y con los datos se realizaron análisis estadísticos por el método de Tukey, con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados obtenidos con los insectos que se probaron en dietas artificiales (Tabla 2) muestran que en las diferentes concentraciones la mortalidad de los insectos fue estadísticamente mayor cuando el IA quedó microcapsulado, lo cual puede sugerir un efecto de fagoestimulación y/o potenciación del agente activo, además de mostrar la estabilidad de la actividad durante el proceso de secado.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad del microcapsulado con diferentes dosis de IA⁺.

Dosis µg/ml*	Insectos lepidópteros probados ¹							
	<i>O. nubilalis</i>		<i>H. zea</i>		<i>S. exigua</i>		<i>T. ni</i>	
	<i>Bt</i>	Micro.	<i>Bt</i>	Micro.	<i>Bt</i>	Micro.	<i>Bt</i>	Micro.
0.5	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	14.0
1.0	N. D.	N. D.	2.6	N. D.	2.6	N. D.	2.6	44.0
5.0	52.0	99.0	5.0	44.0	8.0	40.0	20.0	90.6
10.0	76.0	100.0	10.0	73.3	10.0	42.6	50.0	100.0
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

⁺ IA = *Bt* cepa HD-1, 64,000 UI/mg. Lab. Abbott. Micro. = Microcapsulado.

N. D. = no determinado. ¹ Con *O. nubilalis*, cada dosis se inoculó a hojas de algodón; para los otros insectos, se adicionó directamente a dietas artificiales.

* Para *O. nubilalis* las dosis fueron de 5.0 y 10.0 mg/50 ml.

Ejemplo 4. Protección del IA a factores ambientales al quedar microcapsulado. Para conocer la estabilidad del material microcapsulado a factores adversos del ambiente, se valoró la capacidad de proteger al IA del efecto de los rayos solares y lavado por lluvia. Para evaluar la adherencia a hojas (resistencia a lavado por lluvia), las plantas de algodón inoculadas se colocaron dentro de una cámara de aspersión (Spray Booth, R & D Sprayers, Inc), hasta alcanzar 5 cm³ de agua acumulada. La estabilidad a rayos solares se evaluó al dejar las plantas durante ocho horas, colocándolas de forma que los sitios inoculados recibieran los rayos en forma directa, a una distancia de 20-30 cm bajo una lámpara que irradiaba todas las longitudes de onda solares (Suntest CPS, Heraeus DSET, Laboratories, Inc.). Posteriormente en todos los casos se realizaron bioensayos con *O. nubilalis*, con una dosis de 10 mg/50 ml, como se describió anteriormente. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente en la misma forma, y se encontraron diferencias de estabilidad a los rayos solares, mostrando mayor toxicidad los productos microencapsulados. En el tratamiento donde se simuló lluvia, la toxicidad bajó drásticamente en todos los casos (Fig. 1).

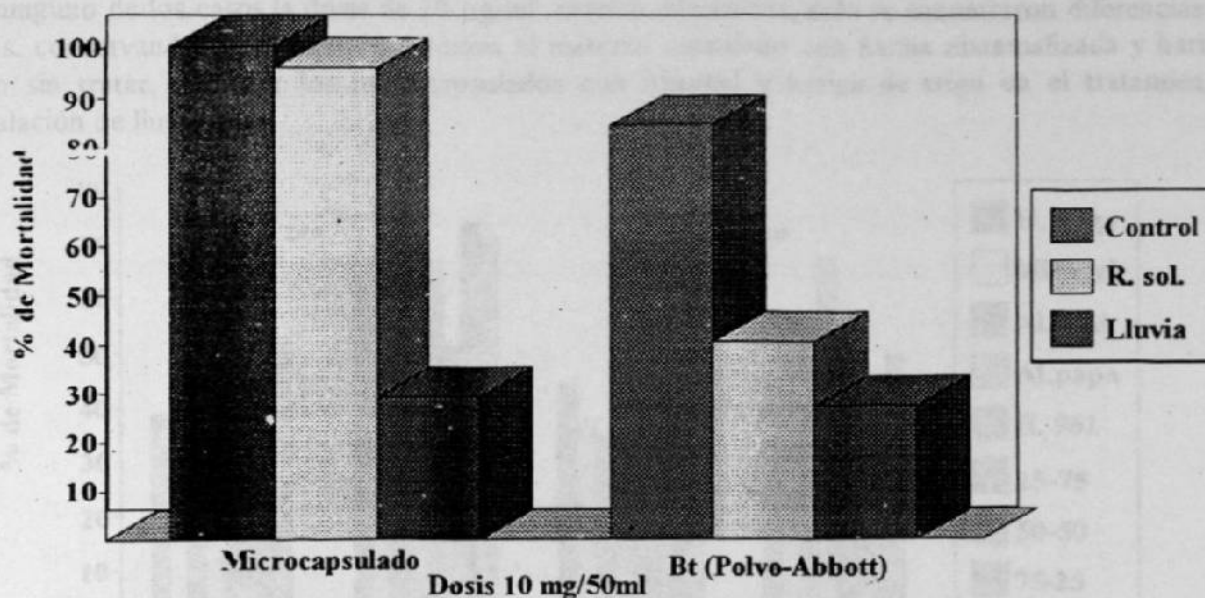


Fig. 1.- Protección del IA a factores ambientales al quedar microcapsulado

Ejemplo 5. Empleo de diferentes matrices para microcapsular. En sustitución de la harina nixtamalizada, se probaron como matriz los siguientes materiales: harina comercial 961 (Illinois Cereal Mills, Paris, Ill, USA.), harina de papa (amilopectina de papa Avebe, National Starch and Chemical Company, Wayne, N. J., USA), almidón oxidado (almidón modificado ácido Clinton 290-B), almidón de maíz pregelatinizado Miragel (Staley, Inc., Decatur, Ill., USA) y harina de trigo enriquecida. Por otro lado, se prepararon mezclas con relaciones variables de almidón-harina nixtamalizada, es decir, en lugar de emplear la relación 50-50 en gramos, se mezclaron como sigue: 100.0-0.0, 75.0-25.0, 25.0-75.0, 0.0-100.0, respectivamente. Las mezclas obtenidas al emplear almidón de papa, harina 961 y Miragel mostraron valores muy altos de viscosidad, por lo que primero se realizó la dilución de las muestras 1:1 ó 1:2 relación mezcla-agua. Posteriormente fue necesario licuar la mezcla para poder homogeneizarla y procesarla. Para realizar los análisis de actividad tóxica se descartaron la primera y la última, debido al comportamiento reológico y/o tamaño de partícula (Tabla 1). De los microcapsulados obtenidos se realizaron bioensayos con los cuatro insectos referidos, a una dosis de 10 mg/50 ml para el caso de las pruebas en plantas, o dos (5 y 10 µg/ml) si se empleaban dietas artificiales (Fig. 2). Además, para el caso del algodón se realizaron pruebas de estabilidad a rayos solares y resistencia al lavado por lluvia (adherencia), de la forma antes descrita, solo que en este último ensayo la cantidad de agua asperjable fue de 61 mm³. Para ambos casos se realizaron bioensayos y análisis estadísticos de la forma descrita. Los resultados de actividad tóxica mostrados en la Fig. 2 señalan que para *H. zea* y *S. exigua* existen diferencias entre los diferentes microcapsulados con la dosis de 5.0 µg/ml. Para *H. zea* los valores de toxicidad más bajos los mostraron los productos a base de almidón de papa, almidón oxidado y relación almidón-harina nixtamalizada 25-75. Las microcápsulas con más baja toxicidad hacia *S. exigua* fueron las elaboradas con trigo enriquecido, relación 50-50, Miragel y relación 25-75. Con *T. ni* (continuación de la Fig. 2) se encontraron diferencias con la dosis de 0.5 µg/ml, dando los valores más

rajos los productos a base de trigo enriquecido, almidón oxidado, harina 961, relación 50-50 y Miragel. En ninguno de los casos la dosis de 10 µg/ml mostró diferencias, solo se encontraron diferencias entre dosis, conservando mayor actividad tóxica el material capsulado con harina nixtamalizada y harina de trigo sin tratar, y menor los microcapsulados con Miragel y harina de trigo en el tratamiento de simulación de lluvia.

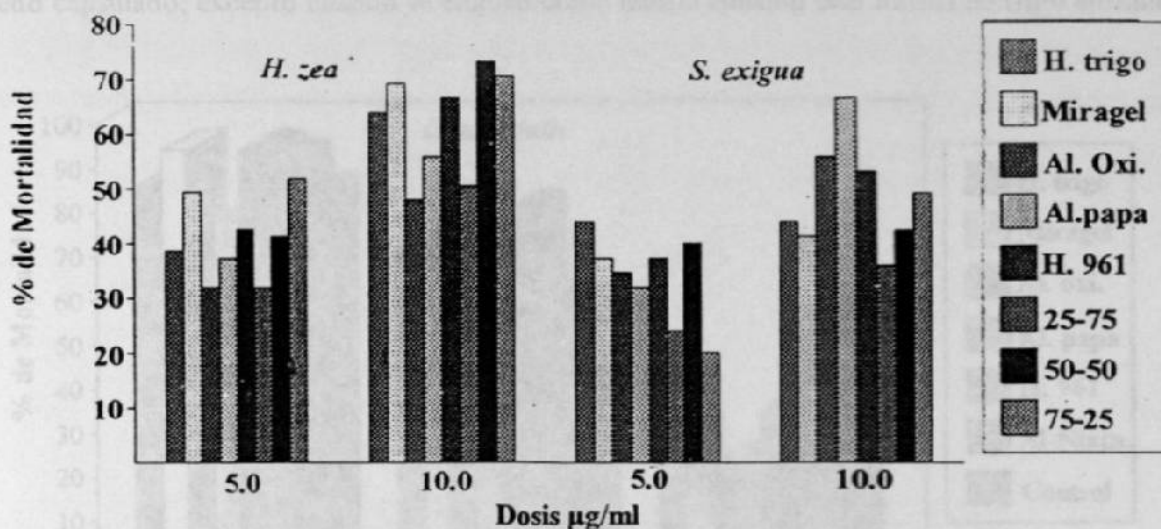


Fig. 2.- Actividad tóxica del microcapsulado procesado con diferentes materiales a insectos lepidópteros.

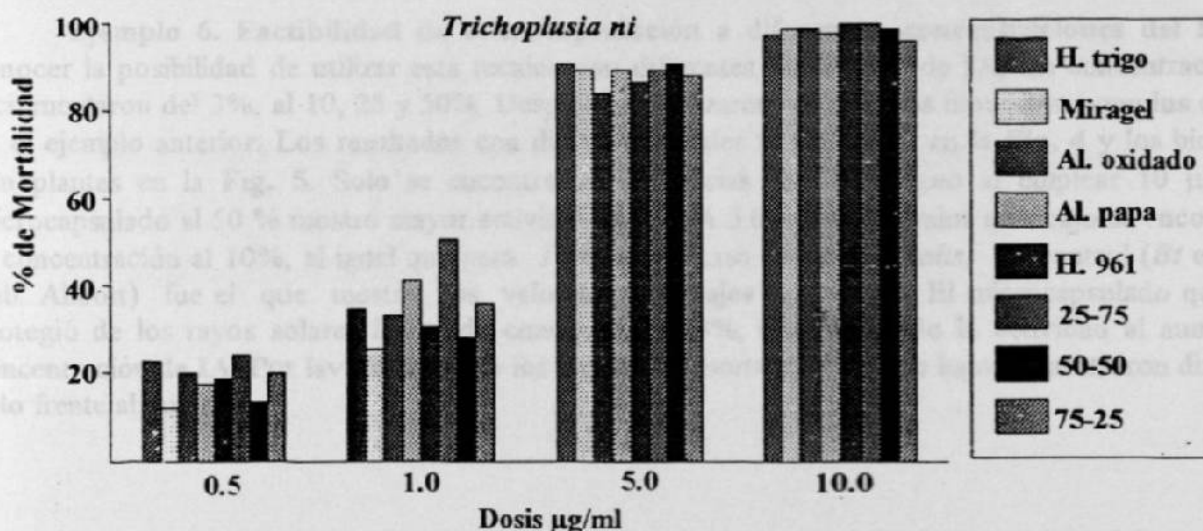


Fig. 2.- Actividad tóxica del microcapsulado procesado con diferentes materiales (cont.)

En el caso del gusano europeo (*O. nubilalis*) se encontraron diferencias entre tratamientos (sin tratar, expuesto a rayos solares o lavado por lluvia), como se puede observar en la Fig. 3. No se encontraron diferencias entre los diversos materiales sin tratarse. Cuando se sometieron a rayos solares,

el *Bt* en polvo (control) y el microcapsulado a base de almidón oxidado mostraron menor actividad tóxica. Por lavado de lluvia el producto que mostró mayor toxicidad fue el procesado con harina de maíz nixtalamizada.

Por otro lado, los microcapsulados obtenidos se observaron al microscopio empleando microscopía de barrido. De esta forma se observó que en todos los productos obtenidos el material quedó capsulado, excepto cuando se empleó como matriz almidón con harina de trigo enriquecida.

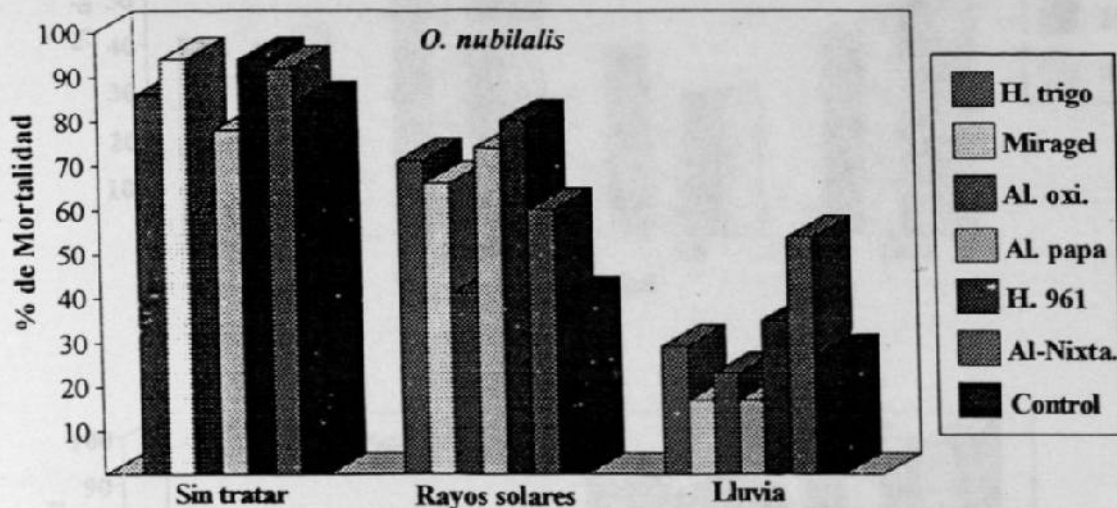


Fig. 3.- Toxicidad de capsulados procesados con diferentes materiales a gusano europeo

Ejemplo 6. Factibilidad de microcapsulación a diferentes concentraciones del IA. Para conocer la posibilidad de utilizar esta técnica con diferentes cantidades de IA, las concentraciones se incrementaron del 3%, al 10, 25 y 50%. Después se realizaron los mismos bioensayos que los descritos en el ejemplo anterior. Los resultados con dietas artificiales se muestran en la Fig. 4 y los bioensayos con plantas en la Fig. 5. Solo se encontraron diferencias con *S. exigua* al emplear 10 $\mu\text{g/ml}$. El microcapsulado al 50 % mostró mayor actividad tóxica. A 5.0 $\mu\text{g/ml}$, el valor más bajo se encontró con la concentración al 10%, al igual que para *T. ni*. En el caso de *O. nubilalis*, el control (*Bt* en polvo, Lab. Abbott) fue el que mostró los valores más bajos en general. El microcapsulado que mejor protegió de los rayos solares fue el de concentración 3%, disminuyendo la actividad al aumentar la concentración de IA. Por lavado de lluvia los valores de mortalidad fueron bajos y mostraron diferencias solo frente al control.

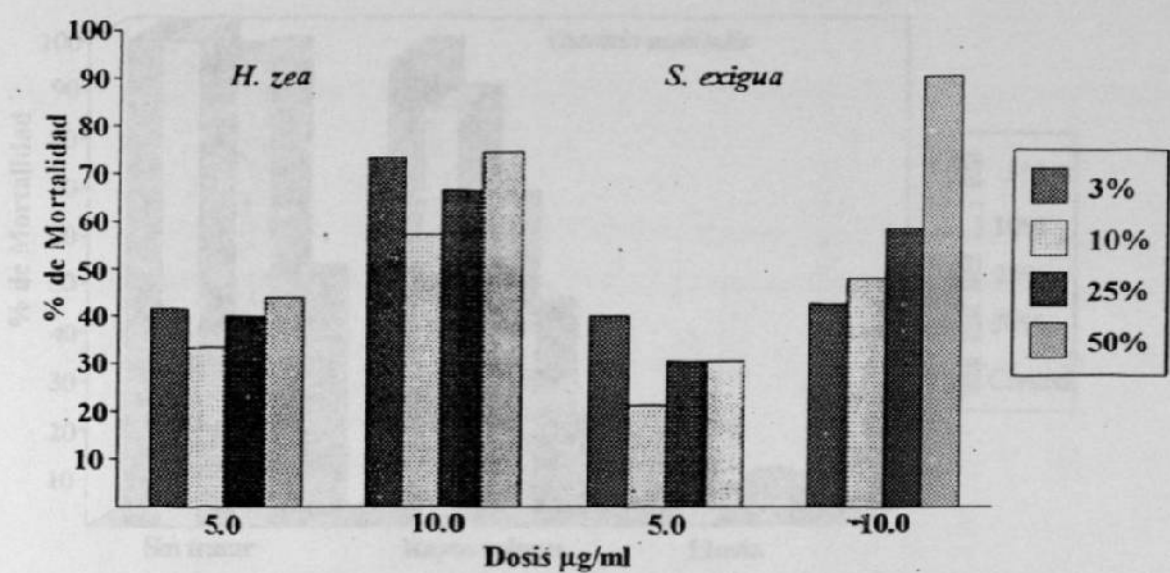


Fig. 3.- Actividad tóxica del microcapsulado a diferentes proporciones de IA

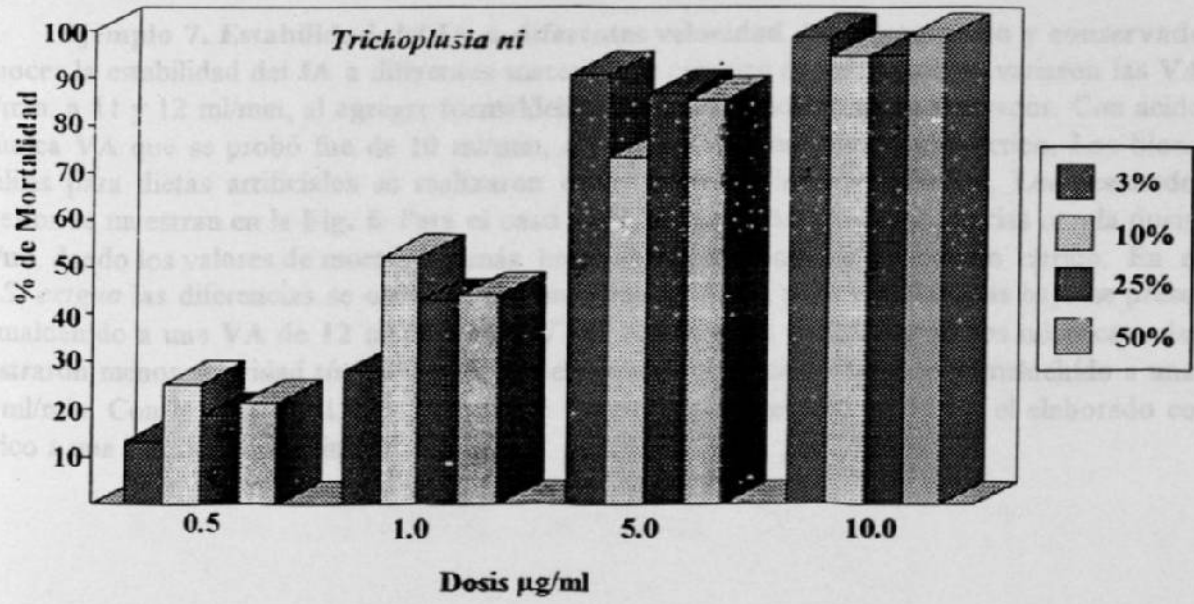


Fig. 4.- Actividad tóxica del microcapsulado a diferente proporción de IA

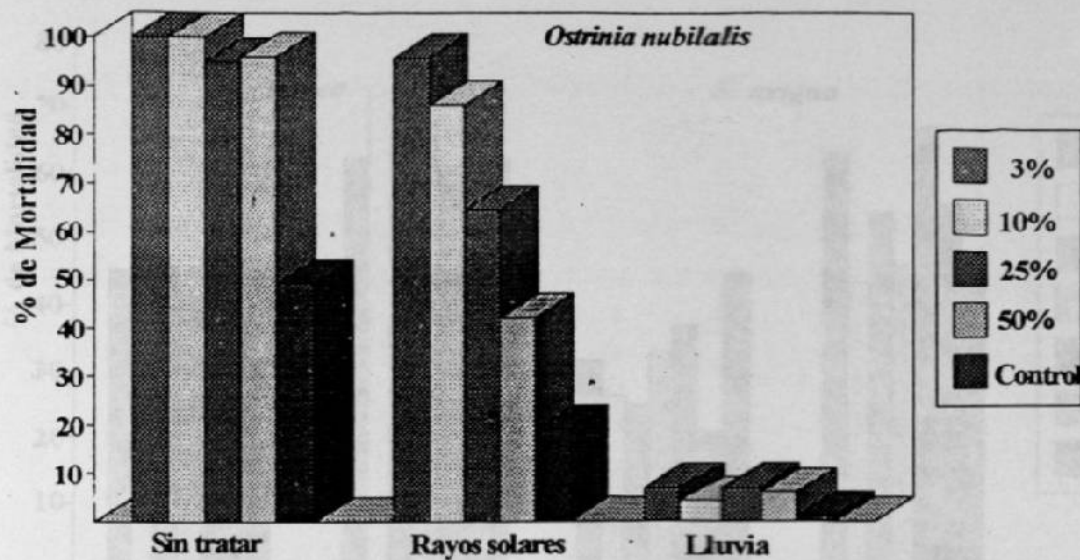


Fig. 5.- Actividad tóxica del microcapsulado a diferentes concentraciones de IA

Ejemplo 7. Estabilidad del IA a diferentes velocidad de alimentación y conservador. Para conocer la estabilidad del IA a diferentes materiales y cambios de velocidad, se variaron las VA: de 10 ml/min, a 11 y 12 ml/min, al agregar formaldehído o ácido láctico como conservador. Con ácido cítrico la única VA que se probó fue de 10 ml/min, al emplearlo en lugar de ácido láctico. Los bioensayos análisis para dietas artificiales se realizaron como se describió anteriormente. Los resultados de lo anterior se muestran en la Fig. 6. Para el caso de *H. zea* se encontraron diferencias con la dosis del 5.0 µg/ml, dando los valores de mortalidad más bajos el microcapsulado con ácido cítrico. En el caso de *S. exigua* las diferencias se observaron con la misma dosis, pero el valor más bajo se presentó con formaldehído a una VA de 12 ml/min. Para *T. ni*, con la dosis de 0.5 µg/ml, los microcapsulados que mostraron menor actividad tóxica fueron los elaborados con ácido cítrico y formaldehído a una VA de 10 ml/min. Con la dosis de 1.0 µg/ml, el que mostró los valores más bajos fue el elaborado con ácido cítrico a una VA de 10 ml/min.

Fig. 6.- Toxicidad del capsulado procesado a diferentes VA con los conservadores

Para el caso de bioensayos con *O. nubilalis* se usó el IA almacenado hace 10 años y otro de reciente adquisición. Se realizaron bioensayos para observar la diferencia al emplear diferentes conservadores y VA, tomando en cuenta la experiencia anterior. Los resultados del experimento se muestran en la Fig. 7. Con este ensayo se observó el efecto de preservación de IA al quedar microcapsulado, así como material elaborado con anterioridad, al que se le observó en el experimento de actividad tóxica del microcapsulado. Además, se observó que el ácido láctico conservó la actividad tóxica de mejor forma que el cítrico.

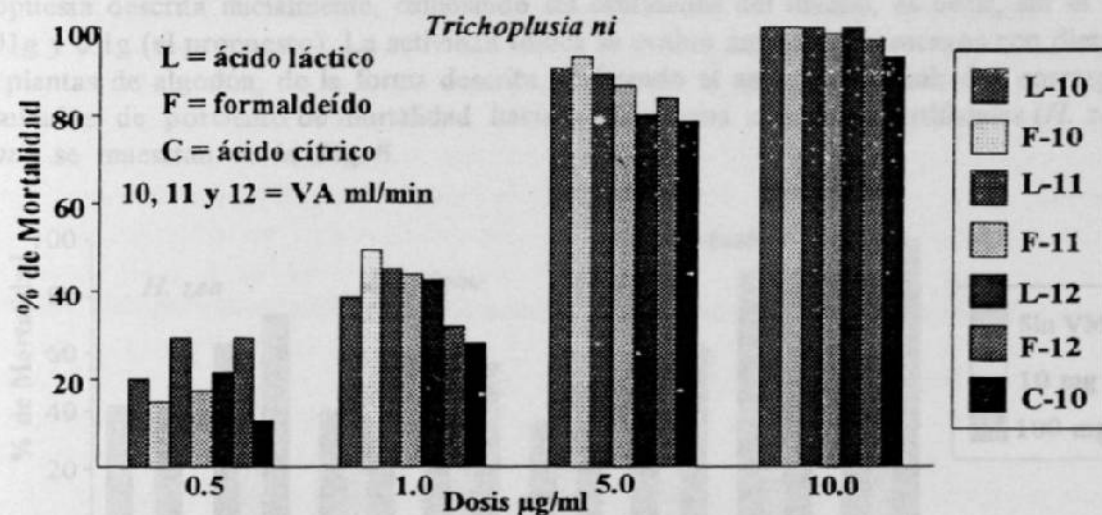
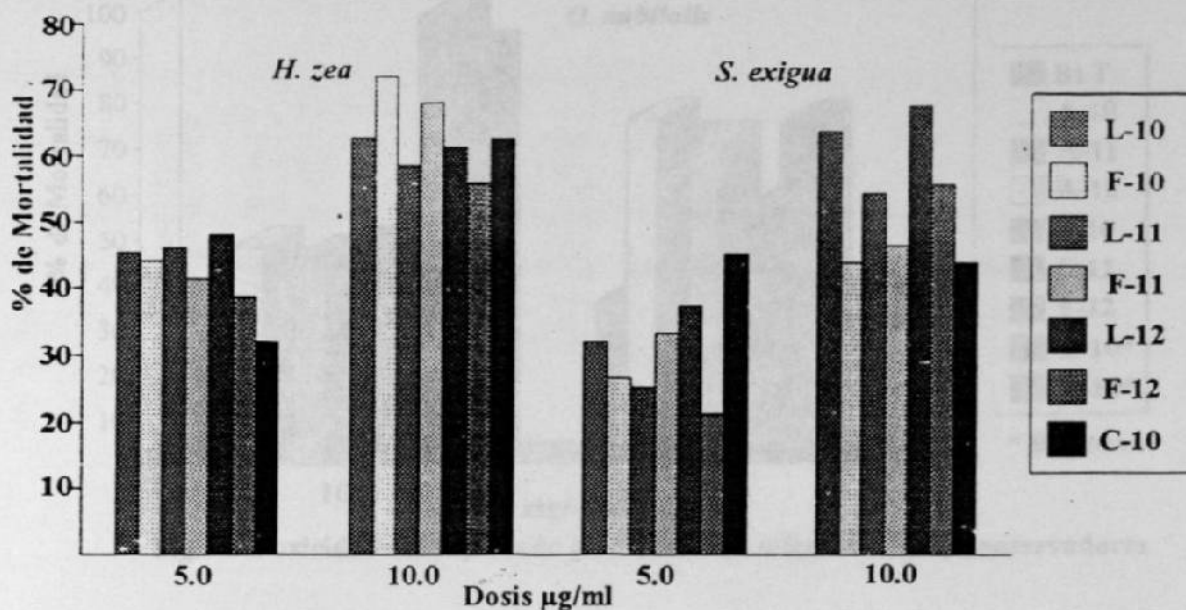


Fig. 6.- Toxicidad del capsulado procesado a diferentes VA, con varios conservadores

Para el caso de bioensayos con *O. nubilalis* se empleó el IA obtenido hace 10 años y otro de reciente adquisición. Se realizaron bioensayos para observar la diferencia al emplear diversos conservadores y VA, tomando en cuenta la consideración anterior. Los resultados del experimento se muestran en la Fig. 7. Con este ensayo se observó el efecto de potenciación de *Bt* al quedar microcapsulado, aun con material elaborado con anterioridad, al igual que se observó en el experimento de actividad tóxica del microcapsulado. Además, se observó que el ácido láctico conservó la actividad tóxica de mejor forma que el cítrico.

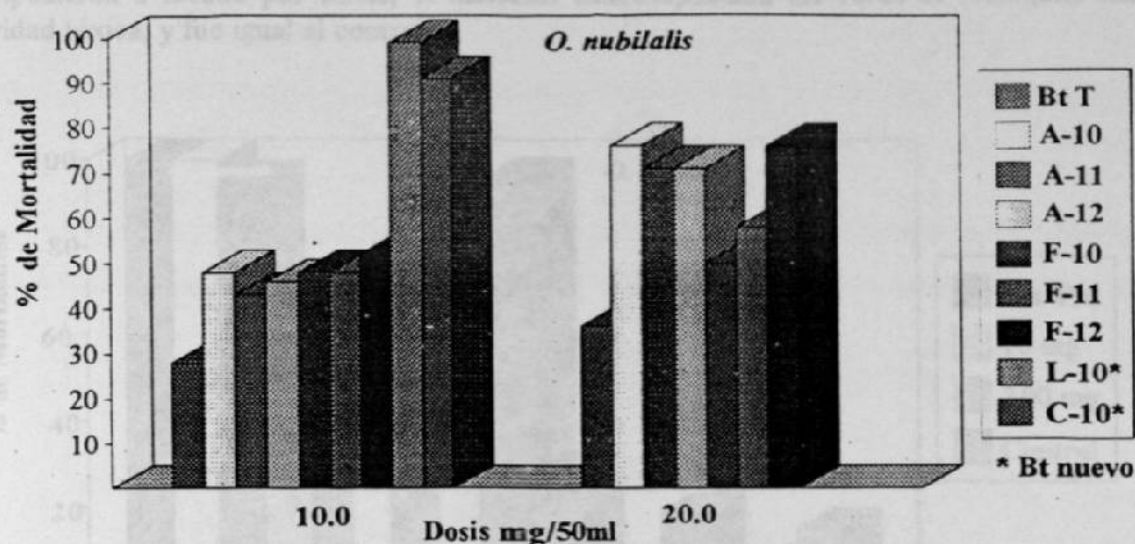


Fig. 7.- Toxicidad del capsulado procesado con diferentes VA y conservadores

Ejemplo 8. Protección del IA por verde de malaquita a los rayos solares. Para conocer el efecto del verde de malaquita en los microcapsulados, éstos se elaboraron de la misma forma que la propuesta descrita inicialmente, cambiando las cantidades del mismo, es decir, sin el colorante, con 0.01g y 0.1g (el propuesto). La actividad tóxica se evaluó mediante bioensayos con dietas artificiales y en plantas de algodón, de la forma descrita, realizando el análisis de resultados correspondiente. Los resultados de porcentaje de mortalidad hacia lepidópteros con dietas artificiales (*H. zea*, *S. exigua* y *T. ni*) se muestran en la Fig. 8.

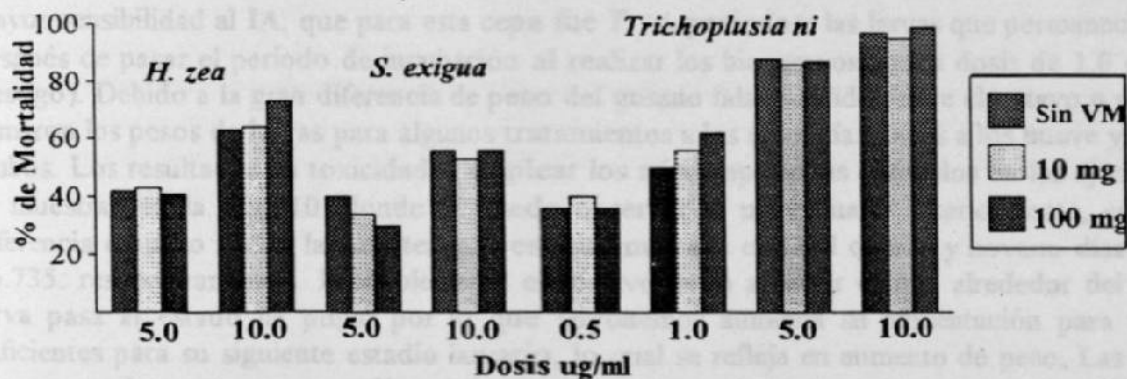


Fig. 8.- Toxicidad del capsulado a diferentes proporciones de IA

Para *O. nubilalis* los bioensayos se realizaron con plantas de algodón, las cuales se sometieron a cámaras simuladoras de rayos solares y lluvia. En el último tratamiento se asperjó agua hasta acumular 61 mm³, en lugar de 5 cm³. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 9, donde se puede observar que cuando las plantas no se trataron o se expusieron a rayos solares, el material microcapsulado mostró significativamente mayor toxicidad, tal y como se encontró en la **Tabla 2**. Cuando las plantas inoculadas

se expusieron a lavado por lluvia, el material microcapsulado sin verde de malaquita mostró mayor actividad tóxica, y fue igual al control.

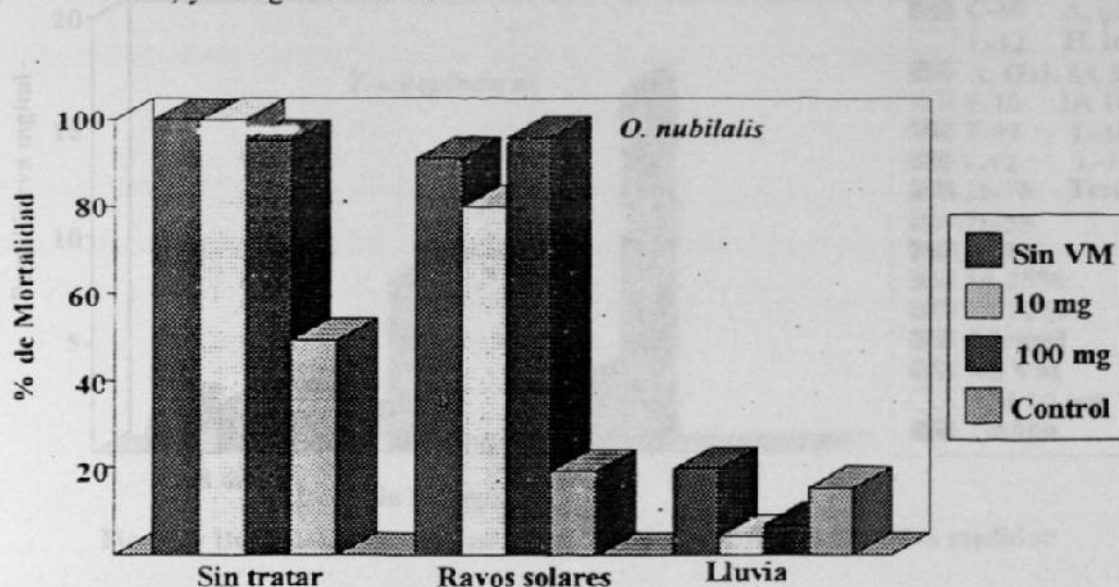


Fig. 9.- Protección del IA por verde de malaquita a factores ambientales

Ejemplo 9. Valoración de la dosis inhibitoria (DI). Como se mencionó anteriormente, en todos los casos en que se emplearon dietas artificiales se observó un efecto del ingrediente activo sobre los insectos. Las larvas crecían en forma anormal y continuaban en el mismo estadio larvario, es decir, permanecían como larvas, sin pasar a la fase de pupa, aparentemente al dejarse de alimentar de la forma adecuada, ya que el consumo de la dieta era menor al de los testigos. Algunos autores lo han descrito como dosis inhibitoria (DI), debido al efecto referido. Para evaluarlo se seleccionó el insecto que mostró mayor sensibilidad al IA, que para esta cepa fue *T. ni*, pesándose las larvas que permanecieron con vida después de pasar el período de incubación al realizar los bioensayos con la dosis de 1.0 µg/ml o sin *Bt* (testigo). Debido a la gran diferencia de peso del gusano falso medidor entre el octavo o noveno días, se tomaron los pesos de larvas para algunos tratamientos a los ocho días, otros a los nueve y los testigos en ambos. Los resultados de toxicidad al emplear los microcapsulados obtenidos en los ejemplos descritos se muestran en la Fig. 10, donde se puede observar lo mencionado anteriormente, es decir, que la diferencia en peso de las larvas (testigo) es muy marcada entre el octavo y noveno días (8.175 contra 16.735, respectivamente). Probablemente el motivo de lo anterior es que alrededor del décimo día la larva pasa al estado de pupa, por lo que suponemos aumenta su alimentación para tener reservas suficientes para su siguiente estadio larvario, lo cual se refleja en aumento de peso. Las diferencias de peso entre el octavo y noveno días no fueron para el caso de las larvas que mostraban efecto inhibitorio. Las larvas que se dejaron ocho días tenían menor peso al alimentarse con dietas a las que se adicionaron microcápsulas elaboradas con almidón oxidado, formaldehído a 10ml/min, relación 25-75, harina 961, Miragel y sin verde de malaquita, o con 0.1 g del colorante. A los nueve días el mayor efecto inhibitorio se observó con los microcapsulados con IA al 3% y ácido láctico a 10 ml/min.

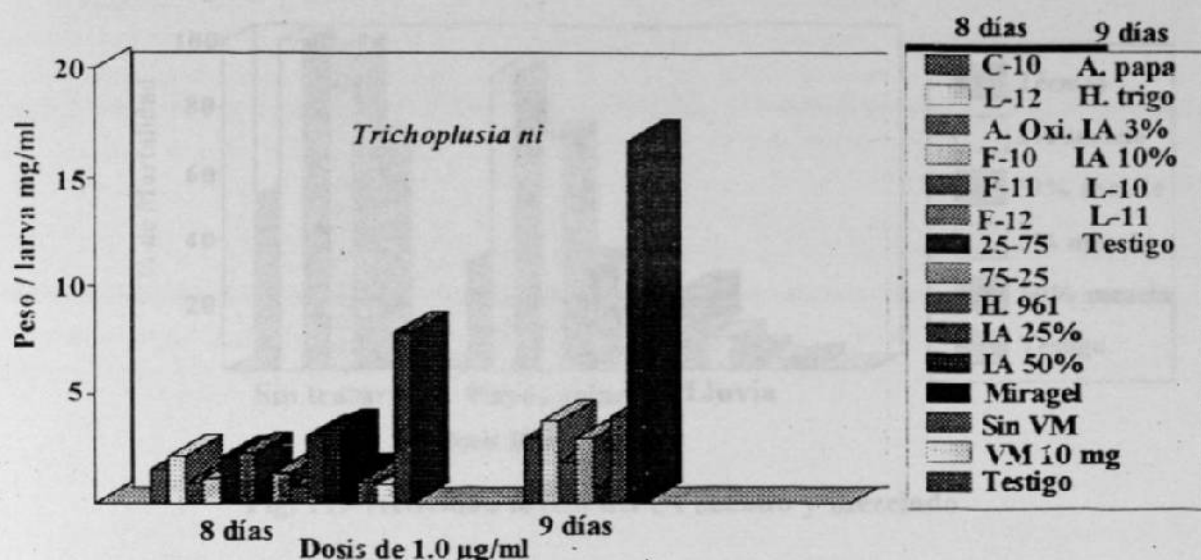


Fig. 10.- Dosis inhibitoria de microcapsulados contra gusano falso medidor

Ejemplo 10. Estabilidad del IA al microcapsularse. Para saber hasta qué punto las microcápsulas se forman gracias al proceso de secado por aspersion y no en forma natural, y valorar la necesidad de microcapsular el material, se realizaron bioensayos empleando solo plantas de algodón inoculadas con la mezcla, antes y después del proceso de secado. Se evaluó la actividad tóxica de ambos a *O. mubilalis* sin tratar, exponiéndolos a rayos solares por ocho horas y bajo un simulador de lluvia, hasta acumular 61 mm de agua. Los resultados se muestran en la Fig. 11, y en ellos se puede observar que las formulaciones obtenidas del secado por aspersion con una proporción de IA del 3% dieron los resultados significativamente más altos después de exponerlos a los rayos solares y los segundos más altos en el tratamiento de lavado por lluvia. La mezcla similar (sin someterlo al proceso de secado) dio el segundo valor más alto de mortalidad, pero se perdió en el tratamiento con lluvia. Con el formulado a una proporción del 50% de IA, el material secado por aspersion es significativamente más tóxico al insecto que su similar sin procesar, sin someterlo a ningún tratamiento, pero son significativamente igual de estables a los rayos solares (Fig. 3).

Miragel	1.74	Ac. láctico 11 ml/min	4.99
Almidón oxidado	2.07	Ac. láctico 13 ml/min	5.11
Almidón de papa	2.44	Formaldehído 10 ml/min	3.85
Harina 961	2.14	Formaldehído 11 ml/min	5.01
Sin verde de malaquita	2.64	Formaldehído 12 ml/min	5.74
Verde de malaquita 0.01g	5.06	IA = 3%	2.42
Relación 25-75	3.09	IA = 10%	2.36
Relación 75-25	2.20	IA = 25%	3.43
Ac. láctico 10 ml/min	2.01	IA = 50%	4.26

* Analizador de humedad Mark 2

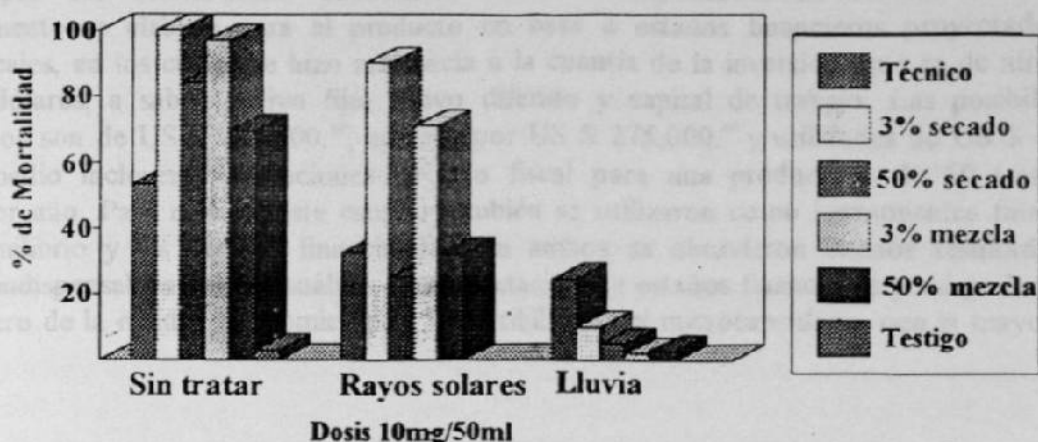


Fig. 11.- Actividad tóxica del IA secado y mezclado

Ejemplo 11. Viabilidad de almacenamiento para su comercialización. Para tener una idea de la vida de anaquel del producto, a los microcapsulados obtenidos se les midió el porcentaje de humedad empleando un analizador de humedad Mark 2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. En estos resultados se puede notar que existen diferencias en el contenido de agua retenida en los diversos materiales, dando los valores más bajos el Miragel, almidón oxidado, Harina 961 y relación 75-25; y los más altos los elaborados con menor cantidad de protector solar al propuesto (verde de malaquita 0.01), mayor concentración de IA (50%) y los elaborados con diferentes conservadores a diversas VA.

Tabla 3. Porcentaje de humedad de microcápsulas elaboradas con diferentes materiales.*

Ingredientes	% de Humedad	Ingredientes	% de Humedad
Harina de Trigo	3.20	Ac. láctico 10 ml/min	4.99
Miragel	1.74	Ac. láctico 11 ml/min	4.99
Almidón oxidado	2.07	Ac. láctico 12 ml/min	5.11
Almidón de papa	2.44	Formaldehído 10 ml/min	4.85
Harina 961	2.14	Formaldehído 11 ml/min	5.01
Sin verde de malaquita	2.64	Formaldehído 12 ml/min	5.24
Verde de malaquita 0.01g	5.08	IA = 3%	2.42
Relación 25-75	3.09	IA = 10%	2.86
Relación 75-25	2.20	IA = 25%	3.41
Ac. cítrico 10 ml/min	2.01	IA = 50%	4.26

* Analizador de humedad Mark 2

Ejemplo 12. Factibilidad económica del microcapsulado. El estudio de factibilidad fundamentalmente se elaboró para el producto en base a estados financieros proyectados a diez ejercicios fiscales, en los cuales se hizo referencia a la cuantía de la inversión, que es de alrededor de 275,000.00 dólares, a saber: activo fijo, activo diferido y capital de trabajo. Las posibilidades de ingresos brutos son de US \$ 437,500.⁰⁰, egresos por US \$ 275,000.⁰⁰ y utilidades de US \$ 162,500.⁰⁰ dólares promedio incluyendo situaciones de tipo fiscal para una producción de 50 toneladas de formulado por año. Para realizar este estudio también se utilizaron como herramientas financieras el punto de equilibrio y las razones financieras. Con ambos se obtuvieron buenos resultados en los indicadores, indispensables para el análisis e interpretación de estados financieros y así poder definir el perfil financiero de la entidad económica para la factibilidad del microcapsulado, con la mayor claridad posible.

REIVINDICACIONES

El invento descrito se considera como una novedad, por lo tanto, reclamamos como propiedad lo contenido en las siguientes cláusulas:

- 1.- Un proceso de preparación de una formulación de pesticidas factible de aplicar por aspersión, incorporando los siguientes ingredientes: almidón modificado de harina nixtamalizada de maíz, almidón de maíz, alcohol, agentes conservadores, ingrediente activo, un azucar, aceite vegetal, agua y el secado de dichos ingredientes mediante el proceso de secado por aspersión, a una temperatura y flujo de aire apropiados.
- 2.- El proceso de acuerdo al reclamo 1 puede contener como ingrediente activo a un pesticida, un insecticida, un herbicida, un nematocida, un fungicida o una mezcla de ellos.
- 3.- El ingrediente activo empleado en el proceso descrito en el reclamo 1 es la bacteria de *Bacillus thuringiensis*, así como sus toxinas producidas.
- 4.- La matriz empleada de acuerdo al reclamo 1 es el almidón modificado o harina de maíz, y su actividad es comparable a las de harina nixtamalizada, harina 961, almidón de papa, almidón de maíz oxidado, almidón pregelatinizado, o una combinación de ellos.
- 5.- El proceso de acuerdo al reclamo 1 incluye al alcohol isopropílico como alcohol.
- 6.- El conservador referido en el reclamo 1 puede ser formaldehído, ácido láctico, ácido cítrico, o una combinación de los mismos.
- 7.- Según el proceso del reclamo 1 se puede variar la relación de almidón o de harina nixtamalizada de maíz; de 50-50 a 25-75 ó 75-25 respectivamente.
- 8.- El proceso de acuerdo al reclamo 1 contiene una proporción de ingrediente activo comparado a la cantidad necesaria para controlar una plaga en campo.
- 9.- En el proceso descrito en el reclamo 1 se puede variar la cantidad de ingrediente activo de *Bacillus thuringiensis* a un rango del 3% hasta un 50% peso/peso en relación a los otros ingredientes utilizados en la formulación final.
- 10.- El aceite vegetal empleado en el proceso referido en el reclamo 1 es aceite de maíz.
- 11.- Una formulación incorporando los siguiente ingredientes: harina o almidón modificado, almidón de maíz, alcohol, agentes conservadores, ingrediente activo, un azucar, aceite vegetal y agua.

12.- La formulación de acuerdo al reclamo 11 puede contener como ingrediente activo a un pesticida, un insecticida, un herbicida, un fungicida o una mezcla de ellos.

13.- El ingrediente activo empleado en la formulación descrita en el reclamo 11 es *Bacillus thuringiensis*, así como sus toxinas producidas.

14.- La matriz empleada en la formulación de acuerdo al reclamo 11 es el almidón modificado o harina de maíz, y su actividad es comparable a las de harina nixtamalizada, harina 961, almidón de papa, almidón de maíz oxidado, almidón pregelatinizado, o una combinación de ellos.

15.- La formulación de acuerdo al reclamo 11 incluye al alcohol isopropílico como alcohol.

16.- El conservador referido en el reclamo 11 puede ser formaldehído, ácido láctico, ácido cítrico, o una combinación de los mismos.

17.- Según la formulación del reclamo 11 se puede variar la relación de almidón o de harina nixtamalizada de maíz; de 50-50 a 25-75 ó 75-25 respectivamente.

18.- La formulación de acuerdo al reclamo 11 contiene una proporción de ingrediente activo comparado a la cantidad necesaria para controlar una plaga en campo.

19.- En la formulación descrita en el reclamo 11 se puede variar la cantidad de *Bacillus thuringiensis* a un rango del 3% hasta un 50% peso/peso de los otros ingredientes incluidos en la formulación final.

20.- El aceite vegetal empleado en formulación referida en el reclamo 1 es aceite de maíz.

21.- Una formulación de acuerdo al reclamo 11 queda protegida al ingrediente activo de una inactivación por radiación.

RESUMEN

En la presente invención se propone un proceso para microcapsulación mediante la técnica de secado por aspersión para la elaboración de formulaciones microcapsuladas de pesticidas a base de harina nixtamalizada y almidón de maíz en iguales proporciones, donde el Ingrediente Activo (IA) queda dentro de una cápsula cuyo tamaño de partícula permite su aplicación por aspersión de forma convencional, para protección de cultivos al ataque de plagas de insectos a nivel de campo. Además de los ingredientes usados como matriz, la microcápsula contiene otros elementos que sirven como adherente, fagoestimulante o protector de rayos solares, los cuales en su conjunto ayudan a estabilizar al pesticida y prolongar la residualidad del mismo. El biopesticida elegido para probar la técnica y el proceso de microcapsulación fue la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*, con la cual se realizaron bioensayos de laboratorio con cuatro insectos lepidópteros de importancia agrícola: *Helicoverpa zea* (gusano de la bellota), *Ostrinia nubilalis* (gusano europeo del maíz), *Spodoptera exigua* (gusano soldado) y *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor). Para demostrar que los materiales y la tecnología propuestos son los más idóneos, se realizaron mediciones reológicas de las mezclas antes del proceso de secado. Posteriormente se elaboraron formulaciones microcapsuladas empleando diversos tipos de almidón y harina de trigo; se variaron las proporciones del ingrediente activo capsulado; se evaluaron diferentes conservadores y se adicionó el protector solar a diferente concentración o se omitió su empleo. Así también se comparó la actividad tóxica de la mezcla antes y después del proceso de secado, y se evaluaron diferentes velocidades de alimentación de la solución. También se comparó el microcapsulado frente a materiales inorgánicos con los cuales se formulan los pesticidas en forma tradicional. Finalmente se midió el porcentaje de humedad para tener una idea de la vida de anaquel del producto y se realizó un estudio de factibilidad económica del mismo, al compararlo con productos comerciales similares presentes en el mercado actual de pesticidas. Los resultados obtenidos en las pruebas anteriores muestran que la tecnología propuesta tiene un gran potencial debido a lo siguiente: i) es posible capsular material biológico o químico, ii) una dosis de IA del 3% aumenta la actividad tóxica y confiere estabilidad a factores ambientales, iii) se puede variar la proporción del IA hasta al 50% sin perder actividad, iv) los materiales empleados para su elaboración son estables y seguros, v) el costo del producto es 35% menor al que se encuentra en el mercado actualmente, vi) es factible desarrollar y comercializar esta tecnología en forma cosmopolita.

REFERENCIAS

- Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.* 17: 120-126
- Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1989. Response to starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing ultraviolet screens to sunlight. *Environ. Entomol.* 18: 1035-1041.
- Liu, Y. T., M. J. Siu, D. D. Ji, L. H. Wu, C. C. Chou y C. C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invert. Pathol.* 62: 131-136.
- Bartelet, R. J., M. R. McGuire, y D. A. Black. 1990. Feeding stimulants for the european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* 19: 182-189.
- McGuire, M. R. y B. S. Shasha. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econom. Entomol.* 83: 1813-1817.
- McGuire, M. R., B. S. Shasha, L.C. Lewis, R. J. Bartelet y K. Kinney. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econom. Entomol.* 83: 2207-2210.
- Rao, M. A. 1992. Review. The structural approach to rheology of plant food dispersions. *Rev. Esp. Cienc. Technol. Aliment.* 32: 3-17.
- Shahidi, F. y X. Han. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 33: 501-547.
- Sparks, R. E. 1981. Microencapsulation. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemistry and Technology. Vol. 15. 3ed. Ed., Grayson, M. y David, E., Eds., John Wiley & Sons. New York, N. Y. pp 470.
- Taylor, A. H. 1985. Encapsulation system and their applications in the flavor industry. *Food Flav. Ingrid. Packg. Proc.* 5: 48-49, 51-52.
- Youngs, R. A. 1986. Spray drying encapsulation-today's review. *Food Flav. Ingrid. Packg. Proc.* 8: 31.

DISCUSION

El uso potencial de cepas de Bt con alta actividad insecticida ha conducido a numerosas investigaciones, entre las que destacan por su importancia, las evaluaciones a nivel de campo para el control de plagas en cultivos. De hecho, la comprobación de los resultados obtenidos en laboratorio e invernadero se lleva a cabo en experimentos de campo.

Al igual que sucede con los insecticidas químicos, el registro de un pesticida biológico indica la posibilidad de un amplio uso comercial. Para realizar dicho registro es esencial la caracterización de cepas de Bt. Por este motivo consideramos importante valorar de la forma propuesta por la EPA a cepas de Bt, tanto mexicanas como HD, que mostraban alta actividad tóxica contra insectos lepidópteros, o eran activas frente a coleópteros (Galán-Wong, 1993; Lugo-Barrera, 1995). Los resultados obtenidos mostraron que las cepas aisladas en México son comparablemente tóxicas a las HD (LD_{50} - μ g/ml- de 30.8 y 35.5 para GM-7 y GM-10 contra 31.7, 31.0 y 3.5 de la HD-187, HD-193 y HD-263 para *H. virescens*; 73.7 y 44.4 contra 39.8, 92.8 y 18.8 para *S. exigua*; 22.2 y 18.5 contra 25.7, 17.4 y 5.6 para *T. ni*, respectivamente). Además, se observó que muestran diferente grado de actividad entre las diferentes serovariedades, cepas e insecto evaluado, como se ha reportado anteriormente (Percy y Fast, 1983). A éste respecto, la cepa C-4 mostró los valores de toxicidad más bajos comparada a GM-7 y GM-10 (LD_{50} - μ g/ml- de 241 contra 30.8 y 35.4 para *H. virescens*; 66.3 contra 73.3 y 44.4 contra *S. exigua*; 29.3 contra 22.2 y 18.5 con *T. ni*, respectivamente). Las cepas GM-7 y GM-10 mostraron susceptibilidad al ataque por los fagos PC-51 y R-41, lo cual puede ser un factor indeseable en campo (Debabov et al, 1984), aunque es de mayor importancia el que las cepas se encuentren libres de fagos (Barack et al, 1988). De hecho, la EPA omite este requisito (US.-EPA, 1988). El peso molecular de las PCI para las serovariedades con toxicidad a lepidópteros corresponden al reportado para estas serovariedades (ca. 120-130 KDa) y reaccionan con antiCryIAb. Las cepas C-9 y HD-193, además poseen una proteína de ca. 120 y 70 KDa respectivamente, las cuales reaccionaron con AntiCryIAc. Ninguna cepa reaccionó con los antiCryIII probados (A y C). Además encontramos que las cepas que mostraron actividad tóxica a coleópteros son capaces de producir un daño similar al reportado para las cepas productoras de la β -exotoxina

en hembras de ratones Balb/C. De seis ratones probados por lote, a los cuales se les inyectaron alrededor de un millón de esporas subcutáneamente, con la cepa C-9 causó úlceras abiertas de entre 0.7 a 1.3 cm en cuatro de ellos; la cepa C-4 sólo provocó la formación de úlceras del mismo tipo en dos de los ratones, de 0.5 y 0.7 cm; y el control positivo, cepa HD-41 mostró úlceras de entre 0.4 y 0.8 cm en dos de los ratones. Cabe aclarar que se aisló Bt de las lesiones observadas en los ratones inyectados con esporas de las cepas C-9 y HD-41 solamente. Por los resultados descritos, sólo las cepas GM-7 y GM-10 pueden ser empleadas en forma segura a nivel de campo (Betz *et al*, 1990). Esta parte de la discusión se basa en los resultados mostrados en el Artículo I, descrito previamente (pág. 27).

Para la elaboración de formulados a base de maíz nixtamalizado, el ingrediente activo se elaboró por fermentación, desarrollando el cultivo en un medio de cultivo y bajo las condiciones que habían demostrado ser las óptimas para Bt (Galán-Wong, 1993). Por otra parte, el objetivo de emplear formulados granulares era aumentar la estabilidad así como la persistencia de las cepas en campo para un control efectivo de lepidópteros plaga del maíz. La posibilidad de emplear formulados a base de harina nixtamalizada como matriz para formulados granulares ya se había evaluado, así como el empleo de verde de malaquita como fotoprotector dentro del mismo formulado (Castro-Franco, 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo (Artículo II del presente escrito, pág. 43), mostraron que la actividad tóxica de las cepas en los granulados se conservó, lo cual se demostró mediante bioensayos por incorporación de los formulados en dietas artificiales (mortalidad del 100% con dosis de 50 mg/ml con las cepas GM-7, GM-10, HD-193 y HD-263; aún en formulados que tenían dos años de elaborados). Así mismo, cepas aisladas en México, con respecto al rendimiento en grano (Kg/ha), mostraron un control similar al químico (7,948.8 y 8,825.5, GM-10 al 2 y 4% respectivamente contra 8,616.7, con carbaril) y superó al biológico Dipel[®] (5,628.6) y al control negativo (4,906.4). El formulado con la cepa HD-263 fue el más eficiente en los dos periodos (8,972.2 al 4% en 1994 y 6,344.6 al 3% en 1995), y fue comparable al de la cepa GM-10 (5,583.3 al 3% en 1995), este último con dos años de elaborado. Reportes de investigaciones a nivel de campo probando formulaciones granulares indican resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo, es decir, que se requiere menos de la mitad de la cantidad de ingrediente activo dentro del formulado para tener un control similar de la plaga; el insecticida biológico empleado (Dipel[®]) contiene un 7% del complejo esporas-cristales,

y en este trabajo se emplearon concentraciones del 2, 3 y 4% con resultados comparables o mejores a los observados con el biológico (C-4, 5413.7; GM-7, 5576.3; GM-10, 7948.8; HD-187, 6636.5; HD-193, 7190.7; HD-263, 6115.5, Dipel[®], 5628.6; control, 4906.4 Kg/ha, respectivamente) (Dunkle y Shasha, 1989; McGuire et al, 1990). Los análisis de contenido de humedad revelaron que después de elaborados, los gránulos pierden humedad en el ambiente (Castro-Franco, 1994). Se encontró que después de tres años de elaborados, el contenido de humedad del formulado era de 3.4 %. Este resultado indica una buena vida de anaquel, pues se ubica muy por debajo del 10% sugerido para la conservación de productos (Shahidi y Han, 1993). Lo anterior muestra que los formulados granulares a base de harina nixtamalizada son capaces de controlar plagas de lepidópteros en cultivos de maíz en forma similar a los insecticidas químicos y se requiere de la mitad del ingrediente activo para tener un control similar al bioinsecticida comercial y es posible la comercialización del producto propuesto al comprobar una vida de anaquel mínima de dos años.

La introducción de Bt al campo con el empleo de formulaciones granulares es una buena alternativa para aumentar su persistencia, pero la desventaja de los mismos es que sólo se pueden aplicar en cultivos donde el gránulo pueda quedar retenido. Por este motivo se ha desarrollado la tecnología para elaborar formulaciones asperjables (McGuire y Shasha, 1992). Desde su descubrimiento, la caseína (Behle et al, 1996a) y el gluten (Behle et al, 1996b) han demostrado ser efectivos en pequeñas cantidades de material para resistir el lavado por lluvia. Por otra parte, estos materiales proveen estabilidad solar al Bt presente en los depósitos foliares. Sin embargo, la desventaja que ofrecen es que se necesita cierta cantidad de sólidos por volumen de aspersión, la cual varía según los requerimientos del usuario final. Por ejemplo, un agricultor que aplica un kilo de material para protección del cultivo contra el ataque de la plaga, necesitará un volumen aproximado de 100 l/ha, o bien, cuatro Kg para aplicar 400 l/ha, según la plaga a controlar. Debido a estas características, la comercialización de formulados asperjables se ha desarrollado en forma limitada. La formulación propuesta desarrollada mediante la técnica de secado por aspersión (Patente presentada en ésta tesis, pág. 129), no requiere modificar las cantidades de sólidos. Este tipo de formulado demostró proveer de una adecuada protección cuando se adicionan cantidades relativamente bajas de Bt (3-10%) en la formulación (porcentaje de mortalidad de 95.8 al 3% y 86.0 al 10%, contra 100.0 del formulado microcapsulado sin someterse a luz UV, 49.3 al Bt en polvo sin exponerse al sol y 19.2

del control bajo rayos solares). El incremento de la concentración de Bt en este tipo de formulados es un factor importante debido a los costos asociados con los cuales podrían hacer inadecuado el uso a escala de estos productos. Aunque los costos de los ingredientes son relativamente bajos (alrededor de US \$ 0.50/Kg de la harina), aplicando 500 g de Bt por Ha. en un formulado al 3% podría requerir 16.6 Kg del producto. La formulación al 50% requeriría sólo dos Kg/Ha y es una formulación comercial más representativa, y ofrece protección a rayos solares (porcentaje de mortalidad de 96.0 del formulado y 64.4 del mismo pero expuesto a rayos solares). Nosotros observamos que este formulado era lavado por lluvia, y consideramos que es necesario buscar otro tipo de material que se adhiera a la hoja y permanezca con mayor eficiencia. En resumen, la formulación presentada en esta parte del trabajo provee un mecanismo donde los ingredientes actúan como matriz del microcapsulado y protegen al ingrediente activo. Estos ingredientes son económicos, disponibles en el mercado y la técnica es fáciles de usar. De igual forma el equipo y proceso de secado por aspersion es bien conocido y generalmente se encuentra disponible en laboratorios de biotecnología e industria. La formulación puede mezclarse en un tanque convencional de aspersion y aplicarse al cultivo directamente sobre las hojas y provee un alto nivel de estabilidad y protección solar a Bt.

La última parte del trabajo consistió en evaluar los microcapsulados descritos previamente, en el cultivo de frijol. A este respecto, la toxicidad de Bt sobre coleópteros se conoció inicialmente con la serovariedad *tenebrionis* (Krieg *et al*, 1984). Los reportes de toxicidad de Bt contra el coleóptero plaga *E. varivestis* (conchuela del frijol), indican una baja toxicidad para esta serovariedad, y toxicidad de la misma a la β -exotoxina (Keeler y Langenbruch, 1993). En este trabajo (Artículo IV, pág. 91), nosotros probamos cepas aisladas de larvas muertas del insecto mencionado, que habian demostrado su toxicidad mediante bioensayos en plantas de frijol, en experimentos a nivel de campo. mediante los mismos se pudo observar la disminución en el número de larvas presentes, tanto en infestaciones naturales como artificiales del insecto plaga. Asimismo observamos lo mismo que con las pruebas de los microcapsulados con la cepa HD-1, que el formulado es lavado por lluvia. Se realizaron dos experimentos de campo en dos regiones y dos períodos diferentes, precisamente donde la plaga se establece y se presentan las mayores pérdidas como resultado del ataque del mismo, el rendimiento del grano fue igual para las diferentes tratamientos. Las causas probables al resultado anterior pueden ser varias. Por mencionar, el experimento realizado en el primer período (1994) se estableció en

Vicente Gro., Dgo.. En este caso, el cultivo se observó libre de la plaga, sugiriendo un control adecuado del mismo; pero otra plaga (*Esigmene acrea*) dañó el cultivo en la fase final del mismo. En 1995 el experimento se estableció en la región semiárida ubicada en Bermejillo, Dgo.. Las aplicaciones se realizaron después de observar la emergencia de la plaga. Posteriormente no se detectó la presencia de la misma o daño en el cultivo ocasionado por ella. Posiblemente este hecho se puede relacionar con una observación hecha durante los bioensayos. Se observó que en el sitio (sobre la hoja), donde quedaba el microcapsulado, el insecto no se alimentaba. Este tipo de insecto es social, y el ataque al cultivo se realiza en sitios localizados (Bernhardt y Shepard, 1978). Es probable que la plaga, al evitar alimentarse de las plantas con el microcapsulado, haya emigrado a otro cultivo. Esta posibilidad explicaría el porque los valores de rendimiento fueron significativamente iguales aún en el tratamiento donde se aplicó el insecticida químico. Por otro lado, y como se mencionó en el Artículo I (pág. 27), es probable que estas cepas sean productoras de la β -exotoxina, debido a las lesiones tipo úlceras desarrolladas en ratones, por lo cual serían clasificadas como de riesgo para su aplicación en campo. De cualquier forma, los altos valores de toxina requeridos para matar el 50% de la población ($LD_{50} = 397 \mu\text{g/ml}$), aunados a los resultados de campo y el efecto citotóxico mostrado por esta cepa en ratones, sugieren la busca de otras alternativas para el control de este coléoptero-plaga.

Para finalizar, cabe mencionar que se incluyó el capítulo del libro *Bioassays of Bacillus thuringiensis against terrestrial insects*, del "Manual of techniques in insect pathology" (pág. 107), ya que en él se describe de forma práctica como se realizaron los bioensayos, que fueron usados en las pruebas de citotoxicidad de las cepas de Bt descritos en los diferentes artículos presentados en esta tesis.

CONCLUSIONES

Con respecto a los resultados obtenidos en los experimentos realizados acerca de diferencias entre cepas de Bt mexicanas y HD podemos concluir que:

1. Las cepas de Bt evaluadas son diferentes con relación al espectro de hospederos, serotipo, peso molecular de la PCI, metabolismo bioquímico, resistencia a antibióticos y perfil de plásmidos.
2. Todas las cepas con actividad tóxica a lepidópteros mostraron reacción cruzada con un antisuero policlonal antiCryIAb en una banda de proteína de entre 120 -130 KDa, mientras que las cepas C-9 y HD-193 (*galleriae*), mostraron además una banda de ca. 120 y 70 KDa que reaccionó con un antisuero policlonal antiCryIAc.
3. Las cepas GM-7 y GM-10 pueden ser usadas en forma segura para el control de plagas de lepidópteros en campo, ya que no mostraron efecto citotóxico en ratones.
4. Las cepas C-4 y C-9 (*kumamotoensis*), fueron tóxicas contra coleópteros y lepidópteros, sin embargo causaron lesiones tipo úlceras en hembras de ratones Balb/C.
5. Es posible usar harina nixtamalizada de maíz para producir formulados granulares y microcapsulados efectivos y económicos para el control de lepidópteros en maíz, obteniéndose una vida de anaquel de, cuando menos, dos años.
6. Es posible microcapsular Bt usando la técnica de secado por aspersión.
7. Las microcápsulas con 3% de ingrediente activo mejoran la estabilidad de la actividad tóxica de Bt.
8. En este proceso es posible adicionar hasta el 50% del IA sin pérdida de toxicidad.
9. El producto es 35% más económico que los productos presentes en el mercado actualmente.
10. Las cepas de Bt aisladas en México muestran baja toxicidad hacia *E. varivestis*.
11. Es posible emplear formulados microcapsulados para su aplicación en todo tipo de cultivos.
12. Las cepas C-4 y C-9, que mostraron actividad tóxica a *E. varivestis* no se recomiendan para emplearse en campo.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Después de los resultados obtenidos se presentan algunas alternativas de investigación a futuro sobre el trabajo antes descrito:

1. Hacer bioensayos con cepas nativas aisladas de México, frente al tipo de insectos a los cuales se les pueda asociar como tóxicos al emplear la técnica de innumodetección.
2. Probar otros agentes potenciadores y diferentes pesticidas (hongos, virus, otro tipo de bacterias, materiales orgánicos, etc.), para su empleo como formulados granulares a base de harina de maíz nixtamalizado.
3. Evaluar diferentes matrices que muestren resultados similares que los encontrados con harina nixtamalizada, tanto en formulaciones granulares como para microcapsulados, de menor costo.
4. Estudiar materiales que aumenten la adherencia de los microcapsulados a los cultivos.
5. Realizar estudios de bioingeniería correspondientes en cuanto a tipos de fluidos, cambios en las condiciones de secado, etc., necesarias para microcapsular diferentes clases de pesticidas.
6. Evaluar los microcapsulados empleando diferentes serovariedades y cepas de Bt en diferentes tipos de cultivos a nivel de campo.
7. Conocer el impacto ecológico del empleo en campo de cepas de Bt que muestren actividad tóxica contra lepidópteros y coleópteros al estar usando formulados con mayor residualidad.
8. Promover comercialmente los formulados evaluados en este trabajo, demostrando las ventajas de los mismos con respecto a los que se encuentran en el mercado, como una alternativa dentro del programa de control biológico.

LITERATURA CONSULTADA

Angus, T. A. y P. Lüthy. 1971. Formulations of microbial insecticides. *In: Microbial Control of Insects and Mites*. H.D. Burgues y N. W. Hussey (eds.). Academic Press, New York, N.Y. pp 623-638.

Barak, B., A. Zaritsky y J. Margalit. 1988. The fate of *B. t.* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) in the natural habitat. International Symposium of Insecticide of *Bacillus thuringiensis* Hubei. Academy of Agricultural Science. Wuhan. People's Republic of China. October. pp 14-18.

Baker, C. A., A. A. Brooks, R. Z Greenley y J. M. Henis. 1989. Encapsulation of biological material in non-ionic polymer breads. Patente # 5,089,407. USA.

Bartelt, R. J., M. R. McGuire y D. A. Black. 1990. Feeding stimulants for the european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* 19: 182-189.

Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089-1098.

Behle, R. W., M. R. McGuire, R. L. Guillespie y B. S. Shasha. 1996a. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Environ. Entomol.* 19: 182-189.

Behle, R. W., M. R. McGuire y B. S. Shasha. 1996b. Extending the residual insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* with casein-based formulations. *J. Econ. Entomol.* (en prensa).

Benedict, H., D. W. Altman, P. F. Umbeck y D. R. Ring. 1992. Behavior, growth, survival, and plant injury by *Heliothis virescens*(F.) (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic Bt Cottons. *J. Econ. Entomol.* 85: 589-593.

Bernhardt, J. L. y M. Shepard. 1978. Overwintered Mexican bean beetles: emergence from overwintering sites, fecundity, fertility, and longevity. *Am. Entomol. Soc. Am.* 71: 724-727.

Betz, F. S., S. F. Forsyth y W. E. Stewart. 1990. Registration requeriments and safety considerations for microbial pest control agents in North America. *In: Safety of microbial insecticides*. M. Laird, L. A. Lacey, y E. W. Davidson (eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. pp 3-10.

Biever, D. 1995. Insectos benéficos para controlar la Palomilla Dorso de Diamante. En: Aprobación en Estudios de Efectividad Biológica en Plaguicidas. D. Mota-Sánchez, J. C. Rodríguez-Maciel, H. Sánchez-Arrollo y A. Lagunes Tejeda (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. pp 38-41.

Bohm, H. A. y D. R. Friend. 1988. Microcapsules containing insecticidal pathogen stabilised against UV light-comprising acrylate-type encapsulating agent which retains sunscreen, e.g. malachite green. Lim Technical Laboratories. Patente Europea # WO8904170.

Borgatti, A. y G. Guyer. 1963. The effectiveness of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis berliner* on house fly larvae. *J. Insect. Pathol.* 5: 377.

Byerly-Murphy, K. F. y R. Bujanos-Muñiz. 1995. Diseño e Implementación de Manejo Integrado de Plagas en Crucíferas: El caso de la Palomilla Dorso de Diamante en el Bajío, México. En: II Seminario Internacional sobre: Estrategias de Control de la Palomilla Dorso de Diamante en Crucíferas. Celaya, Gto. México. pp 16-31.

Cannerday, T. D., H. Womack, C. Boone, J. McKeown, O. L. Brooks y C. Perry. 1975. Cotton insect investigations in Georgia. Report for 29th Annual Cotton Insect Research and Control Conference. Georgia. USA. pp: 15

Castro-Franco, R. 1994. Desarrollo de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* y extracto de *Agave lechuguilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (B. J. Smith). Tesis doctoral. FAC-UANL. Monterrey, N. L. México.

Couch, T. L. 1978. Formulations of Microbial Insecticides. Conventional Formulations. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 10: 3-10.

Creighton, C. S., W. S. Kinard y N. Allen. 1961. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* and several chemical insecticides for control of budworms and hornworms on tobacco. *J. Econ. Entomol.* 54: 1112-1114.

Cunningham, J. C. 1988. Baculovirus: their status compared to *Bacillus thuringiensis* as microbial insecticides. *Outlook in Agriculture.* Pergamon Press, England. 17: 10-16.

Daoust, R. A. 1990. Commercialization of bacterial insecticides. Vth International Colloquium on Invertebr. Pathol. and Microbial control. Proceeding and abstracts. Adelaides, Australia. pp 7-11.

Debabov, V. G., R. R. Azizbekyan, V. M. Stepanov y G. G. Chestukhina. 1984. Genetic and biochemical study of *Bacillus thuringiensis*. In: Genetics and biotechnology of Bacilli. A. T. Ganesan y J. A. Hoch (eds.). Academic Press Inc. New York, N. Y. pp 345-359.

DeLucca, A. J. y J. M. Bland. 1990. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *J. Ind. Microbiol.* 6: 129-131.

Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a new potential method for increasing environmental stability of enthomopathogens. *Environ. Entomol.* 17: 120-126.

Dulmage, H. T. 1967. Aspects of the industrial production of microbial insect control agents. *In: Insect pathology in microbial control.* P. A. VAN DEER Laan (ed.). Publishing Company. North-Holland. pp 124.

Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.* 17: 120-126.

Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1989. Response of starch- encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing ultraviolet screens to sunlighth. *Environ. Entomol.* 18: 1035-1041.

Falcon, L. A.. 1971. Microbial control is a tool in integrated control programs. *In: Biological Control.* C. B. Huffaker (ed.). Plenum Press, New York, N. Y. pp 346.

Faust, R. M. 1973. The *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. Current status. *Bull. Entomol. Soc. Amer.* 19: 153-156.

Feitelson, J. S., Payne, J. y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology.* 10: 271-275.

Ferro, D. N. y W. D. Gelernter. 1989. Toxicity of a new strain of *Bacillus thuringiensis* to colorado potato beetle (Coleoptera: Crysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 750-755.

Flinn, J. E. y H. Nack. 1967. What is happening in microencapsulation. *Chem. Engr.* 63: 171-178.

Flint, M. L. y R. VAN DEER Bosch. 1981. Introduction to Integrated pest management. Plenum Press. New York, N. Y. pp 240.

Fox, L. J. 1989. Natural pesticide. A Challenge to manipulate. *Bio/Techlology.* 7: 1004.

Frankenhauzen VAN K., R, Milne, R. Brousseau y L. Masson. 1992. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *krustaki* to defoliating forest Lepidoptera. *J. Invert. Phathol.* 59: 149-154.

Frankenhuyzen VAN K., y F. Ortiz. 1990. Thirty years of *Bacillus thuringiensis* research pays off ". *In: Forest pest management Institute Newsletter.* K. B. Jamieson (ed.). Forestry, Forets, Canada. 9. pp 2-8.

Fravel, D. R., J. J. Marois y W. J. Connick. 1984. Encapsulation of potential biocontrol agents in sodium alginate aggregates. *Phytopathology*. 74: 756.

Fravel, D. R., J. J. Marois, R. D. Lumsden y J. Connick. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate clay matrix. *Phytopathology*. 75: 774-777.

Gabriel, C. J. y R. J. Cook. 1990. Biological control: the need for a new scientific framework. *Bio/Science*. 40: 204-207.

Galán-Wong, L. J. 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoprusia ni* (Hubner) y *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidóptera: Noctuidae). Tesis doctoral. FCB, UANL Monterrey, N. L. México.

García-Gutiérrez, C., J. L. Carrillo-Sánchez y M. Piedra-Soto. 1993. Control de calidad de la conchuela del frijol en la cría masiva de *Pediobius foveolatus* (Crawford) (Hymenoptera: Eulophidae). XVI Congreso Nacional de Control Biológico. F.C.B., UANL., México pp 18.

Gelernter, W.D. 1990. MVP TN Bioinsecticide: a bioengineered, bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Proceeding and Abstracts. Adelaide, Australia. pp 14.

Gelernter, W. D. y G. W. Zehnder. 1989. Activity of the M-One formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Relationship between susceptibility and insect life stage. *J. Econ. Entomol.* 82: 756-761.

Goldburg, R. J. y G. Tjaden. 1990. Are B. T. K. plants really safe to eat? *Bio/Technology*. 8: 1011-1016.

Grasser, C. S. y R. T. Fraley. 1992. Transgenic Crops. *Scientific American* June. pp 62-69.

Ignoffo, C. M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 217: 141.

Ignoffo, C. M., 1979. Bioinsecticides. *In: Microbial Technology. Microbial Processes.* Pipler and Perlan (eds.). Academic Press, Vol. 1. England. pp 1-27.

Ignoffo, C. M. y O. F. Batzer. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlighth stability of an insect virus. *J. Econ. Entomol.* 64: 850-853.

Ignoffo, C. M. y C. García. 1978. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. *Environ. Entomol.* 7: 270-272.

Insell, J. P. 1983. Studies of the structure and origin of the parasporal inclusion of sporulating bacilli. PhD. thesis, University of Western Ontario. Ontario, Canada.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). 1992. Producción y Plagas en Cultivos de Importancia en la Región del Llano de Durango. Durango, Dgo. México

Johnson, D. E. 1978. Inhibition of RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by β -exotoxin. *Can. J. Microbiol.* 24: 537-543.

Kaelin, P., Morel, P. y F. Gadani. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 19-25.

Keeler, B., y G. A. Langenbruch. 1993. Control of coleopteran pests by *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs, (eds.). John Wiley & Sons. England. pp: 177-183.

Koziel, M. G., G. L. Beland, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M. R. Meghiji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright y S. V. Evola. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology.* 11: 194-200.

Krieg, A. A., Huger, M. Lagenbruch, G. A. y W. Schnetter. 1984. Neue ergebnisse uber *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* unter besonderer berucksichtigung seiner wirkung auf den kartoffelkafer (*Leptinotarsa decemlineata*). *Anz Schaedlingskd. Pflanzenschutz Umweltschutz.* 57: 145-150.

Lambert, B. y M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticides. *Bio/Science.* 42: 112-122.

Levinson, B. L. 1988. Biopesticide for use on tanning-containing plants: Containing a mixture of *Bacillus thuringiensis* toxin, tanning-binding compound and carrier. *Ecogen. Patente Europea # WO8807877.*

Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gorminet y J. Chaufaux. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. *Biotechnology.* 13: 67-71.

Liu, Y. T., Sui, M. J., Ji, D. D., Wo, I. H., Chou, C. C. y C. C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invertbr. Pathol.* 62:131-136.

Lugo-Barrera, D. 1995. Regulación del uso y registro de plaguicidas en México. *En: Aprobación en Estudios de Efectividad Biológica en Plaguicidas.* D. Mota-Sánchez, J.C. Rodríguez-Maciél, H. Sánchez-Arrollo y A. Lagunes Tejeda. (ed.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México. pp 16-19.

Lüthy, P., C. Hofmann y F. Jaquet. 1985. Inactivation of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by tannin. *FEMS Microbiol. Lett.* 28: 31-33.

Martin, P. A. W. y R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.

McGuire, M. R. y B. S. Shasha. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 83: 1813-1817.

McGuire, M. R. y B. S. Shasha. 1992. Adherent starch granules for encapsulation of insect control agents. *J. Econ. Entomol.* 85: 1425-1433.

McGuire, M. R., B. S. Shasha, L. C. Lewis, R. J. Bartelt y K. Kinney. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 2207-2210.

McGuire, M. R., D. A. Streett y B. S. Shasha. 1991. Evaluation of starch encapsulation for formulation of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) entomopoxiviruses. *J. Econ. Entomol.* 84: 1652-1656.

Moffat, A. S. 1991. Research on biological pest control moves ahead. *Research News Sci.* 252: 211-212.

Morales-Ramos, L. H. 1993. Formulación de bioinsecticidas. *En: Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en Bacillus thuringiensis.* Galán-Wong L. J. (ed.). UNAM, México, D. F. México. pp 85-90.

Norris, J. R. 1978. Microbial control of pest insects. *In: Companion to microbiology.* Bull & Meadow. (eds.). Longman. London. pp 459-479.

Payne, C. C. 1988. Insect pest management concepts: the role of biological control. In *Biotechnology, Biological Pesticides and Novel Plant-Pest Resistance for Insect Pest Management.* *In: Roberts D. W. y R. R. Granados (eds.).* Proceedings of the Center Boyce Thompson Institute for Plant Research. Cornell Institute. Ithaca, New York, USA. pp 1-7.

Percy, J. y P. G. Fast. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertbr. Pathol.* 41: 86-98.

Rao, M. A. 1992. Review: The structural approach to rheology of plant food dispersions. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* **32**: 3-17

Robert, P., Chaufax, J. y M. Marchal. 1994. Sensitivity of larval *Oxythyrea funesta* (Coleoptera: Scarabaeidae, Cetoniinae) to three strains of *Bacillus thuringiensis* (subsp. *tenebrionis*). *J. Invertbr. Pathol.* **63**: 99-100.

Shahidi F., y X. Han, 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **33**: 501-547.

Simone, A. 1991. Research on biological pest control moves ahead. *Science.* **252**: 211-212.

Sparks, R. E. 1981. Microencapsulation. *In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemistry and Technology.* M. Grayson y E. David (eds.). John Wiley & Sons. New York, N. Y. pp 470.

Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, H. Medrano-Roldán y L. J. Galán-Wong. 1995. Microcapsulación de pesticidas. Registro de patente mexicana en trámite. SECOFI No. 960330.

Taylor, A. H. 1985. Encapsulation system and their application in the flavor industry. *Food Flav. Ingred. Packg. Proc.* **5**: 48-52.

Tefft, J. y D. R., Friend. 1993. Polymeric microspheres for controlled-release herbicide formulations. *A. C. S. Symp. Ser. Am. Chem. Soc. Washington, D. C. USA.* pp 190-201.

U. S. Environmental Protection Agency. Office of pesticides programs. December 1988. Guidance for the Registration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the Active Ingredient. Washington, D. C. USA.

Valenzuela, L. E. 1987. Microorganismos Entomopatógenos. Su Aprovechamiento en el control de insectos plaga. *Dirección Gral. de Patronato Uni., UACH.* México. pp 83-88.

Warren, G. W., N. B. Carozzi, N. Desai y M. G. Koziel. 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Econom. Entomol.* **85**: 1651-1659.

Youngs, R. A. 1986. Spray drying encapsulation-today's review. *Food Flav. Ingred. Packg. Proc.* **8**: 31.

Zehnder, G. W. y W. D. Gelernter. 1989. Activity of ten M-ONE formulations of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against of colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): relationship between susceptibility and insect life stage. *J. Econom. Entomol.* **82**: 756-761.

