

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**DESARROLLO DE FORMULADOS GRANULARES PARA INCREMENTAR LA
ESTABILIDAD AMBIENTAL DE *Bacillus thuringiensis* USANDO DIVERSOS
POLÍMEROS Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

TESIS

QUE PRESENTA LA

M.C. LILIA H. MORALES RAMOS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN

BIOTECNOLOGIA

Monterrey, N.L. México.

Diciembre, 1996.

TD
SB97
M6
C.1



1080073237

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**DESARROLLO DE FORMULADOS GRANULARES PARA INCREMENTAR LA
ESTABILIDAD AMBIENTAL DE *Bacillus thuringiensis* USANDO DIVERSOS
POLÍMEROS Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

TESIS

QUE PRESENTA LA

M.C. LILIA H. MORALES RAMOS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

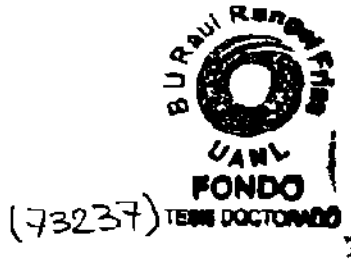
CON ESPECIALIDAD EN

BIOTECNOLOGIA

Monterrey, N.L. México.

Diciembre, 1996.

TD
B975
M6



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DESARROLLO DE FORMULADOS GRANULARES PARA INCREMENTAR LA ESTABILIDAD
AMBIENTAL DE *Bacillus thuringiensis* USANDO DIVERSOS POLÍMEROS Y SU
EVALUACIÓN BIOLÓGICA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA.

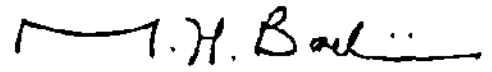
POR

M.C. LILIA HORTENCIA MORALES RAMOS

APROBADA:
COMISIÓN DE TESIS



DR. LUIS J. GALÁN WONG
DIRECTOR
PRESIDENTE



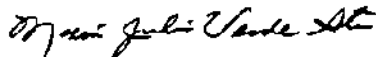
DR. MOHAMMAD H. BADI
SECRETARIO



DR. MICHAEL R. McGUIRE
ASESOR EXTERNO
VOCAL



DRA. ELIZABETH CRUZ S.
VOCAL



DRA. JULIA VERDE STAR
VOCAL

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo "DR. H.T. Dulmage", del Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., en colaboración con el Departamento de Biotecnología de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Aridas U.A.Ch., Unidad Bermejillo, Dgo. y la Unidad de Investigación de Agentes Bioactivos del ARS/USDA/NCAUR, Unidad Peoria ILL., EUA. Bajo la Dirección Interna de : Dr. Luis J. Galán Wong (FCB/UANL) y Dirección Externa del Dr. Michael R. McGuire (NCAUR/ARS/USDA).

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Control Biológico como Alternativa.....	3
Importancia.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	6
ANTECEDENTES.....	7
1.- Desarrollo Histórico de <i>B. thuringiensis</i>	7
Investigación en Cuanto al Modo de Acción.....	9
2.- Formulados de <i>Bacillus thuringiensis</i> Disponibles.....	9
3.- Avances Recientes en el Desarrollo de Productos a Base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
Genética Molecular.....	14
Organismos Recombinantes.....	15
Plantas Transgénicas.....	15
Formulaciones.....	16
4.- Ecología y Valoración de Riesgos.....	21
5.- Desarrollo de Resistencia hacia <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
6.- Aspectos Básicos Sobre Formulaciones.....	23
Tipos de Formulados.....	24
7.- Soportes Usados en las Formulaciones.....	27
8.- Insecto Blanco.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES.....	68
SUGERENCIAS PARA PRÓXIMAS INVESTIGACIONES.....	70
LITERATURA CONSULTADA.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

α	alfa	ppm	Parte (s) por millón
ADN	Ácido desoximbonucleico	PH	Polvo Humectable
ARN	Ácido ribonucleico	r.p.m.	revoluciones por minuto
ATP	Trifosfato de adenosina	sp.	Especie
β	beta	T.	<i>Trichoplusia</i>
B.	<i>Bacillus</i>	UFC	Unidad (es) Formadora (s) de Colonia (s)
CaCl	cloruro de calcio	UI	Unidad (es) Intemacional (es)
°C	grados centígrados	UV	Ultra Violeta
cm	centímetros	var.	variedad
c/u	cada uno	VVM	Volumen de Aire por Volumen de Medio por Minuto
Cry	toxinas proteicas		
δ	delta		
DL ₅₀	Dosis Letal Media ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
<i>et al.</i>	colaboradores		
EE	Error Estándar		
EPA	Agencia de Protección Ambiental		
g/l	gramo (s) por litro (s)		
h	hora (s)		
ha	Hectárea (s)		
IA	Ingrediente Activo		
Kg	Kilogramos		
kDa	Kilodaltones		
l	litro (s)		
mm	milímetro (s)		
ml	mililitro (s)		
mg	miligramo (s)		
m ²	metro (s) cuadrado (s)		
μg	microgramo (s)		
M	molar		
nm	nanómetro (s)		
#	número		
%	porciento		
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H ⁺		

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página.
1	Formulaciones de <i>Bacillus thuringiensis</i> Productos y su Uso.	11
2	Beneficios de los Sistemas de Liberación Controlada.	26
3	Categorías en Sistemas de Liberación Controlada.	27
4	Sobrevivencia de <i>Bacillus thuringiensis</i> (GM-7) en los Formulados Granulados.	45
5	Mortalidad de Larvas de <i>Trichoplusia ni</i> Expuestas a los Diferentes Formulados de <i>B. thuringiensis</i> Tratados con Enzimas e Incorporados a Dieta Artificial.	46
6	Mortalidad de Larvas de <i>Trichoplusia ni</i> Expuestas 24 h a los Formulados Granulados de <i>B. thuringiensis</i>.	47
7	Estabilidad de los Formulados Granulados Después de su Almacenamiento Durante 12 Meses a Temperatura Ambiente.	48
8	Efecto del Almacenamiento de los Formulados Granulados de <i>B. thuringiensis</i> sobre la Mortalidad de Larvas de <i>T. ni</i>.	50
9	Preferencia de Alimentación de Larvas de <i>T. ni</i> Expuestas a las Diferentes Formulaciones Granulares.	51
10	Propiedades Adherentes de las Diferentes Matrices Poliméricas Utilizadas.	51
11	Efecto de Diferentes Formulados Granulados de <i>B. thuringiensis</i> sobre la Supervivencia de Larvas de <i>T. ni</i> en Plantas de Algodón en Invernadero.	52
12	Estimación del Daño en Plantas de Algodón Tratadas con Diferentes Formulados de <i>B. thuringiensis</i> e Infestado con Larvas de <i>T. ni</i> en Invernadero.	52

Tabla No.	Título	Página.
13	Contrastes Lineales del Porciento de Mortalidad de Larvas de <i>T. ni</i> Alimentadas con Hojas de Algodón Tratadas con Diferentes Formulaciones de <i>B. thuringiensis</i> y Sometidas a un Régimen de Riego.	54
14	Sobrevivencia de Larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en Plantas de Maíz Tratadas con Diferentes Formulados de <i>B. thuringiensis</i> en Invernadero.	55
15	Efecto de la Aplicación de Diferentes Formulados Granulares de <i>B. thuringiensis</i> sobre el Rendimiento de Maíz en Kg/ha.	55
16	Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Supervivencia de las Esporas de <i>B. thuringiensis</i> en Diferentes Formulados Granulares.	57
17	Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Actividad Tóxica de <i>B. thuringiensis</i> en Diferentes Formulados Granulares contra <i>T. ni</i> .	59
18	Efecto del Rojo Congo sobre la Actividad y Viabilidad de Diferentes Formulados de <i>B. thuringiensis</i> Expuestos a un Simulador de Luz Solar.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página.
1	Estabilidad de los Formulados Después de su Almacenamiento a Temperatura Ambiente Durante 12 Meses.	49
2	Actividad Tóxica de Diferentes Formulados de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas de <i>T.ni</i> Alimentadas de Hojas de Algodón en Invernadero.	53
3	Efecto de la Aplicación de Diferentes Formulados de <i>B. thuringiensis</i> sobre el Rendimiento de Maíz.	56
4	Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Viabilidad de las Esporas de <i>B. thuringiensis</i> en Diferentes Formulados.	58
5	Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Actividad Tóxica de <i>B. thuringiensis</i> en Diferentes Formulados.	61

DEDICATORIA

A Dios: Por darme el don de la vida y permitirme vivirla en esta Familia.

A la Memoria del Ing. Alfredo Morales ☩ : Mi padre juguetón, a quien le debo mis valores y la oportunidad de desarrollar una profesión y crecer en una familia llena de amor y unión.

A mi Madre Sra. Hortensia Ramos de Morales: Por su amor, dedicación y valiosas enseñanzas y por el tiempo que, ahora dedica a mis hijos.

A mis Hermanos Juan Alfredo, Ruben Fernando y Alma Rosa Morales Ramos: De quienes he recibido su invaluable apoyo, en las buenas y en las malas.

A mis Hijos Ismael Alejandro, Aldo Emanuel e Isis Carolina: Quienes le han dado a mi vida un sentido hermoso e indescriptible , con ellos comprendi la razón de vivir.

A Sergio mi Esposo: Con quien comparto todas mis inquietudes. Gracias por tu amor, paciencia, consejos y sobre todo por tu complicidad. Te amo.

"Los ideales son como las estrellas, nunca los alcanzamos, pero, igual que los marinos en altamar, trazamos nuestro camino siguiendolos"

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis J. Galán Wong, director de esta tesis, por las facilidades otorgadas, por su excelente asesoría, confianza y amistad.

Al Dr. Michael R. McGuire, por su brillante codirección como asesor externo, por su revisión y sus valiosas aportaciones.

A los Miembros de Comité de Tesis Doctoral, Dra Julia Verde Star, Dra. Elizabeth Cruz S. y Dr. Mohammad H. Badii, por su participación en la revisión del trabajo y sus excelentes contribuciones.

A la Dra. Julia Verde Star, jefe de la División de Posgrado. F.C.B. U.A.N.L. por las facilidades y el apoyo brindado.

Al Dr. Rafael Castro, por sus sugerencias y ayuda en los trabajos de campo.

Al Dr Benito Pereyra Alférez, por sus valiosos comentarios y revisión.

Al Dr. Rahim Foroughbakhch Pomavav y Dr. M.C. Roberto Mercado, por su orientación en los análisis estadísticos.

A la M.C. Katiushka Arevalo Niño, por sus valiosas sugerencias y comentarios y sobretodo por su amistad.

Al M.C. Carlos Solís Rojas, por el excelente apoyo fotográfico.

Al Sr. Feliciano Molina, por su colaboración en la realización de los bioensayos.

Al CONACYT. por el apoyo económico para la realización de este trabajo (1641-PB).

A la Unidad de Investigación de Agentes Bioactivos del ARS/USDA/NCAUR, Unidad Peoria, ILL. y El Dep. de Biotecnología de la URUZA de la UACH, Unidad Bermejillo, Dgo. por las facilidades brindadas.

De manera especial agradezco a todos los Integrantes del Lab. de Microbiología Industrial y del Suelo.

RESUMEN

En la actualidad una variedad de Insecticidas microbianos están disponibles comercialmente para el control de plagas agrícolas, forestales y vectores de enfermedades. Aún así, los productos microbianos en uso constituyen solamente el 1% del total mundial y de este porcentaje *Bacillus thuringiensis* representa el 0.6%. Varios factores son responsables del uso limitado de los insecticidas biológicos como: rango específico de hospederos, falta de actividad residual y persistencia en el ambiente. Con la finalidad de desarrollar formulaciones de *B. thuringiensis* con mejor persistencia en el ambiente se elaboraron 22 formulados con polímeros como quitina, gelatina, pectina, almidón y alginato, de estos formulados se seleccionaron 8, a los cuales se les determinó los siguientes parámetros: Sobrevivencia y retención de la actividad tóxica de *B. thuringiensis* en los formulados; Estabilidad de los formulados en almacenamiento a temperatura ambiente; Propiedades de adherencia a portaobjetos y hojas de algodón; Aceptación de los formulados por *T.ni*. Se demostró que la viabilidad de *B. thuringiensis* no se afectó por los procesos de formulación utilizados. La actividad tóxica contra larvas neonatas de *T.ni* no se alteró y se mantuvo en los bioensayos con incorporación de los formulados a la dieta en dos dosis y en forma granulada. En los estudios de estabilidad en almacenamiento se observó pérdida en la viabilidad después de 12 meses a temperatura ambiente para la mayoría de los formulados, excepto para los formulados GL y AI (gelatina y almidón respectivamente), sin embargo la actividad insecticida no se afectó por el almacenamiento, excepto para el formulado de alginato. En los experimentos de adherencia a portaobjetos y hojas de algodón, se encontró que los formulados a base de gelatina y pectina presentan las mejores propiedades de adherencia. En lo que respecta al bioensayo para determinar preferencia de alimentación con larvas de *T.ni*, se encontró que después de tejido de lechuga las larvas prefieren alimentarse con los formulados de gelatina y pectina, los formulados de quitina y alginato fueron rechazados por las larvas de *T. ni*. En base a los resultados de laboratorio se seleccionaron los formulados GL (gelatina), Po (pectina) y AI (almidón) para evaluar su eficacia en invernadero y campo. Estos soportes fueron utilizados para desarrollar formulados granulados con *B. thuringiensis* al 1%, sin protector de luz UV y formulados con *B. thuringiensis* al 1% y rojo congo al 1% como protector de luz UV. Los resultados obtenidos en invernadero con plantas de algodón, mostraron que en general los tres soportes son efectivos, pero los formulados sin rojo congo fueron mejores, posiblemente debido a que el rojo congo afectó la adherencia de los polímeros, también se observó que el extracto libre de *B. thuringiensis* cepa GM-7, bajó considerablemente su eficacia después de los 14 días de irrigación. En los bioensayos con plantas de maíz en invernadero con larvas de *S. frugiperda*, los tres soportes fueron efectivos, no se encontró diferencia significativa entre los formulados con rojo congo y sin rojo congo, posiblemente por que en el maíz la adherencia no es un factor determinante. En lo que respecta al experimento de campo con maíz, solo se encontró diferencia significativa entre el formulado de pectina con *B. thuringiensis* y rojo congo y el resto de los formulados. En los estudios con el simulador solar, se demostró que la actividad tóxica de *B. thuringiensis* se afecta en forma significativa después de 2 horas de exposición al simulador solar, los formulados con rojo congo conservan el 83% de su actividad en comparación con los formulados sin rojo congo que conservan el 68 %. Sin embargo a las 8 h de exposición los formulados con rojo congo conservan solamente el 52% de su actividad y los formulados sin rojo congo solo el 35% de su actividad inicial.

ABSTRACT

Nowadays a variety of microbial insecticides are commercially available to control crop and forestry plague and disease vectors. Even so, the microbial products in use constitute only 1% of the world total and of this percentage *Bacillus thuringiensis* represents the 0.6%. Several factors are responsible for the reduced employment of biological insecticides, like their narrow activity spectrum, their limited residual activity and their poor environmental persistence. In order to develop *Bacillus thuringiensis* formula with better environmental persistence, 22 formulations were manufactured with the polymers chitin, gelatin, pectin, starch and alginate. Eight of them were selected to determine: survival and retention of toxic activity of *B. thuringiensis* in the formulation; stability of formulations in storage at room temperature; properties of adherence to slides and cotton leaves and acceptance of the formulations by *T. ni* larvae. Results indicate that viability of *B. thuringiensis* wasn't affected by the process of manufacture employed. The toxic activity against neonate larvae of *T. ni* wasn't affected and was kept in the bioassays of incorporation of the formulations to the diet in two doses and in those in granulate form. In the studies of storage stability at room temperature, it was observed lost of viability after 12 months for most of the formulations, except for GL and AL (gelatin and starch respectively), nevertheless insecticide activity wasn't affected by storage except for the alginate formulations. In the experiments of adherence to slides and cotton leaves, it was found that formulations with pectin and gelatin showed the best properties of adherence. The results of the bioassay with *T. ni* to determine feeding preference indicate that after the lettuce tissue, the larvae prefer to feed on the gelatin and pectin formulations; the chitin and alginate formulations were rejected by the *T. ni* larvae. Accordingly to the laboratory results the GL (gelatin), Po (pectin) and Al (starch) formulations were selected to evaluate their greenhouse and field efficiency. These supports were used to manufacture granular formulations with 1% *B. thuringiensis* and 1% congo red as UV light protector. The greenhouse results with cotton plants demonstrated that in general the three supports are effective, but the formulations without congo red were better, maybe because congo red affected the adherence of polymers, it also was observed a considerable reduction in the efficiency of the extract without *B. thuringiensis* strain GM-7, after 14 days of irrigation. In the greenhouse bioassays with corn plants and *S. frugiperda* larvae the three supports were effective, there were not significant difference between the formulations with and without congo red, possibly because in the corn the adherence is not a determinant factor. Respect to the field experiments with corn, it was found significant difference only between the pectin formulation with *B. thuringiensis* and congo red and the rest of the formulations. In the solar simulator studies, it was demonstrated that the toxic activity of *B. thuringiensis* is affected in a significant way after 2 hours of exposition to solar simulator, the congo red formulations retain 83% of their activity against the formulations without congo red which retain 68% however at 8 h of exposition the congo red formulations retain only 52% of their activity and the formulations without congo red only 35% of their initial activity.

INTRODUCCIÓN

Se considera que los plaguicidas hacen una significativa contribución para mantener la producción de alimentos en el mundo, aplicándose anualmente 2.5 millones de toneladas de estos productos químicos. La creciente concientización hacia los problemas de contaminación ambiental y el uso de agentes químicos innecesariamente peligrosos ha resultado en una proliferación de leyes en todo el mundo para reducir la cantidad de productos químicos autorizados para ser utilizados en la producción de alimentos (Hall, 1990). En general, se estima que por cada dólar invertido en control de plagas éste es devuelto en aproximadamente cuatro dólares de cosechas salvadas. Sin embargo, muchos de los beneficios de usar productos químicos para el control de plagas son basados únicamente sobre su efecto directo en los cultivos y tales afirmaciones no incluyen el costo indirecto ambiental y económico asociado con el uso de estos compuestos. Hace más de una década la agencia de protección ambiental (EPA), de Estados Unidos, puntualizó la necesidad de efectuar investigaciones más reales sobre el costo/beneficio del uso de productos químicos para el control de plagas (Pimentel *et. al*, 1992).

Control Biológico Como Alternativa

El hombre se ha preocupado por ampliar su campo de acción a fin de encontrar métodos de combate igual o más efectivos que los productos químicos. El control microbiológico es una alternativa, ya que los microorganismos constituyen una amplia gama de agentes patógenos para los insectos. Los insecticidas microbianos son microorganismos vivos, como hongos, bacterias, virus, protozoarios y nemátodos así como sus metabolitos. El creciente interés en los agentes de control microbiológico se debe a que son seguros, no contaminan, algunas veces son más efectivos que los químicos y con menos posibilidades de que el insecto desarrolle resistencia.

Para que un microorganismo entomopatógeno o su producto sea considerado como un agente potencial para utilizarse en control biológico debe cumplir con los siguientes atributos

- 1.- Efectivo y específico contra el insecto blanco y consistente en la supresión de las poblaciones de la plaga
- 2.- Disponibilidad y factibilidad de una tecnología de producción continua
- 3.- Estar disponible en formulaciones que posean una vida de anaquel larga, ser estables en el hábitat del insecto blanco y diseminarse bien para maximizar el contacto con el insecto blanco

4.- No ser infeccioso para el humano y su efecto en la flora y fauna no blanco debe ser mínimo

5.- Poseer potencial de desarrollo de mercado y de producción.(Aizawa, 1974; Granados, 1981; Ignoffo, 1979; Khachatourianus, 1986; Magnas, 1963).

Actualmente, se conocen más de 100,000 especies de microorganismos, de los cuales alrededor de 2,000 son patógenos de insectos; destacándose como entomopatógenos alrededor de 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y cerca de 100 especies de bacterias. La mayoría de estos microorganismos son poco conocidos, mientras que algunas variedades de *B. thuringiensis* y virus han sido estudiadas con más detalle (Galán Wong, 1993). Las propiedades entomopatógenicas de *B. thuringiensis* son muy variables. En años recientes se han realizado extensivas investigaciones para obtener nuevas cepas con diferentes espectros de acción. *Bacillus thuringiensis* ha sido clasificado en un total de 55 serotipos basados en sus propiedades bioquímicas y los antígenos flagelares o antígenos H (Lecadet 1994, Charles, 1996). Esta clasificación no refleja el patotipo de la bacteria, el cual es debido esencialmente a un cristal glicoproteico formado por varios polipéptidos denominados δ -endotoxina. Estas proteínas insecticidas son sintetizadas después de el estado II de esporulación (t_2 - t_3) y se acumulan en la célula madre como un cristal el cual puede representar mas del 25% del peso seco de la célula. Algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* pueden sintetizar más de un cristal, el cual puede estar formado por diferentes δ -endotoxinas. Dependiendo de la composición de la δ -endotoxina, el cristal puede tener varias formas (Lereclus *et. al*, 1993). Höfte Y Whiteley, 1989 propusieron un sistema de nomenclatura basado en sus propiedades insecticidas. Su espectro de acción incluye principalmente larvas de insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros; aunque recientemente se han reportado toxinas activas contra ácaros (Payne, *et. al*, 1992), nemátodos (Meadows, *et. al*, 1990) platelmintos y protozoarios (Feitelson, *et. al* 1992). Hasta la fecha se han dividido en seis clases y varias subclases de δ -endotoxinas en base a su estructura primaria y espectro de hospedero (Cry I, II, III, IV V y VI). Además de la gran variedad de proteínas cristalinas insecticidas (δ -endotoxina y citolisina), algunas cepas de *B. thuringiensis* sintetizan una toxina estable al calor denominada β -exotoxina. Estos compuestos son análogos a nucleótidos cuya actividad insecticida podría ser debida a inhibición de la ARN polimerasa por competencia con ATP (Lereclus *et. al*, 1993).

IMPORTANCIA

B. thuringiensis destaca entre los plaguicidas microbianos de mayor éxito comercial ya que representa el 90% de los bioplaguicidas usados actualmente y se espera que ocurra un incremento en su utilización en los años venideros. Las ventajas comerciales que presentan las formulaciones a base de *B. thuringiensis* son: los bajos costos de desarrollo *in vitro*, la ausencia de toxicidad para animales y el hombre, la toxicidad específica para el insecto blanco, la acción rápida, la facilidad de formulación, larga vida de anaquel, y la aplicación por métodos convencionales. Sin embargo existen dos aspectos que reducen su valor comercial, la baja persistencia de las toxinas en el ambiente y la alta diseminación de esporas (cerca de 10^{15} por hectárea), este último se toma en cuenta considerando que en algunos países no está autorizada la presencia de esporas viables en los productos (Meadows, 1993). Entre las estrategias actualmente utilizadas para alcanzar el mayor potencial de estos productos se involucran el desarrollo de formulaciones ambientales más estables con tecnología de liberación lenta o microcapsulación el cual es un sistema muy versátil ya que permite la elaboración de capsulados sólidos o asperjables además, fácilmente se pueden incorporar fotoprotectores para extender la actividad insecticida, fagoestimulantes para hacer más atractivo el bioinsecticida para el insecto blanco, agentes de adherencia que evitan la pérdida del insecticida por lavado del follaje etc. Otras estrategias que se utilizan son: el aislamiento de cepas más potentes, la búsqueda de nuevos patotipos, así como el uso de métodos clásicos y modernos de manipulación genética para obtener productos comercialmente más competitivos. Este trabajo está dirigido al desarrollo de formulados granulares que prolonguen la actividad residual de *Bacillus thuringiensis*. La originalidad de este trabajo radica en que los polímeros utilizados no se han empleado anteriormente como material soporte para la elaboración de formulados granulares de *B. thuringiensis* var. *aizawai* cepa GM-7, a excepción del almidón que ha sido usado para microcapsular *B.thuringiensis* var. *kurstaki* con buenos resultados y por lo tanto en este trabajo se usa para comparar contra él los resultados con los otros polímeros. Se propone la siguiente hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

Es posible atrapar en diversos polímeros como quitina, gelatina, pectina y alginato de calcio a *Bacillus thuringiensis* sin restarle su actividad tóxica e incrementando su resistencia a las condiciones ambientales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso potencial de diversos polímeros (alginato de calcio, quitina, pectina y gelatina) como soportes para la elaboración de un formulado granular de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* cepa GM-7.

OBJETIVOS PARTICULARES

A cada uno de los formulados determinar:

- 1.- Sobrevivencia y retención de la actividad insecticida de *B. thuringiensis* en el formulado.
- 2.- Estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente.
- 3.- Efectuar un estudio de preferencia de alimentación por parte del insecto prueba.
- 4.- Adherencia a portaobjetos y hojas de algodón.
- 5.- Efectuar una evaluación de la efectividad en invernadero y campo, con los formulados seleccionados. Evaluar el efecto de la luz solar directa sobre la actividad insecticida de los formulados sin protector de luz UV y usando rojo congo como protector.
- 6.- Evaluar el efecto de la luz solar sobre la actividad insecticida de los formulados, sin protector de luz UV y usando rojo congo como protector.

ANTECEDENTES

1.- Desarrollo Histórico de *Bacillus thuringiensis*:

La historia de *Bacillus thuringiensis* inicia, cuando un bacteriólogo japonés (Ishawata, 1901) aisló un bacilo de un gusano de seda enfermo. Una década después en 1911 Berliner aisló un microorganismo similar de *Anagasta kuehniella* en Alemania. Berliner, lo llamó *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911; 1915). Los primeros intentos para utilizar a *B. thuringiensis* para el control de insectos se dieron a finales de 1920 y en los inicios de 1930 contra el gusano Europeo de maíz *Ostrinia nubilalis*. El primer producto comercial llamado Sporeine estuvo disponible en 1938 en Francia (Weiser, 1986). Durante los años 50, la producción comercial de *B. thuringiensis* se desarrolló mas extensivamente en varios países, incluyendo la URSS, Czechoslovakia, Francia y Alemania. Para 1954, cuatro productos se tenían disponibles a base de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* :

Bakthane L-69 (PH y Polvo) producido por Rohm y Haas.

Biotrol BTB (PH y Polvo) producido por Productos Nutrilite.

Parasporin (PH y Polvo) producido por Grain Procesing Inc.

Thuricide (PH y Polvo) producido por Internacional de Minerales y Quimicos.

En general los resultados obtenidos con estos productos fueron favorables contra : *Pieris rapae* (gusano del repollo), *Plutella xylostella* (palomilla del dorso de diamante), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor) y *Colias eurytheme* (oruga de la alfalfa), sin embargo los resultados en campo eran inconsistentes, debido a la falta de estandarización. Durante los años siguientes se experimentó con el uso de aspersores y adherentes para incrementar la eficacia de *B.thuringiensis* en campo (Couch, 1978; Jacques y Fox, 1960). A mediados de 1960, decrece el numero de manufactureras de *B.thuringiensis* y solo quedaron dos Biotrol y Thuricide. En 1966 Franklin y Cantwell en 1967 describen el efecto de la luz UV sobre las esporas de *B. thuringiensis*, lo que se consideró como la razón primaria de la débil actividad residual de *B. thuringiensis* en el campo. Dos sucesos en 1960 fueron de particular significancia para mejorar la eficacia en campo y acelerar la comercialización de *B. thuringiensis*. El primero fue el descubrimiento de la cepa HD-1 *kurstaki* por Dulmage (Dulmage, 1970), un aislado de 2 a 200 veces mas activo contra las plagas agrícolas claves en comparación con los otros productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* y el segundo fue el establecimiento de un sistema internacional para estandarizar la potencia de los productos comerciales. Los productos originalmente eran estandarizados en base a la

cuenta de esporas, pero se ha encontrado que esta no se relaciona con la actividad insecticida (Krieg, 1965; Dulmage y Rhodes, 1971). Actualmente se expresan en unidades internacionales determinadas mediante bioensayos contra *T. ni* usando la cepa HD-1 como estándar (Dulmage *et. al*, 1971). La introducción de formulaciones estandarizadas basadas en la cepa HD-1 en general mejoraron la eficacia de las pruebas de campo. Durante 1970 se llevaron a cabo numerosas pruebas de campo para determinar equipo, sincronización, frecuencia de tratamiento, rangos de dosis y volúmenes de aplicación. La efectividad de *B. thuringiensis* mostró una marcada mejora durante estas pruebas, pero los resultados aún eran inconsistentes y los costos mucho mas elevados comparados con los insecticidas químicos. El costo-efectividad se empezó a mejorar cuando las formulaciones se hicieron mas concentradas y para fines de 1970, *B. thuringiensis* era considerado como una alternativa operacional a los insecticidas químicos. A principios de 1980 los esfuerzos se encaminaron a reducir los costos de producción y allanaron el camino para un incremento en el uso de *B. thuringiensis* (Frankenhuyzen, 1993). La producción comercial y el uso mundial de *B. thuringiensis* se estableció a principios de 1980, el mercado estaba dominado por productos basados en la cepa HD-1 de la subespecie *kurstaki*. Nuevos mercados se abrieron con el descubrimiento en 1976 de la subespecie *israelensis* para el control de mosca negra y mosquitos . A mediados de 1980 las ventas globales de *B. thuringiensis* fueron estimadas en cerca de 50 millones de dólares representando menos del 1% del mercado mundial de insecticidas. A pesar de la amplia aplicación de *B. thuringiensis* comprende solo una pequeña parte del mercado debido a varios factores que limitan su uso en la protección de cultivos. Un factor limitante es su estrecho espectro de actividad insecticida. Un alto grado de especificidad hacia el insecto blanco hacen a *B. thuringiensis* una alternativa deseable desde un punto de vista ambiental pero limita su mercado potencial. Otra limitante es que su eficacia tiende a ser mas variable que la de los insecticidas químicos debido a que *B. thuringiensis* debe ser ingerido, por lo que se requieren condiciones que promuevan la alimentación, y esto es agudizado aun mas por la limitada actividad residual debido a lavado por lluvia e inactivación de esporas y cristales por la luz solar. Por consiguiente la transmisión de la enfermedad de insectos enfermos a los sanos es pobre o no existe y se requiere de repetidas aplicaciones incrementando el costo. Sin embargo con el creciente reconocimiento de *B. thuringiensis* como agente potencial para el control de insectos, durante los años 80, y el

descubrimiento de la subespecie *tenebrionis*, con actividad contra coleópteros el optimismo creció y los esfuerzos se enfocaron a reducir estas limitaciones.

Investigación en Cuanto al Modo de Acción

Las investigaciones en cuanto a la caracterización y el entendimiento general del modo de acción se retrasaron y se realizaron después del desarrollo comercial. Aunque el cristal fue descrito por Berlinier en 1915 fué hasta 1950 que se identificó como un cristal de proteína (Hannay, 1953). En 1954 Angus establece que el cristal juega el mayor papel en la patogenia de *B. thuringiensis*, las investigaciones en los siguientes 20 años, se enfocan hacia la estructura, bioquímica del cristal y biogénesis durante la esporulación y modo general de acción en larvas de lepidópteros. El conocimiento disponible para inicios de 1980 puede ser resumido como sigue : El cristal está compuesto por una protoxina protéica con un peso molecular de cerca de 130 kDa y se solubiliza a pH altos en el intestino de la larva, para dar origen a la toxina que es una proteína de 60-70 kDa generada por hidrólisis enzimática en el intestino medio, resistente a proteasa, la toxina actúa directamente sobre las células epiteliales de la membrana del intestino medio, causando un incremento gradual en la permeabilidad de la membrana seguido por lisis de las células, la intoxicación se asocia con una inhibición inmediata de la alimentación, pérdida de iones del intestino a la hemolinfa causando un desbalance iónico, parálisis y muerte. en otros casos esta condición permite una propagación vegetativa de *B. thuringiensis* resultando una septicemia que contribuye a causar la muerte. Con el incremento de la importancia comercial de *B. thuringiensis* y nuevos aislados, se hizo necesario un método de clasificación. En 1962 de Barjac y Bonnefoi establecen un sistema de clasificación basado en el análisis serológico de la célula vegetativa, se utilizó el antígeno flagelar H combinado con las características bioquímicas. Se hicieron refinamientos al incluir patrones electroforéticos de esterasas producidas por las células vegetativas (Norris, 1964) y serología de cristales (Krywienczyk *et. al.*, 1978). A la fecha, son conocidas 55 serovariedades.(de Barjac y Frachon, 1990; Lereclus *et. al.*, 1993). Muchos de los progresos en las investigaciones de genética molecular y modo de acción se han obtenido a partir de 1980.

2.- Formulados de *Bacillus thuringiensis* Disponibles:

En la actualidad una variedad de insecticidas microbianos están disponibles comercialmente para el control de una amplia variedad de plagas agrícolas, forestales y vectores de enfermedades (TABLA 1). Durante los 1980's la convergencia de nuevas técnicas

especialmente las producidas por tecnología de DNA recombinante y el cambio en las actitudes políticas y públicas con respecto al uso de plaguicidas, precipitaron en un dramático incremento en la investigación por la industria , gobierno y las universidades. El costo relativamente bajo de desarrollo junto con la alta diversidad de cepas y toxinas buenos prospectos de manipulación genética han sentado las bases para un actual esfuerzo para el desarrollo mundial de una nueva generación de productos para el control de insectos más efectivos y aceptables ambientalmente.

TABLA 1. FORMULACIONES de *Bacillus thuringiensis* PRODUCTOS y su USO

PRODUCTO	FORMULACION	USO
ACROBE™	Acuosa	Salud Pública, Contra Mosquitos.
AGREE ⁵	Polvo Humectable	Agricultura, Contra Lepidópteros.
BACTIMOS™ ²	Polvo Humectable	Area de poco movimiento de agua, Contra Mosquitos.
BACTIMOS PS60™ ²	Briquetas Polvo Seco	Canales, Salud Pública, Contra Mosquitos.
BACTIMOS™ ²	Briqueta Flotante	Canales, Salud Pública, Contra Mosquitos.
BACTIS-G™ ⁹	Gránulos	Salud Pública, Contra Mosquitos.
BACTIS-P™ ⁹	Polvo Humectable	Salud Pública, Contra Mosquitos.
BACTIS-S™ ⁹	Solución Asperjable	Salud Pública, Contra Mosquitos.
BACTOSPEINE 16 PB™ ²	Polvo Humectable	Agricultura, Contra Lepidópteros.
BACTOSPEINE 85 FLO™ ²	Pasta	Agricultura, Contra Lepidópteros.
BACTOSPEINE™ ²	Polvo Humectable Polvo Asperjable	Agricultura, Invernadero, Ornamentales, Contra Lepidópteros.
BACTUCIDE-P™ ⁸	Polvo Humectable	Salud Pública, Agricultura, Forestal, Jardín, Contra Lepidópteros.
BACTUCIDE-S™ ⁸	Líquido Concentrado	Salud Pública, Agricultura, Campo de Golf, árboles, Alimentos Almacenados, Contra Lepidópteros.
BERNAN BT™ ¹⁰	Polvo Humectable Polvo Asperjable gránulos, Polvo	Agricultura, Invernadero, Alimentos Almacenados, Contra Lepidópteros.
BIODART™ ⁶	Polvo Humectable	Agricultura, Contra Lepidópteros.
CERTAN™™™ ³	Suspensión Conc.	Contra <i>Galleria mellonella</i> .
CONDOR™ ⁷	Polvo Humectable	Forestal, Contra Lepidópteros.
CUTLASS™ ⁷	Polvo Humectable	Sobre Vegetales, Contra Lepidópteros.
DELFIN™ ³	Microgránulos dispersables en agua	Agricultura, Jardinería, Forestal, Contra Lepidópteros.
DIPEL™ ¹	Polvo Humectable	Agricultura, Jardinería, Árboles, Plantas Ornamentales, Contra Lepidópteros.
DIPEL ES™ ¹	Suspensión Emul.	Protección de Cultivos, Contra Lepidópteros.
DIPEL 2X™ ¹	Polvo Humectable	Cultivos como Tabaco, Girasol, Cacahuete, Contra Lepidópteros.
DIPEL 4L™ ¹	Suspensión Emul.	Agricultura, Invernadero, Horticultura, Contra Lepidópteros.

TABLA 1. Continuación

PRODUCTO	FORMULACION	USO
DIPEL 6L ¹	Suspensión Emul	Agricultura, Horticultura, Forestal, Arboles y arbustos, Contra Lepidópteros.
DIPEL 6AF ¹	Acuosa Asperjable	Agricultura, Horticultura, Forestal, Arboles y arbustos, Contra Lepidópteros.
FUTURA ²	Polvo Humectable	Agricultura, Contra Lepidópteros.
FLORBAC ²	Polvo Humectable	Agricultura, Contra Lepidópteros.
FOIL ² Y ² ***7	Acuosa Asperjable	Agricultura, Contra Lepidópteros y Coleópteros.
JAVELIN ³	Polvo Humectable	Agricultura, Contra Lepidópteros.
M-ONE****8	Encapsulado en <i>Pseudomonas</i>	Protección de Cultivos, Forestal, Jardín, Contra Coleópteros.
M-ONE PLUS****8	Encapsulado en <i>Pseudomonas</i>	Protección de Cultivos, Forestal, Jardín, Contra Coleópteros.
MVP ⁵	Encapsulado en <i>Pseudomonas</i>	Agricultura, Contra Lepidópteros
NOVO BIOBIT 32B ⁶	Concentrado Asperjable	Agricultura, Forestal, Contra Lepidópteros.
NOVO BIOBIT 16K ⁶	Polvo Humectable	Agricultura, Forestal, Contra Lepidópteros.
NOVO FORAY ⁶	Concentrado Acuoso	Agricultura, Forestal, Campo de Golf.
NOVADOR****4	Asperjable Concentrado Acuoso	Agricultura, Contra Coleópteros.
SKEETAL****4	Asperjable Concentrado Acuoso	Salud Pública, Contra Mosquitos y Mosca Negra.
TEKNAR****3	Suspensión Acuosa Concentrada	Salud Pública, Contra Mosquitos y Mosca Negra.
TEKNAR G****3	Gránulos	Salud Pública, Contra Mosquitos y Mosca Negra.
TEKNAR HP-D****3	Suspensión Acuosa Concentrada	Salud Pública, Contra Mosquitos y Mosca Negra.
THURICIDE 32B ³	Concentrado Acuoso	Agricultura, Forestal, Contra Lepidópteros.
THURICIDE 32LB ³	Concentrado Acuoso	Forestal y Campo de Golf, Contra Lepidópteros.
THURICIDE HP ³	Polvo Humectable	Agricultura, Forestal, Campo de Golf, Arboles, Contra Lepidópteros.
THURICIDE SC ³	Concentrado Acuoso	Agricultura, Forestal, Campo de Golf, Arboles, Contra Lepidópteros.
THURICIDE 48 LV ³	Concentrado Acuoso	Forestal, Campo de Golf, Contra Lepidópteros.

TABLA 1. Continuación

PRODUCTO	FORMULACION	USO	
THURICIDE HPC ²	Concentrado Acuoso	Agricultura, Forestal, Campo de Golf, Alimentos Almacenados, Contra Lepidópteros.	
THURICIDE HP 1.5B ²	Polyo	Usado para Formular.	
TRIDENT ³	Concentrado Acuoso	Agricultura, Contra Coleópteros.	
VECTABAC AS ⁴	Suspensión Acuosa	Estanques, Ríos, Bosques, Pastizales, Contra Mosquitos.	
VECTOBAC 12 AS ⁴		Contra Mosquitos y Mosca Negra.	
VECTOBAC G ⁴	Gránulos	Estanques, Ríos, Bosques, Pastizales, Contra Mosquitos y Mosca Negra.	
* <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	1. Abbott	5. Ciba-Geigy	9. Compagnie di
** <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	2. Solvay/Duphar	6. ICI	Ricerca Chim.
*** <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	3. Zoccon/Sandoz	7. Ecogen	10. Bactec
**** <i>B. thuringiensis</i> var. <i>alzawai</i>	4. Novo	8. Mycogen	

3.- Avances Recientes en el Desarrollo de Productos a Base de *Bacillus thuringiensis*

Aunque *Bacillus thuringiensis* fue comercializado hace más de 40 años, su uso se ha incrementado significativamente en los últimos 10 años. Esto se debe, principalmente, a la demanda pública del uso de plaguicidas menos tóxicos para los consumidores, trabajadores, el medio ambiente y la creciente demanda de productos que sean efectivos en el control de insectos resistentes a insecticidas químicos. Simultáneamente con el aumento en la aceptación de insecticidas a base de *B. thuringiensis*, se han hecho esfuerzos para el mejoramiento de los rendimientos en los métodos de producción, formulaciones y la obtención de nuevas cepas capaces de atacar diversas plagas. A pesar de estos avances, los productos basados en *Bacillus thuringiensis* están restringidos a mercados de alto valor o ambientes sensibles como el mercado de vegetales frescos, control de vectores de enfermedades, etc. La falta de una adopción más extensa, es debida, en parte, a varias características biológicas inherentes a *B. thuringiensis* como: rango específico de hospederos, ineficiente contra blancos que se alimentan internamente en el vegetal o de las raíces, falta de actividad residual sobre el follaje debido a degradación por la luz solar y otros factores ambientales, falta de actividad residual en agua debido a una rápida sedimentación de las esporas y cristales, falta de actividad residual en el suelo debido a degradación por microorganismos del suelo. Estos rasgos contribuyen a las frecuentemente citadas

desventajas del uso de *B. thuringiensis*. Para penetrar a otros mercados, estos inconvenientes podrían ser eliminados a través de formulaciones mejoradas, nuevos métodos de aplicación o alterando la biología de *B. thuringiensis* a través del uso de ADN recombinante, microorganismos o plantas transgénicas que expresen la δ -endotoxina de *B. thuringiensis*. (Gelemtier y Schwab, 1993).

Genética Molecular

El incremento en las restricciones sobre el uso de los insecticidas químicos existentes en muchas naciones, los problemas de aparición de resistencia en las plagas y el incremento en costos para el desarrollo de nuevos productos sintéticos, estimularon a la industria agroquímica a desarrollar alternativas aceptables y viables, por lo que se centró la atención en *B. thuringiensis* (Frankenhuyzen, 1993). La emergencia de la tecnología de ADN recombinante y otras técnicas genéticas proporcionaron oportunidades sin precedente para manipular la toxicidad y/o la especificidad de las toxinas de *B. thuringiensis*. A inicio de los años 80's dos logros jugaron un papel catalítico en la expansión del conocimiento de la genética de *B. thuringiensis*, se demostró que los genes que codifican para las proteínas del cristal están localizados en plásmidos y que éstos son fácilmente intercambiados entre diferentes cepas. Este conocimiento proporcionó la posibilidad de construir cepas con un mayor espectro de actividad. La primera secuencia nucleotídica del gen que codifica para una δ -endotoxina fue publicada en 1985; para 1989, 42 secuencias nucleotídicas habían sido reportadas permitiendo la distinción de seis clases y 14 subclases de genes. Las clases son: CryI, específica para lepidópteros; CryII, para lepidópteros y dípteros; CryIII, para coleópteros; CryIV, para dípteros; CryV y CryVI, para nemátodos. La expansión del espectro de actividad insecticida de *B. thuringiensis* con el descubrimiento de cepas activas a dípteros y coleópteros y la disponibilidad de técnicas de clonación, manipulación y transferencia de genes, nos conducen a que las expectativas de obtener productos mejorados contra un amplio rango de especies de plagas podrían ser una realidad con un futuro previsible. En 1990, la compañía Americana Ecogen, registró varios productos basados en cepas nuevas construidas por ingeniería genética y biología molecular. Estos productos poseen una actividad mejorada contra especies específicas de insectos debido a la producción de cristales con diferentes toxinas: Condor[®] para el gusano del capullo del abeto rojo (*Choristoneura fumiferana*) y palomilla gitana (*Lymantria dispar*); Cutlass[®] para el control del gusano soldado de la remolacha (*Spodoptera exigua*) y otras plagas de vegetales o un espectro amplio de actividad

por combinación de genes que codifican para proteínas con diferentes especificidades(Foil[®]) para el control del barrenador Europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) y el escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*). La primera generación de productos de cepas manipuladas genéticamente podría servir como un escalafón para el registro de una segunda generación de productos basados sobre cepas con genes para toxinas mejoradas con técnicas de ADN recombinante (Frankenhuyzen, 1993).

Organismos Recombinantes

Como un medio para resolver la restricción de una inadecuada aplicación y la toxicidad residual limitada, se inició con la inserción de los genes que codifican para las toxinas de *B. thuringiensis* en otros microorganismos, los cuales se podrían asociar en el hábitat del insecto blanco. Con esta idea los organismos transformados podrían colonizar habitats que, normalmente, son inaccesibles a *B. thuringiensis* y de esta manera sintetizar cantidades suficientes de toxina para prevenir el daño por el insecto. Esta técnica se ha puesto en practica en *Pseudomonas cepacia* (Stock et. al, 1990) y *Pseudomonas fluorescens* (Obuskowicz et. al, 1986), *Rhizobium leguminosarum* (Skol et. al, 1990) y *Bradyrhizobium sp.* (Nambiar et. al, 1990). El principal obstáculo que tiene esta tecnología involucra la liberación de microorganismos vivos recombinantes al campo, esto ocasionó la aparición de numerosas restricciones, concemientes a la estabilidad de la característica introducida, como es la confinación de el gen insertado al organismo recipiente o como minimizar el potencial para transferir el gen a otras especies de bacterias. Un paso importante fue el registro de un microorganismo recombinante, que expresa una toxina de *B. thuringiensis*. Estas bacterias posteriormente se matan para proveer un sistema de liberación celular no viviente. Mycogen usó este principio para producir toxinas de *B. thuringiensis* en células de *P. fluorescens* llamado Cell-Cap[™] (Gaertner, 1990). Dos productos CellCap están en registro, uno para el control de la palomilla del dorso de diamante, *Plutella xylostella*, y otros lepidópteros, el otro para el control del escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Frankenhuyzen, 1993).

Plantas Transgénicas

Otra alternativa para atacar los problemas asociados a la liberación de toxinas, es el uso de plantas transgénicas que expresen la toxina de *B. thuringiensis*. En 1987 se obtuvo la primera planta transgénica transformando células de tabaco con el gen CryIAB de *B. thuringiensis* (Vaeck et. al, 1987) y tomate (Fischhoff et. al, 1987). Reportes recientes

extienden la lista de cultivos transformados con *B. thuringiensis*, algodón (Perlak *et. al*, 1990), papa (Leemans *et. al*, 1990), álamo (McCown *et. al*, 1991) y maíz (Fox, 1995) y esta lista continua creciendo. Se han realizado evaluaciones en campo y se ha demostrado protección del tabaco contra *Manduca sexta* y *H. virescens*. En tomate se obtuvo protección contra especies menos susceptibles como *H. zea*, pero contra *Keiferia lycopersicella* la protección no fue adecuada debido a los bajos niveles de expresión en la planta. La implementación de cultivos transgénicos en la producción agrícola, es un riesgo para la posibilidad del desarrollo de resistencia en las plagas, por lo que se están buscando estrategias para minimizar tal efecto (Frankenhuyzen, 1993).

Formulaciones

Bernhard y Utz, 1993 han predicho que para el año 2000, los productos biológicos pueden constituir mas del 5% del total del mercado para la protección de cultivos. Los productos para el control biológico han empezado a aparecer en el mercado y otros están en progreso para desarrollar productos adicionales, todos estos proyectos en lo subsiguiente necesitarán de tecnología de formulación novedosa. Desafortunadamente muchos asumen que la formulación de biológicos es simplemente mantener la viabilidad hasta su aplicación. El control biológico al igual que el químico, debe ser predecible y de efecto consistente. El principal objetivo de una formulación es asegurar una larga viabilidad en el ambiente, extender la vida de anaquel, y permanecer en condiciones ideales por un periodo de 2 años. Sin embargo el desarrollo de cepas efectivas es una barrera menor comparada con una formulación perfecta y el diseño de los métodos de aplicación más adecuados (Connick *et. al*, 1989; Rhodes *et. al*, 1990). Aunque los cultivos esporulados pueden ser usados directamente en el control de plagas, los extractos de *B. thuringiensis* son procesados para hacerlos más adecuados para su aplicación en campo. Con los productos comerciales de *B. thuringiensis*, los rangos de aplicación son de 0.5 Kg a 2 Kg por hectárea. Dependiendo del cultivo y modo de aplicación, en suelo o aplicación aérea, los volúmenes de aplicación varían entre 10 y 100 litros por hectárea. Las preparaciones concentradas de *B. thuringiensis* pueden ser polvos humectables, gránulos humectables, líquidos, emulsiones etc. las cuales se deben mezclar fácilmente con agua deben estar libres de grumos y homogéneas. El comportamiento de sedimentación y distribución sobre la superficie de la planta está fuertemente influenciada por el tamaño de partícula. Los tamaños de partícula encontrados en formulaciones de *B. thuringiensis* comerciales y experimentales van de 3µm a 25µm. La concentración de δ-

endotoxina en los productos comerciales está entre 0.3% y 1.7 %. (Bernhard y Utz, 1993; Pristakvo, 1965; Angus y Lüthy, 1971; Lambert y Peferoen, 1992). La corta o breve persistencia de los patógenos sobre el follaje es frecuentemente un factor limitante en el control de las poblaciones de insectos, especialmente cuando las larvas se alimenta por periodos de tiempo relativamente largos. Los aditivos típicos son: agentes surfactantes, que afectan las interacciones fisicoquímicas en las formulaciones, adherentes a superficies de hojas los que retardan el lavado por lluvia, formando una película protectora, espesantes que pueden reducir la evaporación y humectantes que retardan la desecación durante el asperjado. Algunas sustancias tienen más de una función (Salama y Morris, 1993). Varios materiales han sido probados en el laboratorio como adherentes y asperjantes, incluyendo harina de trigo, Triton[®] B-1956, una mezcla de gelatina y oleato, leche en polvo, metilcelulosa y varios agentes humectantes. En general estos materiales mejoran la actividad de los patógenos (Jaques y Fox, 1960). Otro factor que afecta la residualidad de *B. thuringiensis* es evitar el daño que le causan los rayos solares (UV), diferentes estudios revelan que la exposición por cortos periodos (< 24h) a longitudes de onda menores de 500 nm, inactiva esporas, puede inactivar la toxina cristalina de *B. thuringiensis* y degrada estructuras proteicas virales (Ignoffo y Batzer, 1971). Otros estudios revelan que la vida media de diferentes especies de entomopatógenos (bacterias, virus hongos y protozoarios) expuestos a la luz solar es menor de 4 horas. (Ignoffo et. al, 1977; Ignoffo y García, 1978). La vida media para *B. thuringiensis* se ha estimado en 3.8 h cuando se expone a una fuente de luz UV, representativa a la luz solar natural. Una variedad de respuestas al espectro UV se ha observado para *B. thuringiensis*, inactivación de las esporas a 330 nm (Griego y Spence, 1978), la causa de esta fotoinactivación a nivel de campo, se atribuye la generación de radicales peróxido debido a la fotooxidación de uno o mas de los aminoácidos. (Ignoffo y García, 1978). A 400-425 nm hay producción de compuestos de coproporfirina e inactivación del cristal después de 40 h de exposición a la radiación UV, causando una destrucción del 80% de los residuos de triptofano y 20% de los residuos de histidina, lo que supuestamente produce un cambio en la configuración tridimensional de la toxina y consecuentemente la pérdida de actividad tóxica (Harms et. al, 1986; Pozsgay et. al, 1987). Los estudios anteriores demuestran que aunque puede haber diferentes respuestas de esporas y cristales a la radiación solar, la exposición a cualquier longitud de onda menor a 500 nm puede inactivar a *B. thuringiensis* dependiendo del tiempo de exposición y niveles de intensidad. Por este

motivo el uso de diferentes aditivos para protegerlo de la energía UV de la luz solar, es una práctica común. Se han utilizado como fotoprotectores, materiales aromáticos como ac. úrico, lignosulfonato de sodio (Orzan[®]), Melaza en combinación con Orzan[®], oxibenzona, ac. paraminobenzoico, ac. fólico que absorben en la región UV de 280 a 310 nm (Shapiro, 1959), otros compuestos como leche peptonizada, extracto de levadura, quitina, y albúmina de huevo (Salama y Morris, 1993), algunos colorantes como, rojo congo, verde de malaquita, etc. así como carbón activado, en formulados para plagas agrícolas (Dunkle y Shasha, 1989). Liu *et. al.*, (1993) utilizó el pigmento melanina de estreptomicetos para proteger la actividad de *B. thuringiensis* var. *israelensis* para el control de mosquitos, con óptimos resultados. Además de los efectos de las condiciones climáticas y el comportamiento del insecto, hay algunos componentes de las plantas que pueden interactuar con la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* reduciendo su actividad insecticida. Se ha demostrado que los polifenoles especialmente los taninos, son componentes importantes de las plantas y reaccionan espontáneamente con proteínas inactivandolas (Lüthy *et. al.*, 1985). Levinson, en 1988 desarrolló un bioplaguicida a base de una mezcla de la toxina de *B. thuringiensis*, un compuesto que liga taninos, el cual puede ser una poliamida sintética, suero, gelatina, polietilenglicol, un borato o urea y un soporte que puede ser agua o un sólido como piedra pómez. El compuesto que liga taninos asegura la permanencia del insecticida sin desnaturalizarse por más tiempo sobre la planta. Recientemente se elaboraron diferentes formulaciones de plaguicidas y agentes de control biológico con tecnología de microcapsulación en diferentes matrices poliméricas. La microcapsulación es relativamente una nueva tecnología que se involucra con el empaque de líquidos, sólidos y gases en pequeños contenedores o cápsulas. Flinn y Nack (1967). El concepto de atrapar patógenos en una cápsula no es nuevo, Raun y Jackson en 1966, (Ignoffo 1971) utilizaron este método para formular insecticidas y mantener la viabilidad de las esporas de *Bacillus thuringiensis* en gránulos de talco, su eficacia fue confirmada tanto en laboratorio como en campo. Kase y Branton en 1983, utilizaron un método de liberación lenta usando una formulación a base de corcho comprimido para lograr una liberación sostenida en medios acuáticos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Lacey en 1984, desarrolló formulaciones con *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* de liberación lenta para medios acuáticos utilizando polipropileno como medio soporte, con *B. thuringiensis* la actividad insecticida declinó después de 3 semanas y con *B. sphaericus* un excelente control se prolongó durante 8 semanas. En 1988, Baker *et. al.*, describieron el uso de dextrán o celulosa derivatizada para

microcapsular a *B. thuringiensis*, el método se basa en la formación de esferas poliméricas por la adición del polímero mezclado con el entomopatógeno y alúmina a un solvente Inmiscible en agua, el cual se mantiene a temperatura de congelación, posteriormente las esferas se secan. En 1988, Dunkle y Shasha desarrollan encapsulados de *Bacillus thuringiensis* en matrices de almidón y evaluaron su actividad biológica contra larvas de *Ostrinia nubilalis* logrando un 100% de mortalidad con todas las concentraciones probadas. En 1989, Dunkle y Shasha adicionaron a estos encapsulados protectores de luz UV, encontraron que cuando se utiliza rojo congo o ácido fólico en las formulaciones se obtiene una estabilidad de 12 días conservando el 50% de la actividad original. Bohm y Friend, en 1988 utilizaron un polímero llamado Eudragit[®] para elaborar microcápsulas, las cuales son suaves y digestibles, se les puede incorporar protectores para la luz solar como verde de malaquita y pueden elaborarse con baculovirus o *Bacillus thuringiensis* como agentes insecticidas. Otro factor que afecta la eficacia de *B. thuringiensis* es la variabilidad de los resultados comparados con los obtenidos para insecticidas sintéticos. Las investigaciones sugieren que las larvas de lepidópteros, paran su alimentación sobre el follaje tratado, antes de recibir una dosis letal de *B. thuringiensis* (Aranson *et. al*, 1986; Rombach *et. al*, 1989; Dulmage y Martinez, 1973; Hough-Goldstein *et. al*, 1991). Otros estudios sugieren que un incremento en la aceptabilidad de *B. thuringiensis* puede reducir la variabilidad y mejorar el nivel de control de las plagas blanco. La aceptabilidad puede ser mejorada mediante la formulación con la adición de ingredientes. Para incrementar el consumo de bioinsecticida por parte del insecto, se adicionan feromonas (atrayentes sexuales) (McGuire y Shasha, 1992) o fagoestimulantes, el más comercializado es el Coax[®] (CCT, Litchfield Park, Ariz.), ya que además de cumplir como atrayente alimenticio, muestra cierto efecto protector contra los rayos UV, (Moffat, 1991; Bartelt *et. al*, 1990; McGuire *et. al*, 1990; McGuire *et. al*, 1994; Gillespie *et. al*, 1994). Otro fagoestimulante comercial es el Entice[®] (Fermone Chemical, Houston), que funciona mejor como fagoestimulante que el Coax[®] para el caso de *Leptinotarsa decemlineata*. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en forma libre, pierde su efectividad cuando se utiliza en aguas contaminadas debido a degradación física y química de la toxina y pérdida del contacto potencial con el insecto blanco debido a su rápida sedimentación, Margalit *et. al*, 1984, probaron a *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14 microcapsulado en polietileno, logrando incrementar fuertemente su eficacia y persistencia contra *Aedes aegypti*. Zomer *et. al*, en

1989 describieron la microcapsulación de la toxina de *B. thuringiensis* en un material resinoso polimérico, permeable a las enzimas digestivas del insecto, de esta forma se mejoró la estabilidad de la toxina y es posible adcionar aditivos y feromonas para incrementar la probabilidad de que el insecto ingiera la toxina. Fravel *et. al*, 1985, hicieron estudios con una mezcla de alginato-Pyrax[®] con los cuales se atraparon diferentes agentes de biocontrol junto con otros potenciadores o protectores. DeLucca, 1990 utilizó alginatos bacterianos en formulaciones de biocontrol. Una de las formulaciones granulares que se usa en grandes extensiones de cultivos de gramíneas y pastos, es en la que se utiliza como matriz, almidón de maíz en estado pregelatinizado en forma granular (Dunkle y Shasha, 1988; McGuire *et. al*, 1990; McGuire, 1991). La desventaja que tiene este tipo de matrices se debe a su forma (como panal de abeja), peso y volumen; fácilmente se precipitan al suelo durante su aplicación, por lo que sólo es recomendado para los cultivos antes mencionados, los cuales por tener la forma enrollada de emergencia de la hoja permiten que el gránulo quede retenido, precisamente en ese sitio es donde se establecen las plagas a controlar. Se han elaborado formulados microcapsulados con (Mira-sperse) como matriz y sacarosa en la misma proporción (6% de sólidos totales), los cuales se emplean en cultivos de otro tipo y se aplican en forma líquida, por aspersión (McGuire y Shasha, 1990); de esta forma se logró una residualidad de 2 semanas, contra 2-4 días cuando se microcapsularon. Gelemter y Zehnder en 1989, utilizaron microorganismos transformados con la toxina de *B. thuringiensis* y desarrollaron dos productos basados en el sistema M-Cap[®], que consiste en transferir el gen responsable de la producción de la δ -endotoxina a *Pseudomonas fluorescens*. Al final de la fase de crecimiento las células de *Pseudomonas* se inactivan con calor y un tratamiento químico, de esta forma la pared celular sirve como una microcápsula protectora que encierra la toxina de *Bacillus thuringiensis*. Los dos productos M-Cap[®] son MVP[®] que posee la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y M-One[®] que posee la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *san diego*. Debido a que las formulaciones granulares solo representan el 10% de los plaguicidas en el mercado y el remanente pertenece principalmente a las formulaciones asperjables, McGuire y Shasha en 1990, desarrollaron formulaciones de *Bacillus thuringiensis* asperjables y con características adherentes, para ello utilizaron diferentes tipos de almidón de maíz pregelatinizado y adyuvantes, logrando formar una película con el plaguicida encapsulado sobre la superficie de la hoja. Esta película puede

durar de 1 a 21 días en condiciones de invernadero dependiendo del tipo de almidón pregelatinizado y de los otros componentes utilizados. En 1991, Shasha y McGuire utilizaron matrices de almidón para desarrollar formulados de liberación lenta de plaguicidas.

4.- Ecología y Valoración de Riesgos

Una limitante en la velocidad de progreso en la introducción de agentes microbianos potencialmente benéficos en la agricultura es la falta relativa en cuanto al conocimiento de su ecología y mas generalmente de su destino y efecto a los organismos no blanco, cuando se aplica en campo. El modo de aplicación, la persistencia de los microorganismos introducidos, la velocidad reproductora, su velocidad de transferencia de genes con los organismos indígenas su movimiento del sitio de aplicación y los efectos sobre el balance y funcionamiento en el ecosistema expuesto son de primera importancia y deben ser valorados antes de considerar una liberación. En el caso de *B. thuringiensis* está bien documentado el débil impacto adverso al ambiente, un entendimiento de su ecología podría ayudarnos a la predicción del impacto ambiental de la aplicación de nuevas cepas de *B. thuringiensis* o de cepas recombinantes y nos daría un criterio para valorar el riesgo de introducir otros microorganismos. Si *B. thuringiensis* se aplica en un rango de 30 billones de UI por hectárea y posee aproximadamente $3-6 \times 10^4$ esporas viables por UI, el número de esporas liberados al ambiente durante las aplicaciones, representa una liberación de aproximadamente 10^{16} esporas viables por hectárea. El impacto de una cepa silvestre y recombinante sobre el ambiente, depende parcialmente de su habilidad para sobrevivir y permanecer potente en el ecosistema. *B. thuringiensis* es sensible a los rayos UV del sol aunque las esporas y cristales puedan ser desactivados a diferentes velocidades, la vida media de las esporas de *B. thuringiensis* aplicadas al follaje es de pocos días. Sin embargo en el suelo las esporas son protegidas de la luz UV y aunque *B. thuringiensis* es incapaz de germinar y crecer en la mayoría de los suelos una proporción de esporas puede persistir y permanecer viable por algún tiempo (Entwistle *et. al*, 1993; Pruett *et. al*, 1980). Se han hecho algunos estudios para ver la posibilidad de crecimiento de *B. thuringiensis* en el ambiente, fuera del insecto, los resultados indican que muy poca multiplicación se lleva a cabo en suelos naturales, a menos que exista un incremento en los nutrientes disponibles. En contraste, dependiendo de la cepa y del insecto hospedero, *B. thuringiensis* es capaz de crecer bien en los cadáveres de insectos (Meadows, 1993). Un importante factor que posiblemente pueda influenciar en el impacto ambiental es el movimiento de un organismo fuera del sitio de aplicación. *B. thuringiensis* raramente se esparce por epizotias ya sea naturalmente o cuando se aplica

como insecticida. Estudios de laboratorio demuestran que la extensión infecciosa de *B. thuringiensis* ocurre solo cuando hay una alta densidad de las poblaciones del insecto susceptible y condiciones favorables para la sobrevivencia de las esporas por un largo periodo de tiempo (Burges y Hurst, 1977). Aunque los estudios de persistencia de *B. thuringiensis* en el campo después de la aplicación se han investigado, son muy limitados los estudios de su dispersión. La explotación de la diversidad natural biológica y el uso de tecnología de ADN recombinante son una gran promesa para el control de plagas, pero solo si es soportada por investigación sobre los posibles riesgos ambientales. (Meadows, 1993).

5.- Desarrollo de Resistencia hacia *Bacillus thuringiensis*

Los insectos han mostrado una gran habilidad para desarrollar resistencia a los insecticidas químicos. Más de 500 especies de insectos han desarrollado resistencia contra al menos, algún tipo de insecticida químico conocido. Durante los pasados 30 años de uso de *B. thuringiensis* como insecticida, ha habido pocos casos documentados de desarrollo de resistencia hacia los productos de *B. thuringiensis* en uso actual. Un gran número de compañías y universidades han iniciado programas de investigación para manipular los genes que codifican para la toxina de *B. thuringiensis* con el objetivo de producir insecticidas mejorados. Algunos de estos productos microbianos, son plantas o microorganismos manipuladas por ingeniería genética que contienen ciertos genes para proteínas de *B. thuringiensis*, estos productos basados en tecnología de ADN recombinante tienen como objetivo mejorar la eficacia y persistencia de *B. thuringiensis*, lo que conduciría a un amplio uso de productos basados en *B. thuringiensis* y el desarrollo de resistencia sería uno de los puntos en controversia para la implementación de esta nueva biotecnología (Marrone y Macintosh, 1993). La palomilla India de la harina (*Plodia interpunctella*) fue el primer insecto con resistencia a *B. thuringiensis* documentada, en 1979 Kinsinger y McGaughey reportaron una diferencia de 42 veces en susceptibilidad a Dipel[®] (*B. thuringiensis* var *kurstaki*) entre cepas de laboratorio y campo. En estudios subsecuentes con una colonia derivada de campo y mantenida en laboratorio se observó un decremento en la susceptibilidad a Dipel[®] de 27 veces después de dos generaciones y de 97 veces después de 15 generaciones. Posteriormente reportó resistencia en la palomilla del dorso de diamante negro (*Plutella xylostella*), la cual fue asociada con reducción de los sitios de unión a las proteínas de *B. thuringiensis* en los receptores del intestino medio del insecto (Tabashnik et. al, 1994).

McGaughey y Beeman, 1988, reportaron desarrollo de resistencia a diferentes velocidades, en 5 colonias de palomilla india de la harina. La mayor resistencia que se obtuvo fue de 250 veces en la generación F36 y la más baja fue de 15 veces en la generación F39. El mecanismo por el cual un insecto desarrolla resistencia a una toxina en particular está ligado indudablemente al modo de acción de la toxina. El mecanismo de resistencia hacia el Dipel[®] por *P. xylostella* puede ser explicado por una completa pérdida de unión de la proteína CryIA(b) en el intestino medio. Sin embargo la unión a las proteínas CryIB y CryIC, las cuales no están presentes en Dipel[®], fueron similares en insectos susceptibles y resistentes. Experimentos de competencia heteróloga indican que la palomilla del dorso de diamante negro tiene tres distintos sitios de unión de alta afinidad (CryIA(b), CryIB y CryIC) (Marrone y Macintosh, 1993).

6.- Aspectos Básicos Sobre Formulaciones

Los plaguicidas generalmente son aplicados a concentraciones mayores de las necesarias para controlar una plaga determinada, debido a que rápidamente pueden perder su actividad en el campo, los factores que impactan en la eficacia de las formulaciones microbianas son las lluvias, luz solar, temperatura, antimicrobiosis de el follaje hospedero y una inadecuada aplicación. Este exceso no sólo afecta el costo de aplicación, sino también deriva en un daño al medio ambiente. Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta para la eficiencia en el campo de los insecticidas microbianos, es su formulación. El objetivo de una formulación es proveer la combinación correcta de ingredientes de tal manera que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto estable, seguro, efectivo, fácil de aplicar y aceptable para su uso. En toda formulación independiente de su uso final, se distinguen tres clases de componentes:

- 1.- La materia o principio activo responsable de la actividad insecticida.
- 2.- Disolventes o diluyentes que actúan como vehículos de la materia activa, sean sólidos o líquidos. Estos materiales son inertes frente a los patógenos.
- 3.- Los coadyuvantes igualmente inertes que ayudan al principio activo en el cumplimiento de su cometido, aumentan su persistencia en el medio ambiente o mejoran su propia acción (Angus, 1974; Barbera, 1976; Sawicka y Couch, 1983).

Varios criterios adicionales, además de la toxicidad contra el insecto blanco y precio competitivo, deberá satisfacer un insecticida microbiano para ser comercialmente disponible y aplicable en el campo:

- Estabilidad biológica: Se debe tomar en cuenta la compatibilidad del ingrediente activo con los ingredientes del formulado para prevenir biodegradación, interferencia en el proceso de infección y efectos sobre la viabilidad del microorganismo patógeno.

- Cobertura y adherencia: Cuando un formulado se aplica, el producto debe ser asperjado uniforme y rápidamente para permanecer por un periodo de tiempo razonable en el área de tratamiento.

Las investigaciones en este campo se han enfocado al desarrollo de productos con alta potencia y mejoramiento de la persistencia, esto incluye naturalmente el uso de cepas modificadas por técnicas de Ingeniería Genética. Los laboratorios Abbott proponen efectuar investigación en 6 áreas, principalmente en cuanto a la formulación de insecticidas microbianos se refiere.

1.- Desarrollo de formulaciones en polvo y líquidas con mejor estabilidad física y biológica bajo condiciones razonables de almacenamiento.

2.- Uso de aditivos para reducir la evaporación.

3.- Desarrollo de métodos para incrementar la cobertura, adherencia y distribución del formulado sobre el follaje.

4.- Mejorar la dispersión y suspensibilidad del microorganismo patógeno en los tanques de aplicación.

5.- incremento de la resistencia al ambiente (lluvia, luz, viento, antimicrobiosis).

6.- Reducción de la pérdida de formulado, exponiendo al candidato a formular a una variedad de sistemas de aplicación usando procedimientos de calibración controlada para establecer las condiciones bajo las cuales el material debe ser aplicado de acuerdo a las diferentes regiones geográficas (Couch, 1978).

Tipos De Formulados

Un insecticida puede introducirse en el mercado en varias formas, dependiendo del ambiente del insecto que va a ser controlado y/o el método de aplicación preferido.

Polvos para espolvoreo:

Estos formulados se aplican directamente sobre las plantas con la maquinaria adecuada. La materia activa se encuentra dispersada en un vehículo inerte sólido y si es

preciso se añaden al mismo agentes de fluidez, y estabilizantes. Las concentraciones en materia activa de tales productos son generalmente bajas (del 1 al 20%). Los diluyentes empleados en este tipo de formulados son polvos finos, los talcos de silicatos son los más comúnmente usados, otros diluyentes de naturaleza botánica, también son utilizados como olote de maíz, tierra de diatomeas, piedra caliza, etc. (Barbera, 1976).

Formulaciones granuladas:

Este grupo de formulaciones sólidas se aplica directamente a las plantas o al suelo. Son verdaderos gránulos cuyo aspecto es de arenilla con tamaños de partícula que oscilan de 0.2 mm a 1.5 mm., contienen de un 5-20% de principio activo, 80-95% de soporte y 1-5% de adherente. La materia inerte que sirve de soporte a tales gránulos es un producto ya preformado, como vermiculita, kaolinita, attapulguita, etc. capaces de absorber o de recubrirse con el plaguicida. Esta clase de plaguicida se emplea mucho en el tratamiento de insectos, los cuales pasan gran parte de su ciclo de vida en el suelo como *L. decemlineata*, *Popillia japonica*, termitas, hormigas, tijeretas, quilópodos, etc., así como en malas hierbas. (Balaranan y Hoti, 1988; Barbera, 1976).

Polvos Humectables:

Esta clase de formulados se presentan en forma de un polvo capaz de ser mojado y mantenerse en suspensión en agua durante un tiempo más o menos largo. El principio activo (generalmente insoluble o muy poco soluble), está dispersado en una materia inerte, a la formulación se le añaden coadyuvantes tales como humectantes, agentes de suspensión, adherentes y estabilizantes, estos coadyuvantes están destinados a conseguir la mejor eficiencia del producto una vez aplicado. Una característica muy importante de los polvos humectables es la capacidad de mantener las partículas de polvos en suspensión en el agua durante el mayor tiempo posible, sin depositarse al fondo. (Barbera, 1976).

Líquidos emulsionables:

Las emulsiones constan de la materia activa disuelta en un medio apropiado, al que acompañan los coadyuvantes necesarios (emulsionantes, dispersantes, etc.). En estos productos su dilución en agua produce emulsiones, formadas por finas gotitas de la formulación dispersas en el agua. Toda emulsión forma un sistema inestable constituido por dos fases; el agua o fase dispersante y el líquido emulsionable o fase dispersa, ambas fases tienen tendencia a separarse en un tiempo más o menos largo y este tiempo es una medida de la estabilidad de la emulsión, la cual debe estar comprendida dentro de ciertos límites que varían según las aplicaciones y el principio activo. Las emulsiones contienen de 10-45% de

ingrediente activo, 1-3% de agentes de suspensión, 3-8% de surfactante, 1-5% de dispersante y 35-65% de vehículo agua o aceite (Aly *et. al*, 1987; Barbera, 1976; Smimoff y Hutchison, 1965).

Sistemas de Liberación Controlada

Desde 1976 varias publicaciones se han hecho sobre tecnología de liberación controlada y generalmente reportan su utilización en aplicaciones farmacéuticas o agrícolas, los mas recientes se concentran sobre formulaciones con feromonas, atrayentes y modificadores químicos del comportamiento como ingredientes activos. Los métodos de formulación para liberación controlada de agentes de protección para agricultura se han dividido tradicionalmente en métodos químicos y físicos. Sin embargo la desventaja de los agentes químicos de unión es el alto costo de registro. Los métodos físicos como microcapsulacion, laminados, matrices, inclusiones son mas comunes. La principal ventaja de las fomulaciones de liberación controlada es que ellas poseen menos ingrediente activo (plaguicida), que puede ser usado por el mismo periodo de tiempo. Tabla 1 y 2. (Quisumbing y Kydonieus, 1990).

Tabla 2
Beneficios De Los Sistemas De Liberación Controlada

-
- Incremento de la estabilidad
 - Mejora la seguridad en el manejo
 - Reduce la contaminación de alimentos
 - Prolonga la actividad residual
 - Menores rangos de aplicación en potencia
 - Reduce la pérdida de actividad por factores ambientales (volatilización, lavado, descomposición química o biológica)
 - Reducción de la contaminación ambiental
 - Reducción de olores
-

Tabla 3

Categorías En Sistemas De Liberación Controlada

-
-
- *Sistemas de Reservorio con un rango de control de membrana*
 - 1.- *Microcapsulación*
 - 2.- *Macrocapsulación*
 - *Sistemas de Reservorio sin un rango de control de membrana*
 - 1.- *Fibras huecas*
 - 2.- *Substratos Porosos Poliméricos y Espumas*
 - *Sistemas Monolíticos*
 - 1.- *No desgastable*
 - 2.- *Desgastable*
 - 3.- *Degradable*
 - *Estructuras Laminadas*
-

7.- Soportes Usados en las Formulaciones

Se consideran polímeros biodegradables a las macromoléculas que muestran apreciable descomposición en un medio biológicamente activo. La ventaja de utilizar polímeros biodegradables para su uso como agentes de formulación, es que los residuos del polímero no permanecen en el ambiente por mucho tiempo, y se asegura la liberación del bioinsecticida al ambiente. Los principales tipos de polímeros utilizados para elaborar formulaciones biodegradables incluyen: almidón y amilosa, derivados de celulosa, quitina, quitosán, ac. algínico, carragenanos, gomas, dextran, agar, agarosa, proteínas como caseína, albúmina, queratina, gelatina, colágeno, fibrinógeno, desechos de cuero, ligninas y lignocelulosa, ac. húmicos, ceras, corchos, taninos, polihidroxibutirato, polihidroxivalerato, poliacetato, pliaminas, poliacrilamida, alcohol polivinílico, polilactato (Wilkins R.M. 1990).

Gelatina: es una proteína, producto de la disociación térmica de las moléculas de colágeno. Las gelatinas poseen pesos moleculares del orden de 100,000. El gel es termorreversible, es decir funde al calentarlo (arriba de 40°C) y solidifica nuevamente al enfriarse. La gelatina se ha utilizado para la microcapsulación de metilisocianato para el control de hongos de la madera.(Zahora y Corden, 1985).

Pectina: heteropolisacárido, coloide hidrofílico reversible que posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, son grandes cadenas de ac. poligalacturónico, con los grupos carboxilo parcialmente esterificados con alcohol metílico. Las uniones entre las unidades de ac. galacturónico son 1-4. El peso molecular varía de 20,000 y más de 400,000. Las pectinas derivadas de distintas fuentes varían en sus propiedades gelificantes debido a diferentes longitudes de sus cadenas de ac. galacturónico y al distinto grado de esterificación con metanol de su carboxilo.

Alginato de Sodio: Es la sal sódica del ac. alginico, extraído de *Macrocystis pyrifera*. No es un heteropolisacárido sino una mezcla de dos polímeros prácticamente homogéneos: Ac. poli β -D-manurónico y Ac. poli α -L- gularónico. Características como formación de gel, densidad, suspensibilidad y formación de películas hacen a las soluciones de alginato ideales para aplicaciones en alimentos, farmacéuticas, cosméticas, agricultura e industria. Como adyuvante para formulaciones asperjables de pesticidas, el alginato funciona como agente de suspensión. Se ha encontrado que las formulaciones granulares basadas en alginato son compatibles con una amplia variedad de agentes de biocontrol (Connik, 1988). Además de ser biodegradables estas formulaciones pueden prepararse fácilmente, son estables y se pueden utilizar con el equipo convencional de agricultura. Walker y Connick, 1983, reportan el uso de alginato de sodio para preparar formulaciones de 5 hongos usados como micoherbicidas (*Alternaria cassiae*, *Alternaria macrospora*, *Fusarium lateritium*, *Colletotrichum malvarum*, *Phyllosticta* sp.) los cuales permanecieron viables e infectivos durante 6 a 8 meses. En el mismo año 1984, Lewis y et. al utilizaron partículas de alginato con *Trichoderma* sp. o *Gliocladium* sp. para adicionarlos al suelo e incrementar la población antagonista y reducir la población de *Rhizoctonia solani*, logrando prevenir completamente el crecimiento de *R. solani* en semillas de betabel infestadas. En 1985, Kaya y Nelsen utilizaron Alginato de Calcio para atrapar nemátodos entomopatógenos, sin embargo, el alginato no provee las condiciones adecuadas de humedad para la viabilidad de los nemátodos. Fravel et. al, en 1985, desarrollaron encapsulados en una matriz de alginato de sodio y talco de diferentes agentes de biocontrol (conidias de *Talaromyces flavus*, *Gliocladium virens*, *Penicillium oxalicum* o *Trichoderma viridae* y células de *Pseudomonas cepacia*), encontrando que todos los hongos fueron viables después de la formación de las partículas de alginato de calcio y la población declinó de 10 a 100 veces, después de 4 semanas y *Pseudomonas cepacia* perdió su viabilidad. En 1986, Bashan reportó el uso de encapsulados de alginato de sodio y leche en

polvo descremada como una forma de inocular bacterias benéficas (*Azospirillum brasilense*) a la rizósfera de plantas, los cuales liberan estas bacterias en forma lenta y continua. Axtell y Guzman en 1987, usó Alginato de Calcio para microcapsular un hongo patógeno al mosquito *Legenidium giganteum* el cual permaneció infectivo después del almacenamiento a 15°C durante 75 días y se obtuvo un 90% de infección larvaria durante 25 días después de su aplicación al agua.

Quitina: es un polisacárido importante que constituye la parte estructural fundamental de los invertebrados marinos, insectos y hongos. Químicamente es un polisacárido lineal de β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina lineal. La unión glucosídica es β -1-4 (Berk, 1980). La quitina posee una inusual combinación de propiedades como: dureza, bioactividad y biodegradabilidad. Las investigaciones en cuanto a aplicación se han enfocado principalmente hacia el quitosan debido a que posee grupos amino libres, que le proporcionan propiedades policatiónicas, quelantes y formadoras de películas. Debido a las propiedades de unión de la quitina se ha investigado la posibilidad de utilizarse como acarreador de aditivos alimenticios como colorantes, como quelante de metales, para la recuperación de proteínas de procesos de deshecho alimenticios, como promotor del crecimiento de bifidobacterias etc. (Connick, 1988; Pääkkönen Plit, 1991).

8.- Insecto Blanco

Trichoplusia ni es uno de los insectos lepidópteros blanco más sensibles a la δ - endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, además de ser una de las plagas más devastadoras, ya que ataca a 22 diferentes cultivos.

Plantas atacadas: col, lechuga, espinaca, betabel, chícharo, apio, perejil, papa, jitomate, algodón, cántamo, chile, ajonjolí, clavel, fresa, melón, soya, tabaco, berro, pepino, brócoli y sandía.

Distribución: Desde Canadá hasta México.

Ciclo de vida, apariencia y daños que ocasiona: "El gusano falso medidor de la col" en estado larvario tiene un cuerpo adelgazado hacia la cabeza de color verde claro, casi transparente y bandas delgadas longitudinales de color blanco, cerca de la cabeza presenta tres pares de patas y después de la mitad del cuerpo tiene tres pares de falsas patas más anchas, la parte media de éste carece de ellas y generalmente esta región se encuentra jorobada cuando descansa o se mueve. Las larvas son voraces y cuando pequeñas perforan las hojas

devorando posteriormente todo el follaje excepto las nervaduras, acabando en ocasiones con la plantación entera. Al alcanzar su máximo desarrollo (3.5 cm) pupan en un cocón color caoba envuelto con hilos blancos entretreídos sujetos de una nervadura o rama.

En estado adulto son palomillas nocturnas de color café jaspeado con una mancha blanco-plateada en forma de gama en las alas anteriores, depositan de 275 a 350 huevecillos redondos de color blanco verdoso en forma aislada en el envés de las hojas.(Galán Wong, 1993).

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales para la Formulación:

Gelatina bovina, pectina de limón y almidón de maíz en polvo fueron obtenidas de una tienda de materias primas local (Materias Primas Arreola). Quitina en hojuelas y alginato de sodio, de Sigma Chem. Co. (St. Louis, Mo.).

Propagación de *Bacillus thuringiensis*:

B. thuringiensis var. *aizawai* cepa GM-7 fue propagada, en un bioreactor New Brunswick Sc. Co. de 14 litros de capacidad con 7 litros de medio a base de melaza. Los parámetros de fermentación usados fueron 30°C, pH 7, 1% de inóculo , 1 vvm de aereación y 500 rpm de agitación (Galán Wong 1993). El extracto fue obtenido usando el método de lactosa-acetona de (Dulmage 1970). El extracto resultante contiene 10^7 UFC/mg de *B. thuringiensis* . El medio de fermentación utilizado fue el siguiente: Melazas 20g/l, Harina de Soya 20g/l, Líquido de Remojo de Maiz 10g/l, Carbonato de Calcio 1g/l, pH del medio de cultivo 7.

Insecto:

Se utilizaron larvas neonatas y del 2° instar de *Trichoplusia ni*, obtenidas de una colonia del laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo F.C.B. U.A.N.L.

Procedimiento de Formulación:

En un trabajo preliminar, se hicieron 10 diferentes formulados con gelatina y pectina, utilizando 5 diferentes solventes (agua, isopropanol, butanol, acetona y metanol) para inducir la gelatinización; 2 formulados más con gelatina usando albúmina y leche en polvo como adherentes y agua para inducir la gelatinización; 2 formulados con almidón pregelatinizado usando isopropanol o metanol como solventes; 2 diferentes formulados con quitina y 2 con quitina coloidal usando glutaraldehído o polietilenimina como reactivos para obtener una copolimerización con el soporte y 4 diferentes formulados con alginato utilizando talco, almidón, albumina y leche en polvo para dar volumen al formulado. De los 22 formulados, en base a una prueba de adherencia a portaobjetos como se describe mas adelante, se seleccionaron los siguientes formulados:

Gránulos Formulados con Gelatina (GL). Cuarenta y nueve gramos de gelatina fueron mezclados en un recipiente con 0.5 gramos de leche en polvo y 0.5 gramos de extracto de *Bacillus thuringiensis*. Se tamizó para homogenizar, se adicionaron 20 ml de agua a 40°C a la mezcla. Esta se dejó a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente se cortó con tijeras en pedazos más pequeños, se dejó secar durante toda la noche en una campana de flujo laminar marca Labconco. Finalmente la mezcla seca se molió usando un molino de discos manual y se tamizó usando una malla # 10.

Gránulos Formulados con Gelatina:Isopropanol (GI). Cuarenta y nueve punto cinco gramos de gelatina y 0.5 g de extracto de *Bacillus thuringiensis* fueron mezclados como se describió anteriormente, se adicionaron 20 ml de una solución agua-Isopropanol en proporción 7:3. La mezcla se dejó secar durante 2 h a temperatura ambiente y se manejó como se describe arriba.

Gránulos Formulados con Pectina:Agua (Po). 49.5 g de pectina y 0.5 g de extracto de *Bacillus thuringiensis* fueron tamizados para homogenizar y posteriormente mezclados perfectamente con 50 ml de agua a 40°C. El producto se dejó secar a temperatura ambiente por 2 h, posteriormente se tamizó usando una malla # 20, se dejó secar durante toda la noche en una campana de flujo laminar.

Gránulos Formulados con Pectina:Isopropanol (PI) o Pectina:Butanol (Pb). Se mezclaron 49.5 g de pectina con 0.5g de extracto de *Bacillus thuringiensis*, se tamizó para homogenizar y se agregaron 50 ml de una solución agua - isopropanol o agua - butanol en

proporción 7:3. La mezcla se manejó como se describió anteriormente para el formulado de pectina:agua.

Gránulos Formulados con Almidón de Maíz (Al). Almidón de maíz (Maizena) fue pregelatinizado por el método descrito por Dunkle y Shasha (1988). Posteriormente se mezclaron 49.5 g de almidón pregelatinizado y 0.5 g de extracto de *Bacillus thuringiensis*, se tamizó para homogenizar y se agregaron 20 ml de una solución agua : Isopropanol en proporción 7:3. El producto se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 h, se molió en un molino de discos manual y se tamizó usando una malla # 20 se dejó secar toda la noche en una campana de flujo laminar (Mc Guire & Shasha 1992).

Gránulos Formulados con Alginato (ATL). Se mezclaron : cinco gramos de alginato, 35 g de Talco (Galo Lab. Monterrey N.L. Mex.), 9.5 g de leche en polvo (Nan de Nestlé) y 0.5 g de extracto de *Bacillus thuringiensis*, se tamizó para homogenizar y se adicionaron a 500 ml de agua (80°C). Posteriormente esta mezcla fue transferida a un recipiente con 500 ml de una solución fría (4°C) de cloruro de calcio 0.05 M. La mezcla se mantuvo en esta solución a temperatura ambiente durante una hora para obtener un gel, el cloruro de calcio se eliminó por filtración y el gel fue lavado con 1 litro de agua destilada y cortado utilizando una espátula, se dejó secar durante toda la noche en una campana de flujo laminar, posteriormente se molió usando un mortero y se tamizó con una malla # 20 (Fravel 1985, Bashan 1986, Elçin 1995).

Gránulos Formulados con Quitina (Qcg) . Primero se preparó quitina coloidal por el método descrito por Chen *et. al*, (1983). La quitina coloidal obtenida fue lavada con agua destilada hasta obtener un pH 7 en el agua de lavado, se drenó y se agregó a 500 ml de una solución de glutaraldehído al 1%, se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. El glutaraldehído fue eliminado por filtración y la quitina coloidal activada fue lavada con agua destilada hasta eliminar el glutaraldehído, se drenó y se mezcló con extracto de *B. thuringiensis* al 1% p/p. Se mezcló y se dejó secar en una campana de flujo laminar durante toda la noche. La mezcla se molió en un mortero y se tamizó usando una malla # 20.

De todos los formulados se prepararon los blancos respectivos sin extracto de *B. thuringiensis*.

Sobrevivencia de *B. thuringiensis* en los Formulados Granulares.

Se tomaron muestras de 100 mg de cada formulación y *B. thuringiensis* fue liberado de la matriz polimérica utilizando enzimas. Las enzimas usadas fueron: Para los formulados de pectina, 10 ml de una solución de 1mg/ml de pectinasa a pH4 (Sigma Chem. Co.); para el formulado de quitina, 10 ml de una solución de 1mg/ml de quitinasa a pH6 (Sigma Chem. Co.); para el formulado de almidón, 10 ml de una solución de 1mg/ml de amilasa a pH 6.9 (Sigma Chem. Co.), se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente; para los formulados de gelatina, se utilizaron 10 ml de agua a 40 °C pH7 durante 30 min; para el formulado de alginato, se utilizaron 10ml de una solución de fosfato de potasio 0.1M pH7 durante 1 hora. Las suspensiones fueron diluidas (10^{-1} a 10^{-6}) con solución salina estéril y se transfirió 0.1 ml a cajas de petri con agar nutritivo, cada muestra fue sembrada por triplicado. Simultáneamente 100 mg de extracto puro de *B. thuringiensis* GM-7, fue mezclado con 10 ml de solución salina estéril y la suspensión fue diluida (10^{-1} a 10^{-6}), se transfirió 0.1 ml a cajas de petri con agar nutritivo. Cada muestra fue incubada a 30°C por 24 h, después de este tiempo las unidades formadoras de colonia (U.F.C.) fueron contadas.

Bioensayo de Mortalidad con Incorporación de los Formulados a la Dieta del Insecto Blanco.

Para comprobar si la toxicidad de *B. thuringiensis* no fue afectada por el proceso de formulación, se realizaron bioensayos de mortalidad usando una dieta artificial para *Trichoplusia ni*. Muestras de cada formulado fueron tratadas como se describe en el punto anterior para liberar a *B. thuringiensis* de la matriz polimérica y se incorporaron a la dieta artificial a concentraciones equivalentes a 50 y 500 µg/ml posteriormente la mezcla formulado-dieta se dispersó en copas (25 copas para cada dosis). Después de que la dieta se enfrió, se transfirió una larva neonata de *Trichoplusia ni* en cada copa y posteriormente se tapó, las 25 copas se depositaron en una bolsa de papel y se selló, posteriormente se incubó a 30°C y 80% de H.R.. Un total de 75 larvas se probaron para cada formulado y cada dosis. La mortalidad fue registrada a los 7 días (Dunkle y Shasha 1988). Como controles se utilizaron muestras de cada formulado hechos sin *B. thuringiensis* y extracto de *B. thuringiensis* cepa GM-7 tratadas como se describe arriba a las mismas dosis.

Bioensayo de Exposición de *Trichoplusia ni* a los Formulados Granulados Durante 24h.

Se utilizaron cajas de petri de 5.0 cm de diámetro, con el fondo cubierto con una capa de 3-5 mm de espesor de una mezcla de pasta de paris y carbón activado (15:1), saturada con agua. Se depositó en cada caja 30 mg de formulado en forma granular, se transfirieron 20 larvas del 2° instar de *Trichoplusia ni* y se les permitió alimentarse del formulado durante 24 h. En forma simultánea se hicieron bioensayos con los controles (Formulados sin *B. thuringiensis*). Cada tratamiento consistió en un total de 5 cajas por formulado. Después de las 24 h de exposición, se registró la mortalidad y se seleccionaron al azar 5 larvas sobrevivientes (5 de cada caja, 25 en total), las cuales fueron transferidas a copas individuales con dieta artificial. La mortalidad se registró después de 7 días (Dunkle y Shasha 1988).

Estabilidades de los Formulados en Almacenamiento.

Se almacenaron doce gramos de cada formulado durante 12 meses en frascos tapados a temperatura ambiente (16-32°C). Después de este periodo de tiempo se realizaron bioensayos y cuenta de UFC para determinar si hubo perdida de toxicidad y/o viabilidad durante el almacenamiento.

Bioensayo de Preferencia de Alimentación.

Se utilizaron bioensayos de dos alternativas, para evaluar preferencias de alimentación para *Trichoplusia ni*, según el método descrito por Bartelt *et. al*, 1990. Se utilizaron ocho diferentes tipos de gránulos, formulados sin extracto de *B. thuringiensis* y en forma alternativa se usaron discos de 1 cm de diámetro de hojas de lechuga para substituir la segunda pila de gránulos. Se utilizaron cajas de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una mezcla de pasta de paris y carbón activado como ya se describió anteriormente. En cada caja se depositaron en sitios opuestos 25 mg de diferente formulado a comparar. Un total de treinta y seis pares de gránulos fueron comparados y se realizaron 5 repeticiones por cada comparación. A cada caja con el par de formulados a comparar se le transfirieron 20 larvas del 2° instar de *Trichoplusia ni*, se dejaron durante toda la noche en la oscuridad a 30°C. Aproximadamente 16 h después, las cajas fueron congeladas a - 30°C, y el numero de larvas

sobre cada sitio fue registrado. También se tomó en cuenta el número de larvas que no se encontró sobre ninguno de los dos sitios.

Determinación de Adherencia de los Formulados a Portaobjetos y Hojas de Plantas.

Portaobjetos:

Para determinar la adherencia de los formulados a porta objetos se siguió el método reportado por McGuire y Shasha, 1992. Se utilizaron portaobjetos limpios y pesados previamente, los cuales se humedecieron con agua destilada, posteriormente se depositaron en la superficie 200 mg del formulado y se dejó secar a temperatura ambiente. El portaobjetos se pesa nuevamente, y se acomoda bajo una bureta a 2cm de distancia, se dejan caer sobre el portaobjetos 40 ml de agua destilada el portaobjetos se deja secar y se repite este ciclo de lavado y secado 4 veces. Posteriormente los portaobjetos se pesaron. Se utilizaron 5 portaobjetos para cada formulado.

Hojas de Algodón:

Para determinar las propiedades adherentes de los formulados a hojas de plantas se utilizaron plantas de algodón var. Deltapine (*Gossypium hirsutum* L.G.). En cada hoja se marcó un área de 15.9 cm² con un marcador permanente. Posteriormente esta área se humedeció con agua destilada y 30 mg de gránulos fueron cuidadosamente esparcidos dentro del área marcada y se dejó secar al aire. Posteriormente se aplicaron 10 ml de agua destilada a cada hoja con un aspersor manual y este procedimiento se repitió cada tercer día por un período de 7 días. Al séptimo día, se cortaron 10 hojas, los gránulos de cada hoja fueron raspados para remover todas las trazas adheridas a las hojas, se dejaron secar y se pesaron posteriormente.

Evaluación de la Eficacia de los Formulados Granulados en Invernadero.

En base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se seleccionaron tres formulados para su evaluación en invernadero y campo : Gelatina (GL), Pectina-Agua (Pa) y Almidón (Al). Estos mismos formulados se elaboraron con rojo congo al 1% como protector de luz UV y también fueron evaluados en invernadero y campo.

Los bioensayos en invernadero se hicieron con plantas de algodón infestado con larvas de *Trichoplusia ni* y con plantas de Maíz infestado con larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Algodón:

El algodón var. *Deltapine* fue plantado en botes de plástico de 1 l (11 cm de diámetro), una planta por bote. A las 7 semanas de desarrollo (aproximadamente 40 cm de altura), las plantas de algodón se separaron en 10 tratamientos con 10 plantas cada uno. En el experimento se incluyeron: formulados sin rojo congo (3), formulados con rojo congo al 1% (3), controles para cada formulado (3) y un testigo. Se humedecieron las hojas con un aspersor manual y se aplicaron 200 ± 20 mg de formulado granular a cada planta en las hojas superficiales, según el tratamiento, se dejó secar e inmediatamente después se infestó cada planta con la ayuda de un pincel, con 5 larvas neonatas de *Trichoplusia ni*. Después de 72 horas y a los 7 días, los tratamientos se evaluaron por conteo del número de larvas vivas por planta. Adicionalmente a las 10 semanas de desarrollo se tomaron 4 plantas al azar, de cada tratamiento, se extendieron en una prensa y posteriormente fueron sometidas a una evaluación de superficie foliar, utilizando un aparato (Area Meter MK2). A cada una de las plantas se le determinó: el número de hojas totales, número de hojas dañadas, superficie foliar total, superficie foliar dañada e índice de daño. Para medir mortalidad larvaria se diseñó otro experimento, en el que se utilizaron plantas de algodón de 7 semanas de desarrollo las cuales se dividieron en 9 tratamientos que consisten en 3 matrices cada una con *B. thuringiensis* al 1%, *B. thuringiensis* al 1% y rojo congo al 1% y su blanco respectivo mas un testigo y un tratamiento con el extracto libre de *B. thuringiensis* cepa GM-7. Se utilizaron 10 hojas de algodón para cada formulado a probar, sobre cada hoja previamente humedecida, se depositaron 30 mg del formulado a evaluar. Las plantas se sometieron a un regimen de riego durante 14 días, utilizando un aspersor manual. El riego se realizó cada tercer día. De cada tratamiento se cortaron 10 hojas a las 0 horas, 7 días y 14 días. Cada hoja se depositó en una caja de petri con un disco de papel filtro, se expusieron 10 larvas neonatas de *T. ni* y se les permitió alimentarse durante 24 h para medir mortalidad.

Maíz:

La variedad de maíz utilizada fue ASGROW 3092. El maíz fue plantado en botes de 15.5 cm de diámetro, una planta por bote. A las 7 semanas de desarrollo cuando las plantas tenían una altura aproximada de 50 cm, se realizó el bioensayo, se humedecieron las hojas y se depositaron directamente en el cogollo de cada planta, 200 ± 20 mg de cada formulado

granular, según el tratamiento, inmediatamente después se infestó con 10 larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* las cuales fueron depositadas cuidadosamente con un pincel en el cogollo de cada planta. Se utilizaron 5 plantas por tratamiento y 10 tratamientos en total. Después de 7 días los tratamientos fueron evaluados por disección de cada planta de maíz y conteo de larvas vivas por planta.

Evaluación de la Eficacia de los Formulados Granulados en Campo.

En campo las evaluaciones se realizaron con los mismos formulados evaluados anteriormente a nivel de invernadero, se llevaron a cabo en un campo experimental de la Universidad Autónoma de Chapingo, Bermejillo, Dgo. Las parcelas utilizadas fueron de 7 m de largo por 4 m de ancho (74 cm de distancia entre surcos), con 6 surcos cada una y una densidad de población promedio de 28 plantas por surco. La parcela útil fue de 4 surcos centrales de 5m de longitud, dejando 1 m al principio y al final para evitar efectos de orilla, en total el tamaño fue de 14.0 m² . El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 10 tratamientos, se trabajó con tres repeticiones (R1,R2,R3). Las parcelas fueron sembradas con maíz de la var. Asgrow 3092.

Los tratamientos se designaron como sigue:

T1= gelatina blanco, T2= almidón blanco, T3= pectina blanco, T4= gelatina con 1% B.t., T5= almidón con 1% de B.t., T6= pectina con 1% de B.t., T7= gelatina con 1% de B.t y 1% de rojo congo, T8= almidón con 1% de B.t. y 1% de rojo congo, T9= pectina con 1% de B.t. y 1% de rojo congo, T10= control. Se aplicaron directamente en el cogollo de cada planta 200 ± 20 mg de formulado granular, se hicieron 3 aplicaciones de los formulados granulados a los 30, 40 y 50 días después de la siembra y se esperó una infestación natural. La cosecha se realizó cuando las plantas estuvieron maduras y secas, la cosecha se realizó manualmente, separando los tratamientos en costales previamente etiquetados. Posteriormente a la cosecha se dejaron secar al aire las mazorcas para proceder al desgrane y limpieza manual. Se tomo en cuenta el porciento de ataque a las mazorcas y rendimiento expresado en Kg/ha, para lo cual se ajustó el contenido de humedad a 2.5 %.

Distribución de los Tratamientos

R1	R2	R3
5	2	5
1	4	9
7	8	7
2	5	2
8	1	10
10	7	3
6	10	4
9	6	8
4	3	6
3	9	1

Evaluación del Efecto de la Luz UV Sobre la Actividad Insecticida de los Formulados sin Protector de Luz UV y Usando Rojo Congo como Protector.

Para ver el efecto de la radiación UV sobre la viabilidad de las esporas y toxicidad de *B. thuringiensis*, se sometieron muestras de los formulados granulares sin rojo congo y con 1% de rojo congo a un simulador solar (CPS Hereaus, Hanaus, Germany), el espectro de irradiación abarca longitudes de onda desde 300 a 780 nm (McGuire et. al, 1996). Se tomaron 7 muestras de cada formulado (de aproximadamente 1gc/u), cada una se extendió en una caja de petri, y se expuso al simulador solar, los tratamientos para cada formulado fueron los siguientes (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 y 8 horas de exposición). Posteriormente a las muestras expuestas se les determinó su toxicidad, se utilizaron cajas de petri de 5.0 cm de diámetro, con el fondo cubierto con una capa de 3-5 mm de espesor de una mezcla de pasta de parís y carbón activado (15:1), saturada con agua. Se depositó en cada caja 30 mg de formulado en forma granular, se transfirieron 20 larvas del 2º instar de *Trichoplusia ni* y se les permitió alimentarse del formulado durante 24 h. En forma simultánea se hicieron bioensayos con los controles (Formulados sin *B. thuringiensis*). Cada tratamiento consistió en un total de 5 cajas por formulado. Después de las 24 h de exposición, se registró la mortalidad y se seleccionaron al azar 5 larvas sobrevivientes (5 de cada caja, 25 en total), las cuales fueron transferidas a copas individuales con dieta artificial. La mortalidad se registró después de 7 días (Dunkle & Shasha 1988). También se les determinó sobrevivencia de las esporas. Se tomaron muestras de 100 mg de cada formulado, *B. thuringiensis* fue liberado de la matriz polimérica, como fue descrito anteriormente. Las suspensiones fueron diluidas (10^{-1} a 10^{-6})

con solución salina estéril y se transfirió 0.1 ml a cajas de petri con agar nutritivo, cada muestra fue sembrada por triplicado e incubada a 30°C por 24 h, después de este tiempo las unidades formadoras de colonia (U.F.C.) fueron contadas.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). La prueba de Tukey fue usada para determinar la diferencia entre medias con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Cuando se tenía más de un factor, se realizó también un análisis de varianza (ANOVA Multifactorial).

RESULTADOS

Sobrevivencia de *B. thuringiensis* en los Formulados Granulares.

Se realizó con la finalidad de determinar la capacidad de sobrevivencia de la bacteria en la matriz seca. Se tomaron muestras de cada formulado, las cuales fueron tratadas con una enzima apropiada y se determinó el número de unidades formadoras de colonias. Como control, se utilizó extracto de la cepa GM-7 de *B. thuringiensis* sin formular. Los resultados esperados eran, 10^5 UFC/mg para los formulados. Los resultados demostraron que no ocurrió pérdida en la viabilidad de las esporas como resultado del proceso de formulación (Tabla 4).

Bioensayo de Mortalidad con Incorporación de los Formulados a la Dieta del Insecto Blanco.

La finalidad de este bioensayo fue comprobar que después de la formulación en las matrices poliméricas *B. thuringiensis* no perdió su actividad tóxica. Para comprobar esto fue liberado de la misma como se especificó anteriormente y se incorporó a la dieta artificial para *T. ni* en dos dosis 50 y 500 µg/ml. Los resultados indican que *B. thuringiensis* permanece activo después de la formulación (Tabla 5). Se obtuvo menos de un 10% de mortalidad para *T. ni* en los formulados blanco. No se observó diferencia en cuanto a mortalidad para *T. ni* entre las dosis usadas ($F=0.5826$; $gl = 2$; $P > 0.05$). Con la dosis de 500 µg/ml en la formulación de pectina, se presentaron problemas durante la incorporación a la dieta artificial, debidos a la viscosidad de la pectina. Se encontró diferencia significativa entre los diferentes formulados ($F=46.8939$; $gl=17$; $P < 0.0001$). Las formulaciones que causaron menos del 50%

mortalidad en *T. ni* fueron: pectina con isopropanol (PI), pectina con butanol (Pb) y quitina (Qcg). También se observó reducción en el tamaño de las larvas sobrevivientes a los tratamientos.

Bioensayo de Exposición de *Trichoplusia ni* a los Formulados Granulados Durante 24h.

El objetivo de este bioensayo fue comprobar si *B. thuringiensis* atrapado en la matriz polimérica permanece activo y si es capaz de ejercer su actividad tóxica al ser ingerido en forma granulada por el insecto. Después de 24 h de exposición a los formulados granulados de *B. thuringiensis* la mortalidad larvaria fue menor del 30%, excepto para el formulado de gelatina (GL) y almidón (Al), los cuales causaron 78% y 91% de mortalidad larvaria, respectivamente. Los resultados del bioensayo de 24 h de exposición, tomados a los 7 días, coinciden con los resultados del bioensayo de incorporación a la dieta, excepto para el formulado de pectina-isopropanol y pectina-butanol, los cuales presentaron toxicidades mayores que en el bioensayo anterior (Tabla 6). Cuando se comparó el bioensayo de incorporación a la dieta con sus dos dosis con el bioensayo de 24h de exposición mediante una prueba de rangos múltiples de Tukey, se encontró que no hay diferencia significativa entre ellos ($F= 0.5828$; $gl= 2$; $P> 0.05$).

Estabilidades de los Formulados en Almacenamiento.

El objetivo de esta prueba fue determinar si el tiempo de almacenamiento afecta la viabilidad de las esporas y la actividad tóxica del cristal de *B. thuringiensis* cuando se formula como gránulos en diferentes matrices poliméricas. La temperatura promedio de almacenamiento fue de 26.5°C (de Septiembre de 1994 a Septiembre de 1995). En todas las formulaciones se observó una reducción en la viabilidad de las esporas, excepto con gelatina (GL) y almidón (Al), los cuales mantuvieron 10^5 UFC/mg (Tabla 7 y Fig 1). Se encontró alta diferencia significativa en la viabilidad de las esporas con respecto a los diferentes formulados ($F=9.242$; $gl=7$; $P<0.001$), también con respecto al tiempo de almacenamiento ($F=14.7902$; $gl=3$; $P<0.001$) y temperatura de almacenamiento ($F=14.7902$; $gl=3$; $P<0.001$). Cuando se analizó la interacción de dos factores (tipo de formulado y tiempo de almacenamiento con respecto a la viabilidad, se encontró alta diferencia significativa ($F=194.42$; $gl=21$; $P<0.001$). La interacción de (tipo de formulado y temperatura de

almacenamiento) con respecto a viabilidad, también fue diferente significativamente ($F=194.42$; $gl=21$; $P,0.001$). La actividad de la toxina de *B. thuringiensis* no fue significativamente diferente de la obtenida con los formulados recién preparados, esto se comprobó mediante una prueba de comparación de rangos múltiples de Tukey, ($F=0.0107$; $gl=1$; $P>0.05$), no se encontró diferencia significativa en actividad tóxica con respecto a la temperatura de almacenamiento ($F=0.0107$; $gl=1$; $P>0.05$) sin embargo si se encontró diferencia significativa entre la actividad tóxica con respecto a los diferentes formulados ($F=10.6763$; $gl=7$; $P=0.0017$). La actividad tóxica de *B. thuringiensis* permaneció alta después de su almacenamiento durante 12 meses a temperatura ambiente excepto para las formulaciones de gelatina-isopropanol (GI) y alginato (ATL). Estas perdieron cerca del 13% y 32% de su actividad tóxica original, respectivamente (Tabla 8).

Bioensayo de Preferencia de Alimentación.

Se utilizaron bioensayos de dos alternativas, para evaluar preferencias de alimentación para *Trichoplusia ni*, se les permitió elegir alimentarse entre dos tipos de formulados granulares. Se realizaron 36 pares de comparaciones. La mayor parte de las larvas se asociaron con hojas de lechuga y posteriormente prefirieron alimentarse sobre los gránulos formulados con gelatina (GL) y pectina (Po, PI, Pb). La menor cantidad de larvas se asoció con los gránulos formulados con alginato (ATL) y quitina (Qcg) (Tabla 9). Se encontró alta diferencia significativa con respecto a la preferencia de las larvas entre los diferentes formulados ($F= 92.9835$; $gl= 8$; $P<0.001$).

Determinación de Adherencia de los Formulados a Portaobjetos y Hojas de Plantas.

Portaobjetos:

Se evaluaron las propiedades adherentes de los diferentes formulados en portaobjetos. Las mejores características adherentes las presentaron las formulaciones de Gelatina (GI), Gelatina-isopropanol (GI), Pectina (Po), Pectina-isopropanol (PI), Pectina-butanol (Pb) y Almidón (AI), los formulados de quitina (Qcg) y alginato (ATL), no presentaron buenas características adherentes y resultaron ser diferentes del resto. ($F=12.4725$; $gl=7$; $P<0.001$)(Tabla 10).

Hojas de Algodón:

Las mejores propiedades adherentes las presentaron los formulados granulares hechos con pectina (Po,PI,Pb) y gelatina (GL,GI) los cuales aún permanecían adheridos a las hojas después de 7 días bajo un régimen de irrigación. Los gránulos que no presentaron buenas propiedades adherentes en hojas de algodón fueron los de alginato (ATL), quitina (Qcg) y almidón (AI) ($F=11.5739$; $gl=7$; $P<0.001$)(Tabla 10).

Evaluación de la Eficacia de los Formulados Granulados en Invernadero:

Algodón:

Se seleccionaron tres matrices para su evaluación en invernadero y campo, (GL,Po,AI), las cuales fueron formuladas solamente con extracto de *B.thuringiensis* y con extracto de *B. thuringiensis* y rojo congo al 1%. Después de aplicar los formulados en las plantas de algodón, estas se sometieron a riego manual por aspersión, para posteriormente medir la mortalidad con larvas de *T. ni*. Se encontró una alta diferencia significativa en la mortalidad con respecto a los diferentes formulados ($F=127.720$; $gl=10$; $P<0.001$), no se encontró diferencia significativa con respecto a los días de riego ($F=0.1378$; $gl=2$; $P>0.05$), sin embargo con la interacción de los dos factores (tipo de formulado y días de riego) se obtuvo diferencia significativa ($F=6.432$; $gl=20$; $P<0.001$). Los formulados sin rojo congo en general fueron mas eficientes que los formulados con rojo congo al 1%, excepto para la formulación a base de pectina (Tabla 11 y Fig 2). Cuando se analizaron por separado los tratamientos con respecto a los días de riego, los resultados obtenidos fueron los siguientes: a las 0 horas el extracto de GM-7 fué significativamente diferente y más eficiente que el resto de los formulados ($F=42.4134$; $gl=10$; $P<0.001$), a los 7 días no se encontró diferencia significativa entre el extracto de GM-7 y los formulados ($F=162.6523$; $gl=10$; $P<0.001$), a los 14 días de riego se encontró diferencia significativa y más eficiencia en los formulados de almidón (AI), pectina (Po) , gelatina (GL)(con *B. thuringiensis* al 1%) y pectina (Po)(con *B. thuringiensis* y rojo congo al 1%) con respecto a el extracto libre de la cepa GM-7. También se hizo un análisis de superficie foliar a las plantas de algodón infestadas con larvas de *T. ni* para evaluar el daño causado por la plaga. Se encontró una alta diferencia significativa con respecto al daño foliar entre los tratamientos blanco y control con respecto a los tratamientos con los formulados con *B. thuringiensis* ($F= 13.6133$; $gl=9$; $P<0.001$) (Tabla 12). Se utilizó un programa estadístico (Statistix Analytical Software,1993) para analizar los contrastes lineales, se analizó la diferencia significativa de los siguientes 6 contrastes: los controles con respecto a los tratamientos (se encontro diferencia significativa a los 0, 7 y 14 días); los formulados sin rojo congo con respecto a los que posean rojo congo (se encontró diferencia significativa a

los 7 y 14 días); el extracto libre de GM-7 con respecto a las formulaciones granulares (se encontró diferencia significativa a los 0, 7 y 14 días); el extracto de la cepa GM-7 con respecto a los formulados sin rojo congo (se encontró diferencia significativa a los 14 días); el extracto de GM-7 con respecto a los formulados con rojo congo (se encontró diferencia significativa a los 0, 7 y 14 días); el testigo con respecto a los formulados blanco (no se encontró diferencia significativa). Tabla (13)

Maíz:

Los bioensayos con plantas de maíz en invernadero, se evaluaron con larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*. Se encontró una alta diferencia significativa entre la sobrevivencia de las larvas con respecto a los diferentes formulados. ($F=13.8562$; $gl=9$; $P<0.001$). Las plantas control presentaron mayor daño que las plantas tratadas con los formulados blanco. También se encontró diferencia significativa entre los formulados de pectina y almidón con respecto a los de gelatina (Tabla 14).

Evaluación de la Eficacia de los Formulados Granulados en Campo.

En la prueba de campo, se encontró diferencia significativa entre el rendimiento en Kg/ha y los diferentes formulados ($F=2.7396$; $gl=10$; $P=0.0234$). Los gránulos formulados con pectina y con rojo congo al 1% presentaron diferencia significativa con respecto al resto de los formulados. No se encontró diferencia significativa entre el control, los formulados blanco de cada matriz y los formulados con *B. thuringiensis* y rojo congo de gelatina, almidón y la cepa GM-7 (Tabla 15 y Figura 3). La plaga que se presentó fue *Heliothis virescens*.

Evaluación del Efecto de la Luz UV Sobre la Actividad Insecticida de los Formulados sin Protector de Luz UV y Usando Rojo Congo como Protector.

Esta prueba se hizo con la finalidad de ver si se obtenía un efecto protector con respecto a viabilidad y actividad tóxica en los formulados al utilizar rojo congo como protector de luz ultravioleta, para lo cual se comparó con los granulados formulados sin rojo congo. Para realizar esta prueba se utilizó un simulador solar. El rojo congo se seleccionó por que su espectro de absorción abarca desde 220 a 620 nm (Dunkle y Shasha, 1989). Los formulados de almidón y de gelatina preparados con rojo congo presentaron una mejor viabilidad que los mismos formulados sin rojo congo, los formulados a base de pectina mostraron una mayor pérdida de viabilidad al exponerse al simulador solar que el resto de los formulados ($F=24.1378$; $gl=5$; $P<0.001$). Se encontró una alta diferencia significativa en la viabilidad de las esporas después de 2 horas de exposición al simulador solar ($F=11.9023$;

gl=5; $P < 0.001$) (Tabla 16 y Figura 4). Cuando se analizó la interacción de los dos factores (tipo de formulado y tiempo de exposición) con respecto a viabilidad, se encontró alta diferencia significativa ($F=20.916$; $gl=25$; $P < 0.001$). En cuanto a actividad tóxica de los formulados no se encontró diferencia significativa entre los diferentes formulados, con rojo congo y sin rojo congo, cuando se analizó el experimento completo ($F=2.2495$; $gl=5$; $P > 0.05$). Se encontró diferencia significativa a los diferentes tiempos de exposición ($F=40.4972$; $gl=5$; $P < 0.0001$). Se encontró diferencia significativa en mortalidad después de 2 hora de exposición al simulador solar (Tabla 17 y Figura 5). Cuando se analizó la interacción de los dos factores tipo de formulado y tiempo de exposición con respecto a actividad tóxica se encontró diferencia significativa ($F=2.015$; $gl=25$; $P=0.016$). Se realizó un análisis para ver el contraste lineal entre los formulados sin rojo congo y los formulados con rojo congo, con respecto a viabilidad de las esporas y toxicidad contra larvas de *T.ni*, con respecto a la actividad tóxica se encontró diferencia significativa después de 2 horas de exposición al simulador solar entre los formulados sin rojo congo y los que poseen rojo congo. Con respecto a la viabilidad se encontró diferencia significativa entre los formulados sin y con rojo congo, desde las 0 horas (Tabla 18).

Tabla 4. Supervivencia de *Bacillus thuringiensis* (GM-7) en los Formulados Granulares^a

Formulación	Media UFC/mg \pm EE ^b
GI	(5.1 \pm 0.7667) X 10 ⁵
GL	(2.6 \pm 0.5998) X 10 ⁵
PI	(5.8 \pm 0.4665) X 10 ⁵
Pb	(4.7 \pm 0.0998) X 10 ⁵
Po	(3.1 \pm 0.2332) X 10 ⁵
Qcg	(4.7 \pm 0.9665) X 10 ⁵
AI	(4.0 \pm 0.2332) X 10 ⁵
ATL	(1.0 \pm 0.0334) X 10 ⁵
GM-7	(6.3 \pm 0.1668) X 10 ⁶

^aGI= gelatina:isopropanol; GL= gelatina; PI= pectina:isopropanol; Pb= pectina:butanol; Po= pectina; Qcg= quitina coloidal; AI= almidón de maíz pregelatinizado:isopropanol; ATL= alginato; GM-7 = extracto de *B. thuringiensis*.

^b Promedio de tres cuentas \pm EE

Tabla 5. Mortalidad de Larvas de *Trichoplusia ni* Expuestas a los Diferentes Formulados *B. thuringiensis* Tratados con Enzimas e Incorporados a Dieta Artificial

Formulación ^a	Mortalidad después de 7 d ^b		Media ± EE número de larvas muertas a los 7 d ^b	
	(%)		50 µg/ml	500 µg/ml
Gl gránulos blanco	2.7	5.3	0.66 ± 0.066	1.33 ± 0.066
Gl - B.t. (1%)	100	100	25 ± 0.0	25 ± 0.0
GL gránulos blanco	0	2.7	0	0.66 ± 0.133
GL - B.t. (1%)	98.7	100	24.66 ± 0.066	25 ± 0.0
Pl gránulos blanco	2.7	n.d.	0.66 ± 0.133	n.d.
Pl - B.t. (1%)	22.7	46.7	5.66 ± 0.371	11.66 ± 0.178
Pb gránulos blanco	0	n.d.	0	n.d.
Pb - B.t. (1%)	41.3	n.d.	10.33 ± 0.786	n.d.
Po gránulos blanco	5.3	n.d.	1.33 ± 0.176	n.d.
Po - B.t. (1%)	97.3	n.d.	24.33 ± 0.066	n.d.
Qcg gránulos bco.	0	2.7	0	0.66 ± 0.066
Qcg - B.t. (1%)	2.7	2.7	1.33 ± 0.176	1.66 ± 0.066
Al gránulos blanco	1.3	1.3	0.33 ± 0.066	0.33 ± 0.066
Al - B.t. (1%)	93.0	97.3	23.33 ± 0.240	24.33 ± 0.133
ATL gránulos bco.	6.7	6.7	1.66 ± 0.333	1.66 ± 0.066
ATL - B.t. (1%)	85.0	100	21.33 ± 0.133	25 ± 0.0
GM-7 (extracto B.t)	100	100	25 ± 0.0	25 ± 0.0
Control	4.0			

^a se usó pectinasa, quitinasa, amilasa para pectina, quitina y almidón respectivamente, sol. de k para alginato, agua a 40°C para gelatina.

^b n= 25

n.d = no determinado, por la viscosidad de la pectina.

Tabla 6. Mortalidad de Larvas de *Trichoplusia ni* Expuestas 24 h a los Formulados Granulados de *B. thuringiensis*.

Formulación	Mortalidad (%)	
	24 h ^a	7 d ^b
GI gránulos blanco	1	8
GI - B.t. (1%)	23	100
GL gránulos blanco	0	8
GL - B.t. (1%)	78	100
PI gránulos blanco	9	4
PI - B.t. (1%)	13	72
Pb gránulos blanco	10	0
Pb - B.t. (1%)	29	92
Po gránulos blanco	3	4
Pb - B.t. (1%)	30	100
Qcg gránulos blanco	1	4
Qcg - B.t. (1%)	7	4
Al gránulos blanco	1	4
Al - B.t. (1%)	91	100
ATL gránulos blanco	1	0
ATL - B.t. (1%)	12	100
GM-7 (extracto de B.t)	92	100

^a n= 100

^b n= 25

Tabla 7. Estabilidad de los Formulados Granulares Después de su Almacenamiento Durante 12 Meses a Temperatura Ambiente

Formulación	1994	1995		
	UFC/mg ^a Septiembre	UFC/mg ^a Enero	UFC/mg ^a Marzo	UFC/mg ^a Septiembre
GI	(5.1 ± 0.767) X 10 ⁵	(3.8 ± 0.566) X 10 ⁵	(2.5 ± 0.150) X 10 ⁵	(2.4 ± 0.367) X 10 ⁴
GL	(2.6 ± 0.600) X 10 ⁵	(2.5 ± 0.367) X 10 ⁵	(1.8 ± 0.188) X 10 ⁵	(1.6 ± 0.040) X 10 ⁵
PI	(5.8 ± 0.466) X 10 ⁵	(1.7 ± 0.433) X 10 ⁵	(6.0 ± 0.533) X 10 ⁴	(9.7 ± 0.176) X 10 ²
Pb	(4.7 ± 0.100) X 10 ⁵	(4.2 ± 0.267) X 10 ⁵	(1.8 ± 0.367) X 10 ⁵	(5.9 ± 0.700) X 10 ²
Po	(3.1 ± 0.233) X 10 ⁵	(2.1 ± 0.233) X 10 ⁵	(1.8 ± 0.043) X 10 ⁵	(5.3 ± 1.233) X 10 ⁴
Qcgc	(4.7 ± 0.966) X 10 ⁵	(2.8 ± 0.167) X 10 ³	(2.5 ± 0.433) X 10 ¹	3.3 ± 2.433
AI	(4.0 ± 0.233) X 10 ⁵	(4.0 ± 0.294) X 10 ⁵	(3.6 ± 0.170) X 10 ⁵	(2.4 ± 0.117) X 10 ⁵
ATL	(1.0 ± 0.033) X 10 ⁵	(6.0 ± 0.066) X 10 ⁴	(3.1 ± 0.233) X 10 ³	(1.8 ± 0.133) X 10 ²

^a Promedio de tres cuentas ± EE .

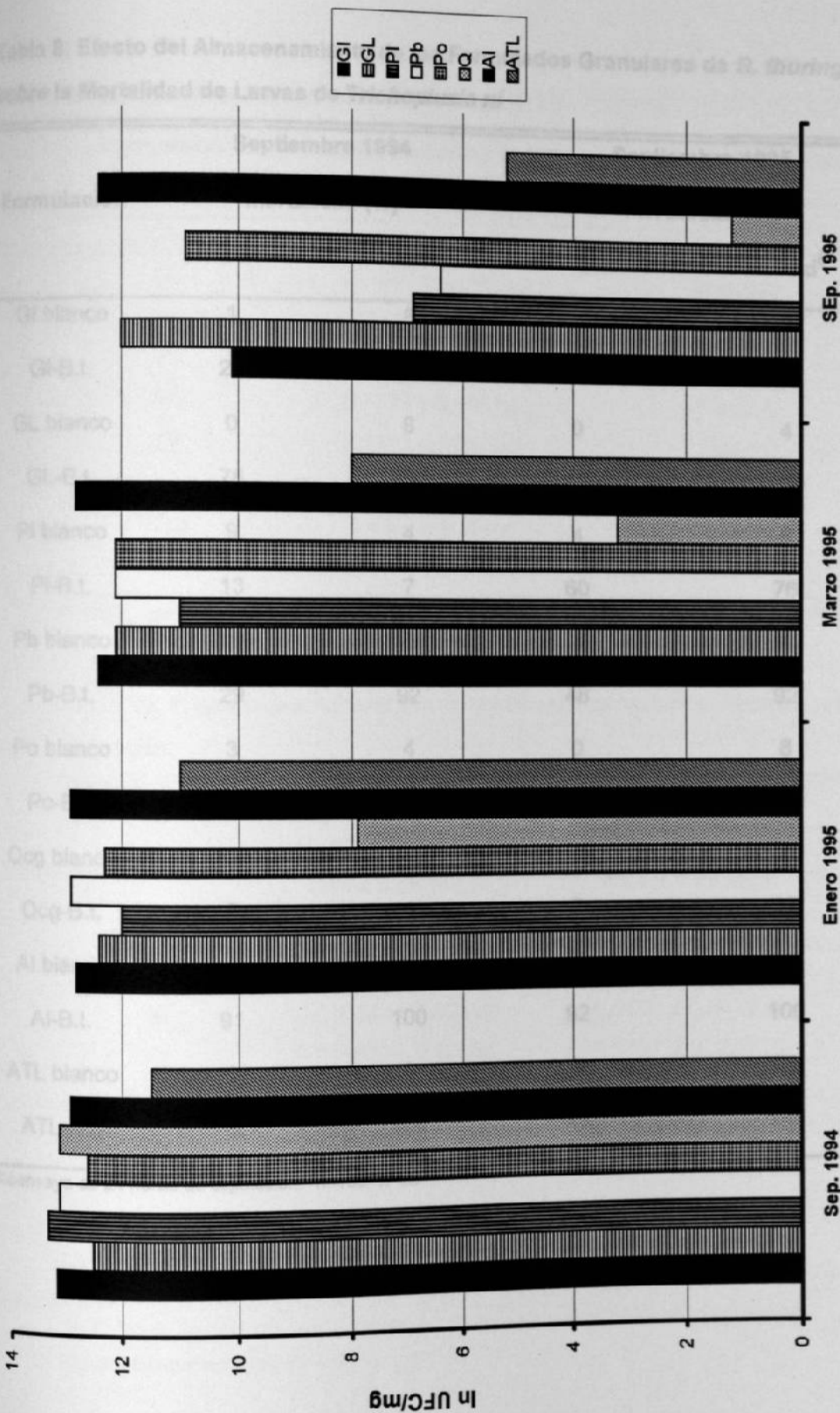


Figura 1. Estabilidad de los Formulados Después de su Almacenamiento a Temperatura Ambiente Durante 12 Meses

Tabla 8. Efecto del Almacenamiento de los Formulados Granulares de *B. thuringiensis* sobre la Mortalidad de Larvas de *Trichoplusia ni*

Formulación	Septiembre 1994		Septiembre 1995	
	Mortalidad (%)		Mortalidad (%)	
	24h ^a	7d ^b	24h ^a	7d ^b
GI blanco	1	8	1	4
GI-B.t.	23	100	85	87
GL blanco	0	8	0	4
GL-B.t.	78	100	82	100
PI blanco	9	4	4	8
PI-B.t.	13	7	60	76
Pb blanco	10	0	3	4
Pb-B.t.	29	92	48	92
Po blanco	3	4	0	8
Po-B.t.	30	100	47	100
Qcg blanco	1	4	0	32
Qcg-B.t.	7	4	7	32
AI blanco	1	4	0	4
AI-B.t.	91	100	92	100
ATL blanco	1	0	0	20
ATL-B.t.	12	100	29	68

Bioensayo de 24 horas de exposición. ^an=100 ^bn=25

Tabla 9. Preferencia de Alimentación de Larvas de *Trichoplusia ni* Expuestas a las Diferentes Formulaciones Granulares

Formulación	Número de Larvas sobre los gránulos ^a (Media ± EE)	Rangos de Preferencia
Lechuga	15.4889 ± 0.343 a	Primero
GL	8.1556 ± 0.388 b	Segundo
Po	7.8444 ± 0.326 b	Segundo
PI	7.3333 ± 0.360 b	Segundo
Pb	6.7778 ± 0.405 bc	Tercero
GI	5.3111 ± 0.385 cd	Cuarto
AI	3.7111 ± 0.228 d	Cuarto
Qcg	1.4889 ± 0.109 e	Quinto
ATL	0.9778 ± 0.104 e	Quinto

^an=100 ; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente, Tukey, P<0.05

Tabla 10. Propiedades Adherentes de las Diferentes Matrices Poliméricas Utilizadas

Formulación	Peso recuperado de los portaobjetos Media ± EE (mg) ^a	Peso recuperado de las hojas de algodón Media ± EE(mg) ^b
Po	0.017220 ± 0.0016a	0.0276 ± 0.0024a
GI	0.016280 ± 0.0035a	0.0266 ± 0.0025 ab
PI	0.014820 ± 0.0006a	0.0237 ± 0.0015 ab
Pb	0.017980 ± 0.0009a	0.0222 ± 0.0011 ab
GL	0.017840 ± 0.0037a	0.0219 ± 0.0011 bc
AI	0.019620 ± 0.0020a	0.0165 ± 0.0019 cd
Qcg	0.001580 ± 0.0003b	0.0142 ± 0.0025 d
ATL	0.002160 ± 0.0008b	0.0073 ± 0.0014 e

^an=5 ; ^bn=10 , valores seguidos por letras iguales en la misma columna, no son diferentes significativamente, Tukey, P< 0.05

Tabla 11. Efecto de Diferentes Formulados Granulares de *B. thuringiensis* sobre la sobrevivencia de Larvas de *T. ni* en Plantas de Algodón en Invernadero

Formulación	Número de Larvas Muertas a Diferentes Días de Riego ^a		
	0 horas	7 Días	14 Días
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE
GL bco	0.37 ± 0.074c	0.20 ± 0.042c	0.70 ± 0.106d
GL B.t.	7.25 ± 0.301b	9.80 ± 0.042a	8.50 ± 0.135a
GL B.t. r.c.	6.75 ± 0.276b	5.50 ± 0.178b	8.00 ± 0.205ab
Po bco	0.50 ± 0.053c	0.20 ± 0.042c	1.00 ± 0.135d
Po B.t.	7.50 ± 0.141ab	9.80 ± 0.042a	9.90 ± 0.032a
Po B.t. r.c.	7.00 ± 0.283b	9.00 ± 0.163a	9.60 ± 0.126a
Al bco	0.50 ± 0.053c	0.20 ± 0.042c	0.80 ± 0.079d
Al B.t.	9.00 ± 0.107ab	8.80 ± 0.215a	8.60 ± 0.184a
Al B.t. r.c.	9.25 ± 0.139ab	8.80 ± 0.123a	6.00 ± 0.249bc
GM-7	9.87 ± 0.035a	9.60 ± 0.067a	5.20 ± 0.421c
Control	1.12 ± 0.064c	0.20 ± 0.042c	1.00 ± 0.067d

^a n=100, valores seguidos por letras iguales en la misma columna, no son diferentes significativamente, Tukey, P < 0.05.

Tabla 12. Estimación del Daño en Plantas de Algodón Tratadas con Diferentes Formulados Granulares de *B. thuringiensis* e Infestadas con Larvas de *T. ni* en Invernadero

Formulación	Superficie Foliar Dañada ^a	
	(Media ± EE) mm ²	IDF ^b
GL bco	36.25 ± 10.176c	4.82 ± 0.997b
GL B.t.	0.75 ± 0.250a	0.12 ± 0.043a
GL B.t. r.c.	3.75 ± 0.629ab	0.50 ± 0.0707a
Po bco	30.25 ± 10.889c	4.35 ± 1.408b
Po B.t.	2.25 ± 0.250a	0.46 ± 0.048a
Po B.t. r.c.	7.00 ± 5.016ab	0.78 ± 0.409a
Al bco	41.75 ± 8.290cd	5.83 ± 0.844b
Al B.t.	2.25 ± 0.750a	0.51 ± 0.207a
Al B.t. r.c.	3.75 ± 0.750ab	0.66 ± 0.128a
Control	65.25 ± 7.510d	9.20 ± 0.852c

^an=4, ^bIDF (Índice de daño foliar) = Sup. foliar dañada + número de hojas dañadas
valores seguidos por letras iguales en la misma columna, no son diferentes significativamente, Tukey, P < 0.05.

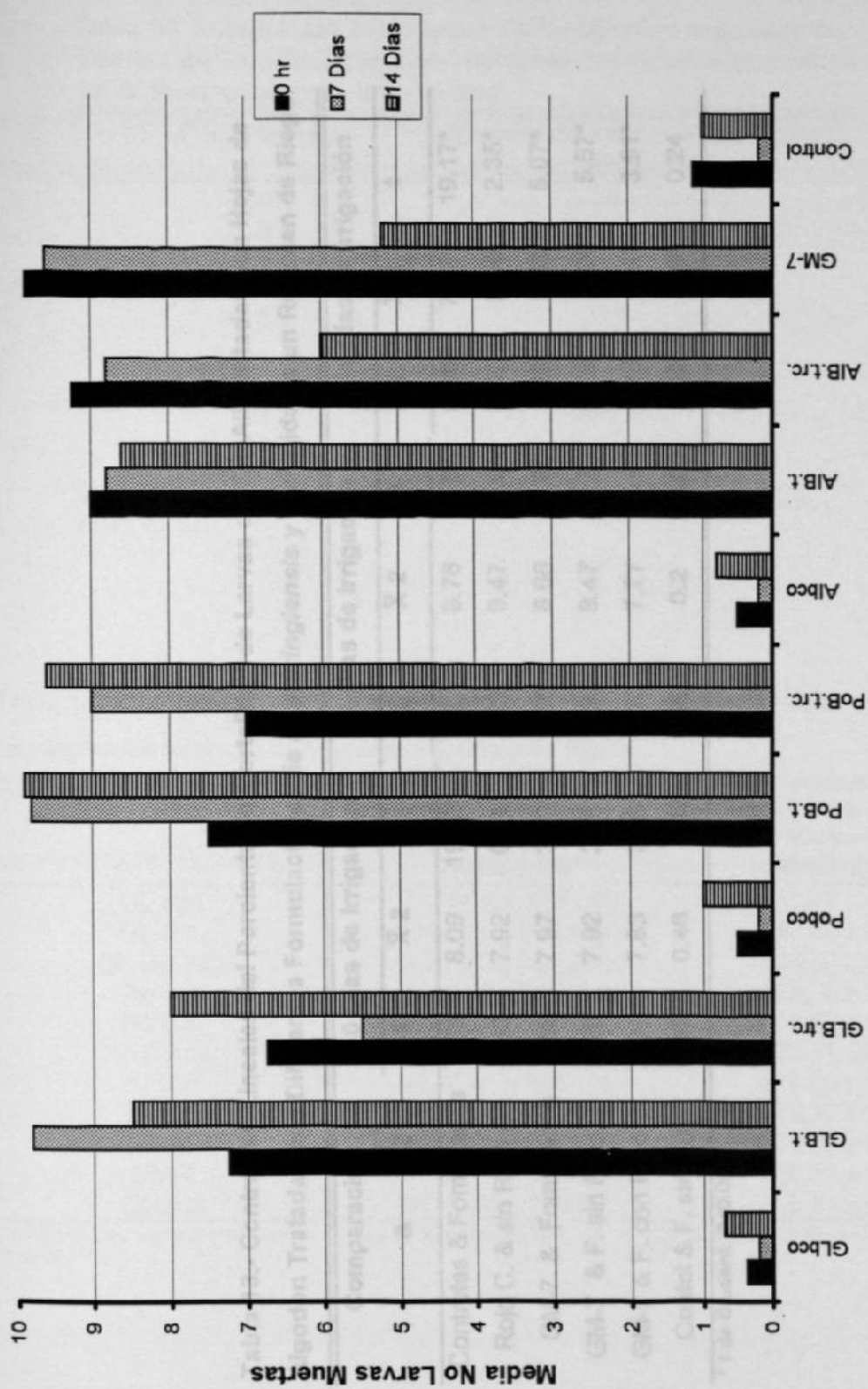


Figura 2. Actividad Tóxica de Diferentes Formulados de *B. thuringiensis* contra Larvas de *T. ni* en Invernadero

Tabla 13.- Contrastes Lineales del Porcentaje de Mortalidad de Larvas de *T. ni* Alimentadas con Hojas de Algodon Tratadas con Diferentes Formulaciones de *B. thuringiensis* y Sometidas a un Regimen de Riego.

Comparación	0 Dias de Irrigación			7 Dias de Irrigación			14 Dias de Irrigación		
	1	2	t	$\bar{X} 1$	$\bar{X} 2$	t	$\bar{X} 1$	$\bar{X} 2$	t
Controles & Formulados	0.63	7.83	19.92*	0.2	8.76	38.94*	0.88	7.97	19.17*
Rojo C. & sin Rojo C.	7.83	7.92	0.51	7.77	9.47	5.94*	7.87	9.00	2.35*
GM-7 & Formulados	9.88	7.97	3.23*	9.60	8.66	2.60*	5.20	8.43	5.07*
GM-7 & F. sin Rojo C.	9.88	7.92	2.84	9.60	9.47	0.33	5.20	9.00	5.57*
GM-7 & F. con Rojo C.	9.88	7.83	3.20*	9.60	7.77	4.53*	5.20	7.87	3.91*
Contol & F. sin B. t.	1.13	0.46	0.97	0.20	0.2	0.00	1.00	0.83	0.24

* t de Student, P<0.05

Tabla 14. Supervivencia de Larvas de *Spodoptera frugiperda* en Plantas de Maíz Tratadas con Diferentes Formulados Granulares de *B. thuringiensis* en Invernadero

Formulación	Número de Larvas Supervivientes Media ± EE ^a
GL bco	2.20 ± 0.063bc
GL B.t.	1.60 ± 0.214abc
GL B.t. r.c.	1.40 ± 0.126abc
Po bco	2.80 ± 0.155c
Po B.t.	0.20 ± 0.063a
Po B.t. r.c.	0.80 ± 0.063ab
Al bco	2.40 ± 0.063c
Al B.t.	0.40 ± 0.077ab
Al B.t.r.c.	0.80 ± 0.155ab
Control	5.40 ± 0.126d

^an=50, valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente, Tukey, P<0.05.

Tabla 15. Efecto de la Aplicación de Diferentes Formulados Granulares de *B. thuringiensis* sobre el Rendimiento de Maíz en Kg/ha

Formulación	Rendimiento de Maíz Kg/ha Media ± EE ^a	% de Ataque a las Mazorcas Media ± EE ^a
GL bco	4143.67 ± 371.36b	25.07 ± 4.74
GL B.t.	4940.33 ± 500.81ab	23.93 ± 0.64
GL B.t. r.c.	4870.67 ± 335.99ab	20.98 ± 2.67
Po bco	4197.67 ± 297.64b	23.59 ± 5.07
Po B.t.	5388.00 ± 658.59ab	18.52 ± 1.35
Po B.t.r.c.	6469.00 ± 806.57a	18.94 ± 0.97
Al bco	4232.00 ± 303.04b	18.09 ± 2.95
Al B.t.	4931.00 ± 454.14ab	18.37 ± 0.93
Al B.t.r.c.	4857.00 ± 414.23ab	29.09 ± 3.05
GM-7	4718.00 ± 95.55ab	22.61 ± 1.42
Control	3718.33 ± 196.69b	29.48 ± 4.16

^an=3, valores seguidos por letras iguales en la misma columna, no son diferentes significativamente, Tukey P<0.05.

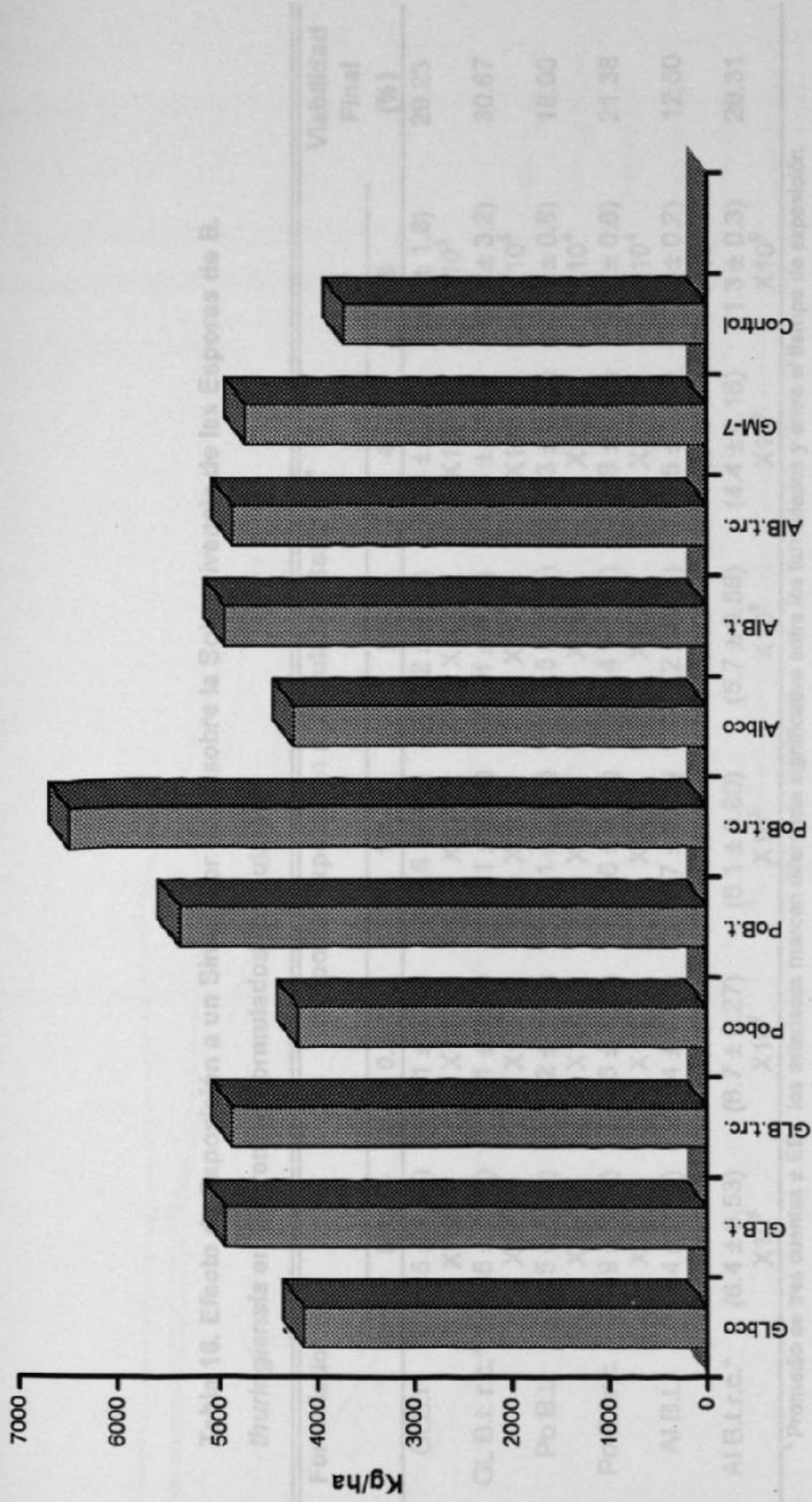


Figura 3. Efecto de la Aplicación de Diferentes Formulados de *B. thuringiensis* sobre el Rendimiento de Maíz

Tabla 16. Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Supervivencia de las Esporas de *B. thuringiensis* en Diferentes Formulados Granulares

Formulado	Tiempo de Exposición al Simulador Solar (h) ^a						Viabilidad Final (%)
	0 ^{aa}	0.5 ^{aa}	1 ^{aa}	2 ^a	4	8	
GLB.1*	(6.5 ± 0.07) X 10 ⁵	(6.1 ± 0.77) X 10 ⁵	(6.5 ± 1.02) X 10 ⁵	(4.2 ± 0.13) X 10 ⁵	(3.9 ± 0.29) X 10 ⁵	(1.9 ± 1.8) X 10 ⁵	29.23
GL B.t. r.c.*	(7.5 ± 0.62) X 10 ⁵	(7.1 ± 0.38) X 10 ⁵	(7.1 ± 0.58) X 10 ⁵	(7.4 ± 0.81) X 10 ⁵	(4.5 ± 0.20) X 10 ⁵	(2.3 ± 3.2) X 10 ⁵	30.67
Po B.t.	(2.5 ± 0.13) X 10 ⁵	(2.2 ± 0.99) X 10 ⁵	(1.1 ± 0.73) X 10 ⁵	(4.5 ± 0.27) X 10 ⁴	(4.3 ± 0.20) X 10 ⁴	(4.5 ± 0.8) X 10 ⁴	18.00
Po B.t.r.c.	(2.9 ± 0.93) X 10 ⁵	(2.6 ± 4.18) X 10 ⁵	(2.6 ± 0.78) X 10 ⁵	(1.4 ± 1.02) X 10 ⁵	(6.8 ± 0.42) X 10 ⁴	(6.2 ± 0.6) X 10 ⁴	21.38
Al B.t.	(4.4 ± 0.11) X 10 ⁵	(4.4 ± 0.38) X 10 ⁵	(1.7 ± 0.87) X 10 ⁵	(1.2 ± 0.31) X 10 ⁵	(8.5 ± 0.18) X 10 ⁴	(5.5 ± 0.2) X 10 ⁴	12.50
Al B.t.r.c.*	(6.4 ± 0.53) X 10 ⁵	(6.7 ± 0.27) X 10 ⁵	(6.1 ± 0.80) X 10 ⁵	(5.7 ± 0.58) X 10 ⁵	(4.4 ± 0.16) X 10 ⁵	(1.3 ± 0.3) X 10 ⁵	20.31

^a Promedio de tres cuentas ± EE. los asteriscos marcan diferencia significativa entre los formulados y entre el tiempo de exposición al simulador solar, Tukey P<0.05

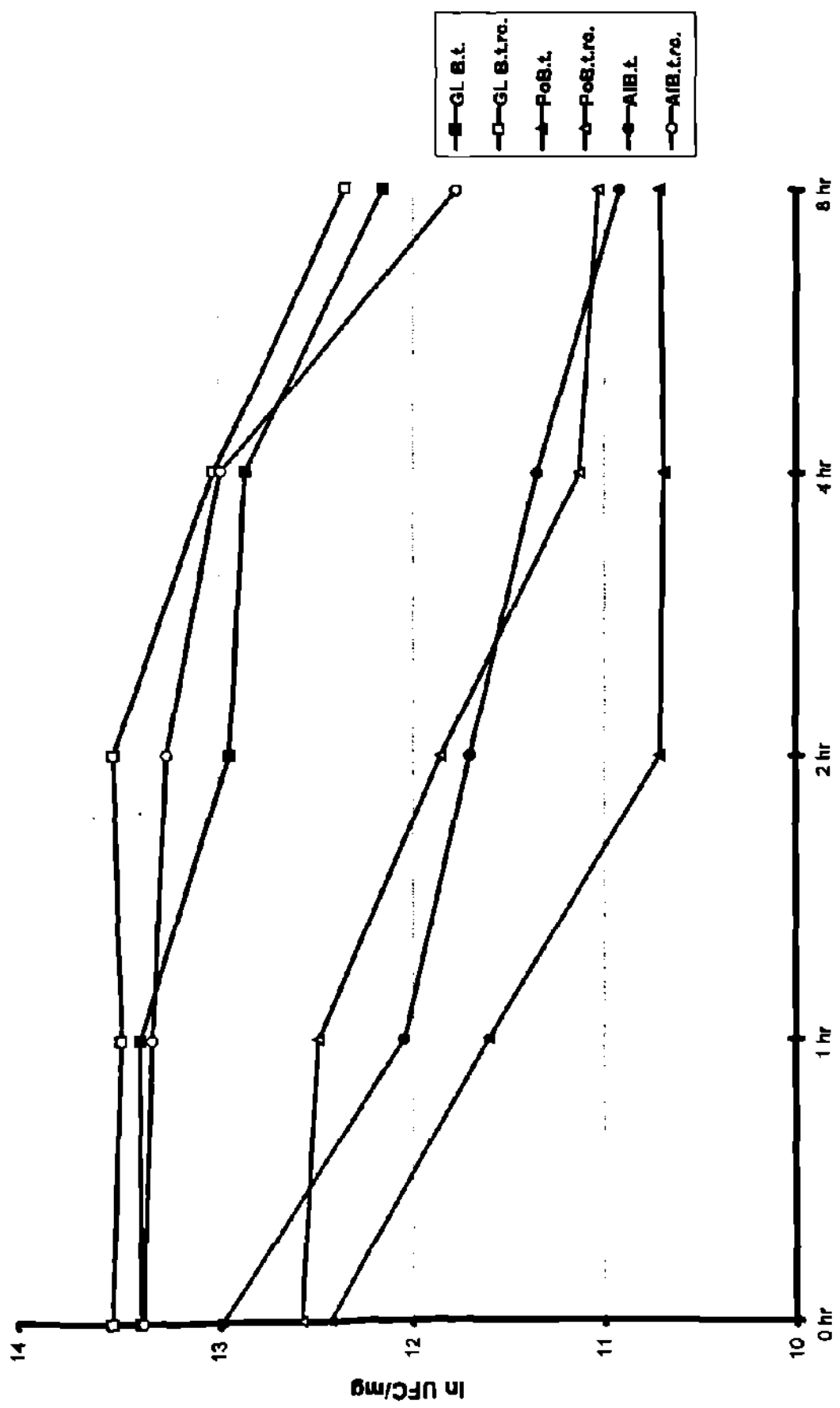


Figura 4. Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Viabilidad de las Esporas de *B. thuringiensis* en Diferentes Formulados

Tabla 17. Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Actividad Tóxica de *B. thuringiensis* en Diferentes Formulados Granulares contra *T. ni*

Formulación	Número de Larvas Muertas Media \pm EE ^a			
	0 h de Exposición	2 h de Exposición	4 h de Exposición	8 h de Exposición
GL B.t.	23 \pm 0.667	17 \pm 1.999	11.7 \pm 1.683	7.3 \pm 1.109
GL B.t.r.c.	23.7 \pm 1.113	21.7 \pm 2.446	19.3 \pm 1.777	12.7 \pm 0.447
Po B.t.	24.3 \pm 0.223	14.7 \pm 1.553	12.7 \pm 0.887	8.7 \pm 2.887
Po B.t. r.c.	23 \pm 0.667	19 \pm 1.333	15.7 \pm 0.673	12.3 \pm 1.777
Al B.t.	23.7 \pm 0.447	19.3 \pm 0.443	17.33 \pm 0.890	10.3 \pm 0.443
Al B.t.r.c.*	23.7 \pm 1.113	21.7 \pm 1.113	21.0 \pm 1.999	13.7 \pm 1.553
F(gI=5,12)	0.62	4.40	10.19	3.96
DMS(P<0.05)	3.03	6.16	5.45	5.93

^a Promedio de tres bicensayos \pm EE
Tukey P<0.05

Tabla 18. Efecto del Rojo Congo sobre la Actividad y Viabilidad de Diferentes Formulados de *B. thuringiensis* Expuestos a un Simulador de Luz Solar

Tiempo de Exposición (hr)	Medición	Media de los Formulados con Rojo Congo	Media de los Formulados sin Rojo Congo	t Student
0	Mortalidad	23.44	23.66	0.43
	Viabilidad	5.19 X 10 ⁵	4.14 X 10 ⁵	6.51*
0.5	Mortalidad	22.0	23.5	1.33
	Viabilidad	4.9 X 10 ⁵	3.83 X 10 ⁵	3.97*
1	Mortalidad	22.33	19.17	2.34
	Viabilidad	4.79 X 10 ⁵	2.27 X 10 ⁵	11.59*
2	Mortalidad	20.78	17.0	3.56*
	Viabilidad	3.8 X 10 ⁵	1.42 X 10 ⁵	21.53*
4	Mortalidad	18.89	13.89	5.34*
	Viabilidad	2.38 X 10 ⁵	1.13 X 10 ⁵	23.07*
8	Mortalidad	11.78	8.89	4.04*
	Viabilidad	1.21 X 10 ⁵	7.73 X 10 ⁴	5.86*

* Los asteriscos marcan diferencia significativa entre la Mortalidad o la Viabilidad, P<0.05, t de Student

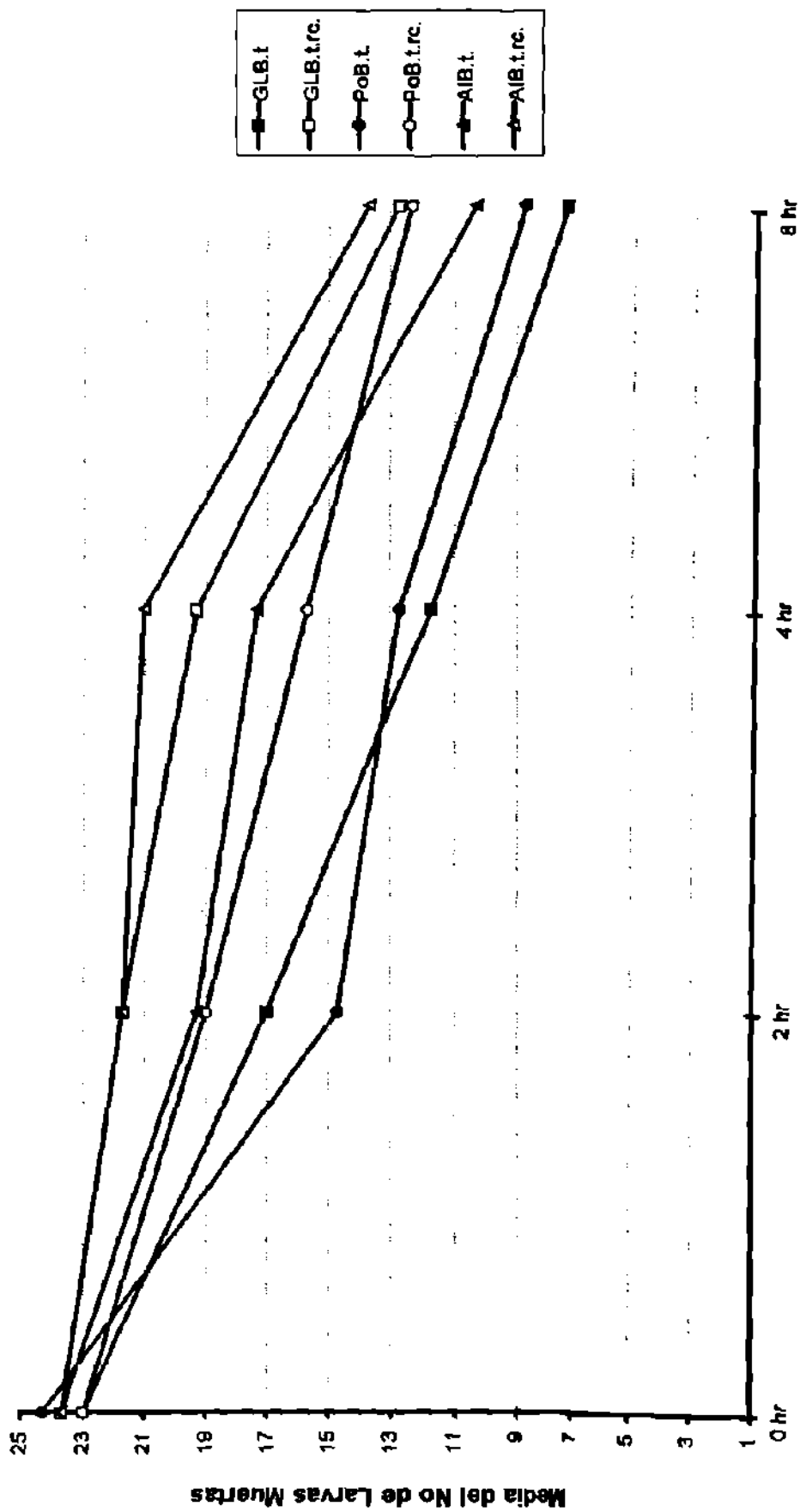


Figura 5. Efecto de Exposición a un Simulador Solar sobre la Actividad Tóxica de *B. thuringiensis* en Diferentes Formulados

DISCUSION

Los procesos de capsulación pueden ser agrupados en tres clases: métodos de separación de fases, métodos que involucran la reacción en la interfase y métodos físicos (Flinn & Nack 1967). En este trabajo se utilizaron métodos físicos para el atrapamiento de las esporas y cristales de *B. thuringiensis*.

El propósito de este estudio fue evaluar el uso potencial de varios polímeros para el atrapamiento de *Bacillus thuringiensis*. La originalidad de este trabajo radica en que los polímeros utilizados no se han empleado anteriormente como material soporte para la elaboración de formulados granulares de *B. thuringiensis* cepa GM-7. Los métodos utilizados para la formulación con gelatina o pectina, son una adaptación del método reportado por Dunkle y Shasha para almidón pregelatinizado. El método utilizado con alginato es un método ya utilizado con otros agentes bioinsecticidas. El método utilizado con quitina, está reportado como método para la inmovilización de glucosa-isomerasa, se consideró que podría funcionar para la toxina de *B. thuringiensis* por ser una proteína. Se demostró que la gelatina y pectina pueden ser utilizados exitosamente para elaborar formulados granulares de *B. thuringiensis*, el cual mantiene su actividad biológica, sus formulados poseen excelentes propiedades de adherencia, *B. thuringiensis* puede sobrevivir al procedimiento de atrapamiento y las larvas de *T. ni* aceptan alimentarse con gránulos elaborados con estas matrices poliméricas. Los formulados elaborados con quitina y alginato no mostraron buenas propiedades adherentes, no presentaron buenas propiedades fagoestimulantes para larvas de *T. ni* y su vida media en almacenamiento fue corta comparada con la obtenida para las formulaciones de gelatina, pectina y almidón.

Los datos demuestran que *B. thuringiensis* sobrevive y su actividad insecticida no cambió cuando fue formulado dentro de varias matrices poliméricas excepto para los formulados de quitina, en los que a pesar de tener una cuenta de UFC de 10^5 su actividad tóxica no fue mayor del 4% de mortalidad, posiblemente el uso de glutaraldehído para elaborar este formulado afecta a la δ -endotoxina, acomplejandola o desnaturalizandola. Se obtuvieron resultados similares en cuanto a mortalidad a los 7 días en los bioensayos con incorporación de los formulados de *B. thuringiensis* a la dieta artificial, comparados con los resultados obtenidos en los bioensayos con *B. thuringiensis* dentro de los formulados granulares. Cuando se compararon estadísticamente ambos tipos de bioensayo, con una prueba de rango múltiple de Tukey, no se encontró diferencia significativa entre la mortalidad

mortalidad obtenida a los 7 días con los formulados en forma granulada con *B. thuringiensis* al 1%. En cuanto a las diferentes matrices usadas, en ambos bioensayos se obtuvo una diferencia significativa con respecto a mortalidad contra *T. ni* entre el resto de los formulados y el formulado a base de quitina. Los formulados a base de pectina-isopropanol y de pectina-butanol fueron diferentes significativamente al resto de los formulados solamente en el bioensayo de incorporación a la dieta, en el bioensayo de 24 horas de exposición presentaron una mortalidad contra *T. ni* de 72% y 92% respectivamente. Esta diferencia, posiblemente fue originada por una falta de homogeneidad al incorporar los formulados en la dieta artificial de *T. ni*, por la naturaleza viscosa de la pectina. Cuando se trabaja con matrices de alta viscosidad como la pectina, el bioensayo de incorporación a la dieta es complicado y con las dosis altas es difícil homogenizar bien el formulado en la dieta por lo que se obtienen resultados variables como nos sucedió con los formulados de pectina-isopropanol y pectina-butanol, para este tipo de formulados es más factible y práctico utilizar el bioensayo de 24 h de exposición.

Después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, todos los formulados excepto, alginato (ATL) y quitina (Qcg) presentaron una cuenta de esporas de 10^5 UFC/mg, similar a los formulados recién preparados. A los nueve meses de almacenamiento se encontró diferencia significativa en cuanto a viabilidad de las esporas con respecto a los formulados recién preparados, y fue más evidente para los formulados de pectina-isopropanol (PI), alginato (ATL) y quitina (Qcg). Después de 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente todas las formulaciones perdieron viabilidad de las esporas excepto las formulaciones de gelatina (GL) y almidón (AI). En cuanto a la actividad tóxica de los diferentes formulados, no se observó pérdida con respecto a tiempo de almacenamiento, excepto para los formulados de alginato (ATL) que perdieron un 32 % de su actividad. El formulado a base de quitina, no poseía actividad insecticida desde su elaboración. Estos resultados sugieren que la estructura de la toxina no fue alterada y consecuentemente se mantuvo intacta durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Dulmage (1975), reporta que no existe una relación directa entre la actividad tóxica de *B. thuringiensis* y la viabilidad de las esporas. Esto explica porqué a pesar de obtener un decremento en la viabilidad de las esporas durante el almacenamiento a temperatura ambiente por 12 meses, no se observó alteración en la actividad tóxica de los formulados. Basándonos en los resultados es posible almacenar hasta por 12 meses los formulados de gelatina, pectina y almidón sin pérdida significativa de su

actividad tóxica, cabe recalcar que la temperatura máxima registrada durante el periodo de estudio fue de 32°C.

Cuando se utilizan biopolímeros para elaborar formulados de entomopatógenos granulares o microcapsulados, la aceptación del formulado por parte del insecto blanco es también un factor importante ya que estos deben ser ingeridos para ser efectivos. En este trabajo solo se probó la aceptación para las diferentes matrices usadas sin *B. thuringiensis* u otros aditivos, sin embargo los formulados pueden ser mejorados por incorporación de varios aditivos como fagoestimulantes, como ha sido demostrado por Bartell et al. (1990). Los datos obtenidos del bioensayo de preferencia sugieren que las larvas de *T. ni* preferencialmente se alimentan de tejido de hoja de lechuga, pero también los formulados a base de gelatina y pectina fueron aceptados como alimento por las larvas de *T. ni*. Sin embargo las larvas rechazaron alimentarse de los formulados a base de alginato y quitina. El rechazo de las larvas hacia los formulados de alginato, podría deberse a que en este tipo de formulado se utiliza CaCl para inducir la formación del gel y posiblemente en este formulado quedan residuos de CaCl, en trabajos anteriores se ha reportado este tipo de comportamiento con larvas de *Ostrinia nubilalis* con formulaciones a las que se les incorporó CaCl, Gillespie et al. (1994). El rechazo de las larvas de *T. ni* hacia los formulados de quitina podría deberse a la textura de la quitina.

El lavado por lluvia es uno de los factores que más afecta la persistencia y actividad de los agentes de biocontrol en campo incluyendo a *B. thuringiensis*. McGuire (1992), reporta que la adherencia de los gránulos puede llevar a un efecto residual mayor, manteniendo el insecticida en la zona de alimentación del insecto blanco. Nuestros resultados de adherencia a portaobjetos y hojas de algodón, mostraron que los biopolímeros de gelatina y pectina poseen las mejores propiedades adherentes, con respecto al resto de los polímeros probados. Los datos preliminares indican que la persistencia de *B. thuringiensis* puede ser mejorada por las propiedades adherentes de biopolímeros como la gelatina y pectina, los cuales podrían utilizarse en otras formulaciones para mejorar las propiedades adherentes de las mismas.

Nuestros mejores resultados a nivel de laboratorio se obtuvieron con los formulados de gelatina, pectina y alginato por lo que se seleccionaron para evaluar su eficacia a nivel de invernadero y campo. Se seleccionaron la formulación de pectina Po y gelatina GL, por que no involucra el uso de solventes para su formulación. Las tres matrices seleccionadas se formularon con *B. thuringiensis* al 1% sin rojo congo, y con *B. thuringiensis* al 1%, con rojo congo al 1%.

Los resultados obtenidos en invernadero con plantas de algodón, mostraron que en general los tres soportes son efectivos. En los bioensayos en invernadero las plantas de

algodón fueron sometidas a un régimen de riego durante 14 días, todos los formulados probados, a los 14 días aún conservaban más del 80% de su actividad tóxica contra larvas de *T. ni*, sin embargo se observó mejor actividad en los formulados sin rojo congo que en los que poseían rojo congo, aparentemente el rojo congo afectó las características adherentes de la gelatina, pectina y almidón, este efecto fue más marcado en los formulados de gelatina y almidón. Se encontró que el extracto libre de *B. thuringiensis* cepa GM-7, bajo considerablemente su eficacia a los 14 días de irrigación, debido a que se lavó de la superficie de las hojas. Con este tipo de experimento comprobamos que es posible mejorar la persistencia en el follaje y como consecuencia la eficacia de *B. thuringiensis* al utilizar biopolímeros con características adherentes como gelatina y pectina. Cuando se analizó el daño foliar, causado por *T. ni* en invernadero a plantas de algodón, se encontró una diferencia considerable entre el daño que presentaron los controles con respecto al daño en las plantas tratadas con los formulados con *B. thuringiensis*. Sin embargo no se encontró diferencia significativa en el daño foliar a plantas de algodón, entre los formulados sin rojo congo y con rojo congo.

En los resultados obtenidos en plantas de maíz en invernadero con larvas de *S. frugiperda*, se encontró diferencia significativa entre el número de larvas sobrevivientes en el control con respecto a los formulados blanco, también se obtuvo una diferencia significativa entre los formulados blanco y los formulados con *B. thuringiensis*, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los formulados con rojo congo y sin rojo congo, probablemente debido a que en el maíz el formulado se deposita en el cogollo de la planta, de manera que la adherencia no es un factor determinante, también en otros trabajos se ha encontrado que en cultivos como el maíz, la luz solar no es un factor importante de degradación para *B. thuringiensis* por que al ser depositado en el cogollo de la planta o en el axis de las hojas queda protegido de los rayos solares (McGuire *et al.*, 1994)

En lo que respecta al experimento de campo con maíz, solo se encontró diferencia significativa entre el formulado de pectina con *B. thuringiensis* y rojo congo con respecto al resto de los formulados, no se encontró diferencia significativa entre los controles y el resto de los formulados con *B. thuringiensis*. En este bioensayo se esperó una infestación natural, y la plaga que se presentó fue *Helicoverpa virescens* que es relativamente menos susceptible a *B. thuringiensis* cepa GM-7 que *T. ni* (DL_{50} para *H. virescens* = 30.8 $\mu\text{g/ml}$, DL_{50} para *T. ni* = 22.2 $\mu\text{g/ml}$)(Tamez Guerra, 1996). Es importante señalar que la concentración de principio activo utilizada en este trabajo está muy por debajo de las concentraciones que se usan comercialmente como en el caso de Dipel[®] que posee 7% del complejo espóra-cristal y en general se utiliza 3% del complejo espóra cristal. Las formulaciones se hicieron al 1 %, por

que a nivel de laboratorio e invernadero, se obtenía fácilmente un 100% de mortalidad con *T. ni*, por lo que se consideró innecesario el uso de concentraciones más elevadas, sin embargo cuando se extrapoló a nivel de campo, los resultados no fueron tan contrastantes como se esperaban, por lo que se considera que es necesario hacer más estudios incrementando el porcentaje de principio activo utilizado y ver el comportamiento de los formulados en otros tipos de cultivo, como el algodón, en donde los formulados no están tan protegidos de los factores ambientales como sucede en el maíz.

Está bien establecido el efecto de la luz solar sobre la pérdida de actividad de *B. thuringiensis* y otros entomopatógenos (Ignoffo, 1977; Ignoffo y Garcia, 1978). En los estudios con el simulador solar, se demostró que la actividad tóxica de *B. thuringiensis* se afectó en forma significativa después de 2 horas de exposición al simulador solar, también se encontró una diferencia significativa entre la toxicidad de los formulados sin rojo congo y los formulados con rojo congo. Después de 2 horas de exposición al simulador solar, los formulados con rojo congo conservaban en promedio el 83% de su actividad original y los formulados sin rojo congo conservaban el 68%, después de 8 horas de exposición al simulador solar los formulados con rojo congo conservaban el 52% de su actividad original en comparación con los formulados sin rojo congo que conservaban el 36 % de su actividad original. Con lo que respecta a viabilidad, también se vio afectada por la exposición al simulador solar. Después de 2 horas la viabilidad se redujo en un 27% para los formulados con rojo congo y en un 66% para los formulados sin rojo congo, a las 8 horas de exposición la viabilidad se redujo en un 77% y un 82% para los formulados con rojo congo y sin rojo congo respectivamente. McGuire, 1996, reporta que 8h de exposición en el simulador solar, corresponden aproximadamente a 3 días en el campo, se encontró diferencia significativa al utilizar rojo congo como protector de luz UV tanto en mortalidad como en viabilidad, sin embargo la protección que el rojo congo les confiere no sobrepasa los 3 días en campo, por lo que no se considera tan efectiva, por lo que probar otro tipo de protectores más efectivos, sería deseable.

Según nuestros resultados el rojo congo demostró ser un buen protector de luz solar, pero afecta la adherencia de los formulados, en los estudios de campo el uso de rojo congo no fue un factor determinante en la eficacia de los formulados, posiblemente por el tipo de cultivo usado.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los polímeros derivados de sobrantes o deshechos de productos agrícolas pueden ser usados para la formulación de bioinsecticidas como *B. thuringiensis*. Queda claro que los polímeros de diferentes fuentes poseen diferentes características. La gelatina y pectina nos dieron resultados aceptables en cuanto a

adherencia, aceptación por parte de las larvas de *T.ni*, vida de anaquel y actividad insecticida . La quitina no fue aceptable bajo nuestras mediciones. El alginato no posee características adherentes y no fue aceptado por las larvas pero *B. thuringiensis* sobrevivió al proceso de formulación. El almidón posee una aceptable vida de anaquel y actividad insecticida pero su adherencia y aceptación por parte de las larvas fue menor que con los otros formulados. Futuros trabajos podrían examinar la elaboración de formulaciones granulares y asperjables de *B. thuringiensis* y otros bioinsecticidas con otros métodos y materiales como un medio para extender la actividad residual e incrementar la eficacia y el uso de insecticidas microbianos para el control de plagas. El objetivo del presente trabajo fue aumentar la estabilidad y la persistencia de *B. thuringiensis* para efectuar un control mas efectivo de plagas agrícolas. Nuestros resultados demuestran que con el uso de polímeros como gelatina y pectina podemos incrementar la adherencia y por lo tanto la persistencia y la eficacia de *B. thuringiensis*, el uso de formulaciones granulares sin embargo restringe el tipo de cultivo al cual puede aplicarse, por lo que sería interesante el desarrollo de formulaciones asperjables con este tipo de polímeros.

CONCLUSIONES

- 1.- *B. thuringiensis* sobrevive y su actividad insecticida no cambió cuando fue formulado dentro de varias matrices poliméricas.
- 2.- La gelatina y la pectina pueden ser usados exitosamente para la elaboración de formulados granulares de *B. thuringiensis*, el cual mantiene su actividad biológica, después de su formulación con estos polímeros.
- 3.- Cuando se trabaja con polímeros viscosos como la gelatina y pectina, es mas efectivo utilizar el bioensayo de 24 h de exposición que el de incorporación a la dieta.
- 4.- Los formulados de gelatina, pectina y almidón pueden almacenarse a temperatura ambiente hasta por 12 meses sin pérdida de su actividad tóxica
- 5.- Los polímeros de gelatina y pectina son aceptados por larvas de *T. ni*, pero es posible mejorar su aceptación con la adición de ingredientes fagoestimulantes.
- 6.- La gelatina y pectina poseen las mejores características adherentes
- 7.- Los formulados de gelatina, pectina y almidón conservan en promedio un 80 % de su actividad tóxica inicial, después de 14 días de ser aplicados en hojas de algodón bajo un régimen de riego en condiciones de invernadero.
- 8.- El uso de rojo congo como protector de luz UV afecto la adherencia de los formulados de gelatina, pectina y almidón en hojas de algodón en condiciones de invernadero.
- 9.- Los formulados de gelatina, pectina y almidón fueron eficientes en los bioensayos en invernadero con plantas de maíz infestadas con larvas de *S. frugiperda*.
- 10.- En el de campo con maíz, solo se encontró diferencia significativa entre el formulado de pectina con *B. thuringiensis* y rojo congo con respecto al resto de los formulados.

- 11.- En los estudios con el simulador solar, se demostró que la actividad tóxica y la viabilidad de *B. thuringiensis* se afectó en forma significativa después de 2 horas de exposición al simulador solar.
- 12.- Se encontró una diferencia significativa entre la toxicidad y la viabilidad de los formulados sin rojo congo y los formulados con rojo congo expuestos al simulador solar.
- 13.- El rojo congo demostró ser un buen protector de luz solar, aunque su periodo de protección es corto y además afecta la adherencia de los formulados.
- 14.- La gelatina y pectina nos dieron resultados aceptables en cuanto a adherencia, aceptación por parte de las larvas de *T.ni*, vida de anaquel y actividad insecticida .
- 15.- La quitina no fue aceptable bajo nuestras mediciones.
- 16.- El alginato no posee características adherentes y no fue aceptado por las larvas pero *B. thuringiensis* sobrevivió al proceso de formulación.
- 17.- El almidón posee una aceptable vida de anaquel y actividad insecticida pero su adherencia y aceptación por parte de las larvas fue menor que con los otros formulados.

SUGERENCIAS PARA PROXIMAS INVESTIGACIONES

- 1.- Desarrollar formulados asperjables a base de gelatina y pectina**
- 2.- Evaluar los formulados a base de gelatina y pectina con diferentes fagoestimulantes para incrementar su aceptación y por consiguiente su eficacia.**
- 3.- Probar otros protectores de luz UV y medir su efecto en la adherencia a hojas de plantas.**
- 4.- Hacer más estudios incrementando el porcentaje de principio activo utilizado en las formulaciones con pectina y gelatina.**
- 5.- Probar los formulados granulares de pectina y gelatina con otros insectos blanco.**
- 6.- Hacer más pruebas de campo, para ver el comportamiento de los formulados en otros tipos de cultivo, como el algodón, en donde los formulados no están tan protegidos de los factores ambientales como sucede en el maíz.**
- 7.- Evaluar la pectina y la gelatina como aditivos para mejorar la adherencia en otro tipo de formulaciones**
- 8.- Utilizar estos polímeros para formular otros bioinsecticidas.**
- 9.- Evaluar el impacto ecológico que pudiera originarse por el uso de formulaciones de *B. thuringiensis* que presentan una mayor persistencia en el ambiente.**

LITERATURA CONSULTADA

- Aizawa, K. 1974.** Selection and Utilization of *Bacillus thuringiensis* Strains for Microbial Control. 1er. Intersectorial Congress of the International Association of Microbiological Societies. Tokyo, : 1-10.
- Aly, C., M.S. Mulla, W. Schnetter y B. Xu. 1987.** Floating Bait Formulations Increase Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Against Anopheles larvae. J. Am. Mosquito Control Assoc. 3, (4): 583-588.
- Angus, T.A. 1954.** A Bacterial Toxin Paralyzing Silkworm Larvae. Nature (London) 173 : 545-546.
- Angus, T.A., y P. Lüthy. 1971.** Formulations of Microbial Insecticides Chap. 28 en Microbial Control of Insects and Mites. H.D. Burgues Ed. Academic Press, New York, N.Y. : 623-638.
- Aranson, A.I., W. Beckman y P. Dunn. 1986.** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol Rev. 50: 1-24.
- Austin P.R., C.J. Brine, J.E. Castle y J.P. Zikakis. 1981.** Chitin: New facets of Research. Science, 212: 749-753.
- Axtell R.C. y D.R. Guzman. 1987.** Encapsulation of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* in calcium alginate. J. Am. Mosq. Control Assoc., 3: 450-459.
- Balaranan, K., y S.L. Hoti. 1988.** Comparative costs of mosquito control with larvicidal Bacilli and Insecticides. The Environmentalist. 8 (2): 123-126.
- Baker, C.A., A.A. Brooks, R.Z. Greenley y J.M.S. Henis. 1988.** Encapsulation of biological material especially for agricultural use by adding the material and polymer solution to non-solvent to form beads and drying. Monsanto. Patent # EP-320483.
- Barbera, C. 1976.** Pesticidas Agrícolas cap. 1 y 2, 2a. Edición. Ediciones Omega, S.A. : 9-46.
- 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.

Berk Z. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Editorial El Manual Moderno. México D.F. : 66-165.

Berliner, E. 1911. Über Die Schlaßsucht Der Mehlmottenraupe. Z. Gesamte Getreidewesen (Berlin) 3 : 63-70.

Berliner, E. 1915. Über Die Schlaßsucht Der Mehlmottenraupe. Z. Ang. Entomol., 2: 29-56.

Bernhard K. y R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses en "*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Entwistle P.F. et. al. (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapore.: 255-267.

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. Patent # WO8904170.

Bryant, J.E. y W.G. Yendol. 1988. Evaluation of the influence of droplet size and density of *Bacillus thuringiensis* (Lepidoptera:Lymantridae). J. Econ. Entomol., 81: 130-134.

Bull D.L., R.L. Ridgway, V.S. House y N.W. Pryor. 1976. Improved formulations of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol., 69: 731-736.

Burges, H.D. y J.A. Hurst. 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. J. Invert. Pathol., 30: 131-139.

Carruthers R.I., Z. Feng, M.E. Ramos y R.S. Soper. 1988. The effect of solar radiation on the survival of *Entomophaga grylli* (Entomophthorales:Entomophthoraceae) Conidia. J. Invertebr. Pathol., 52: 154-162.

Chen Fu-Sen, Hung-Shan Weng y Ching- Liang Lai. 1983. The performance of immobilized glucose isomerase supported by shrimp chitin in various types of reactors. Biotechnol.Bioing., 25: 725-733.

Connick W.J. 1988. Formulation of Living Biological Control Agents with Alginate. Capitulo 19. en Pesticide Formulations: Innovations and Developments. Cross B. y H.B. Scher (Eds.). American Chemical Society. Washington D.C. : 241-250.

Connick W.J., J.A. Lewis y P.C. Quimby. 1989. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 112.

Couch, T.L. 1978. Formulations of Microbial Insecticides. Conventional Formulations. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, **10** (5): 3-10.

Daoust, R.A. 1990. Commercialization of Bacterial Insecticides. VTH International Colloquium on Invertebr. Pathol. and Microbial control. Proceeding and abstracts. Adelaide, Australia,: 7-11.

Debabov, V. G., Azizbekyan, R. R., Stepanov, V. M. y G. G. Chestukhina. 1984. Genetic and biochemical study of *Bacillus thuringiensis*. En Genetics and biotechnology of Bacilli. A. T. Ganesan y J. A. Hoch ed. Academic Press Inc, New York, U. S. A.. pp 345-359.

De Barjac, H. y A. Bonnefoi 1962. Essai de Classification Biochemique et Serologique de 24 Souches de *Bacillus* du Type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*. **7**: 5-31.

De Barjac, H. y E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains. *Entomophaga*. **35**: 233-240.

DeLucca, A. J. y J. M. Bland. 1990. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol fomulations. *J. of Ind. Microbiol.* **6** : 129-13

Dommergues Y.R., H.G. Diem y C. Divies. 1979. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 779-781.

Donovan, W. P., Rugar, M. J., Staney, A. C., Malvar, T., Gawron-Burke y T. B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein toxic to coleoptera species. *Appl. Envirom. Microbiol.* **58**: 3921-3927.

Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invert. Pathol.* **15**: 232-239.

Dulmage,H.T. y R.A. Rhodes. 1971. Production of Pathogens in Artificial Media, in Microbial Control of Insects and Mites (Eds. H.D. Burges and N.W. Hussey). pp. 507-540. Academic Press, London.

Dulmage, H.T. 1973. Assay and Standarization of Microbial Insecticides. *Ann. New York. Acad. Sc.* **217**: 187-199.

Dulmage, H.T. y E. Martínez. 1973. The Effects of Continuous Exposure to Low Concentration of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the Development of the Tobacco Budworm *Heliothis virescens*. *J. Invertr. Pathol.* **22**: 14-22.

Dulmage, H.T. 1975. The Standarization of Formulations of the Endotoxins Produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **25**: 276-281.

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 sunlight. Environ. Entomol. 18:1035-1041.

Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs. 1993. en "*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Entwistle P.F. et. al. (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapore.: 1-311.

Elçin Y.M. 1995. *Bacillus sphaericus* 2362-Calcium Alginate Microcapsules for Mosquito Control. Enzyme Microb. Technol. 17: 587-591.

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

Fischhoff, D.A., K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.M. McCormick, J.G. Niedermeyer, D.A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester, S.G. Rogers y R.T. Fraley. 1987. Insect Tolerant Transgenic Tomato Plants. Bio/Technology. 5: 807-813.

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

Frankenhuyzen K.V. 1993. The Challenge of *Bacillus thuringiensis* . en "*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Entwistle P.F. et. al. (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapore.: 1-23.

Frankenhuyzen, K.V. y F. Ortiz. 1990. Thirty Years of *Bacillus thuringiensis* research pays off " En Forest pest management Institute Newsletter ". Jamieson K.B. ed. 9 (1), Foresty, Forests, Canada, : 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.

Frost, y Sullivan. 1990. Biopesticides: A technology impact report, Frost & Sullivan Inc. New York., N.Y.: 1-23.

Fox, J.L. 1995. EPA Okays Bt Com; USDA Eases Plant Testing. Biotechnology. 13. 1035-1036

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 *Trichoplusia ni* (Hubne), *Heliothis virescens* (Fabricius)(Lepidóptera:Noctuidae). Tesis de Doctorado en Ciencias especialidad en Microbiología. Fac. de Ciencias Biológicas. División de Estudios de Posgrado, U.A.N.L. Monterrey, N.L. Méx.

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.

Gelernter, W.D. 1990. MVP TN Bioinsecticide: A Bioengineered, Bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae VTH. International Colloquium on Invertebr. Pathol. and Microbial Control. Proceeding and Abstracts. Adelaide, Australia. : 14.

Gelernter W. y G.E. Schwab. 1993. Transgenic Bacteria, Viruses, Algae and Other Microorganisms as *Bacillus thuringiensis* Toxin Delivery Systems. en "*Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice". (Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs Eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto.Singapore. : 89-104.

Gill S.S., E.A. Cowels y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, **37**: 615-636.

Gillespie, R.L., M.R. McGuire y B.S. Shasha. 1994. Palatibility of Flour Granular Formulations to European Corn Borer Larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **87**: 452-457.

Granados, R.R. 1981. Insecticidas Microbiológicos. IV Simposium sobre Parasitología Agrícola. : 1-13.

Griego, V.M. y K.D. Spence. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible lighth. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 906-910.

Guerra, A.A. y T.N. Shaver. 1968. A Bioassay Technique for Screening Feeding Stimulants for Larvae of Tobacco Budworm. *J. Econ. Entomol.* **61**: 1398-1399.

Hall, F.R. 1990. Controlled Delivery y Foliar Spraying. Capitulo 1. en "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M. Ed.). Taylor & Francis. London. N.Y. Philadelphia. 3-15

Hannay, C.L. 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore-Forming Bacteria. *Nature* (London), **172**: 1004.

Harms, R.G., D.R. Martinez y V.M. Griego. 1986. Isolation and Characterization of Coproporphyrin produced by four subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 481-486.

Höfte, H. y R. H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.

Hough-Goldstein J., A.M. Tisler, G.W. Zehnder y K.A. Uyeda. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. *J. Econ. Entomol.*, **84**: 87-93.

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

Ignoffo, C.M., D.L. Hostetter, P.P. Sikorowski, G. Sutter y W.M. Brooks. 1977. Inactivation of Representative Species of Entomopathogenic Viruses, a Bacterium, Fungus and Protozoan by an Ultraviolet Light Source. *Environ. Entomol.* **6**: 411-415.

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.

Ignoffo, C.M., 1979. Bioinsecticides. Capítulo 1 en "Microbial Technology. Microbial Processes". Vol. 1 (Pipler and Perlman Ed.). Academic Press : 1-27.

Jaques, R.P. y C.J.S. Fox. 1960. The influence of Stickers on the effectiveness of Sprays of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and *Bacillus entomocidus* var. *entomocidus*. *J. Insect Pathol.*, **2**: 17-23.

Kase L.E. y P.L. Branton. 1983. Floating article for control of aquatic insects- comprises cork granules surrounded by moulding plaster containing *Bacillus thuringiensis*. Sumitomo Chemical. Patent # US4631857.

Kaya H.K. y C.E. Nelsen. 1985. Encapsulation of steinemematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: A new approach for insect control and other applications. *Environ. Entomol.*, **14**: 572-574.

Kennedy J.F., B. Kalogerakis y J.M.S. Cabral. 1984. Surface immobilization and entrapping of enzymes on glutaraldehyde crosslinked gelatin particles. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**: 127-131.

- Khachatourians, G.G. 1986.** Production and Use of Biological Pest. Control Agents. *Tibetch.* : 120-124.
- Kinsinger, R.A. y McGaughey, W.H. 1979.** Susceptibility of Populations of Indian Meal Moth and Almond Moth to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 72: 346-349.
- Knorr D. 1991.** Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.*, 45: 114-122.
- Krieg, A. 1965.** Bioassay and Standarization of *Bacillus thuringiensis*. Preparations spore- endotoxine Complex. *Entomophaga.* 10: 49-54.
- Krywienczyk, J., H.T. Dulmage, y P.G. Fast. 1978.** Occurrence of Two Serologically Distinct groups within *Bacillus thuringiensis* Serotype 3a,b var. *kurstaki*. *J. Invert. Pathol.* 31: 372-375.
- Lacey, L.A., M.S. Mulla y H.T. Dulmage. 1978.** Some Factors Affecting the Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner Against Black flies. *Environ. Entomol.* 7: 583-588.
- Lacey, L.A., M.J. Urbina y C.M. Heitzman. 1984.** Sustained release formulations of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H14) for control of container-breeding *Culex quinquefasciatus*. *Mosq. News.* 44: 26-32.
- Lacey L.A. 1984.** Production and Fomulation of *Bacillus sphaericus*. *Mosquito News.* 44. 153-159.
- Lambert, B. y M. Peferoen. 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience.* 42: 112-122.
- Leemans, J., A. Reynaerts, H. Höfte, M. Peferoen, H. Van Mellaert y H. Joos. 1990.** Insecticidal Crystal Protein Genes from *Bacillus thuringiensis* and Their Use in Transgenic Crops. en "New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases". (Alan R. Liss Ed.): 573-581.
- Lereclus D., A. Delécluse y M.M. Lecadet. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. en "*Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice". (Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs Eds.). *Johon Wiley & Sons.* Chichester, N.Y. Brisbane. Toronto.Singapore. : 37-41.
- Levinson, B.L. 1988.** Biopesticide for use on tanning-containing plants: Containing a mixture of *Bacillus thuringiensis* toxin, tanning-binding compound and carrier. *Ecogen. Patent.* # 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.

Lewis, F.B. 1983. Formulation and Application of Microbial Insecticides for Forest Insect Pest Management: Problems and Considerations. *Pesticide Formulations: Third Symposium*.

Lewis, J.A. y G.C. Papavizas. 1984. Proliferation of *Trichoderma* and *Gliocladium* from Alginate Pellets In Natural Soil and Reduction of *Rhizoctonia solani* Inoculum. *Phytopathology*. **74**: 836.

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. Invert. Pathol.* **62**:131-136.

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

Magnas, J.C. 1963. Preparation of Microbial Insecticide. United States Patent Office. pp. 1-18.

Margalit J., A. Markus y Z. Pelah. 1984. Effect of Encapsulation on the Persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Serotype H-14. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 382-383.

Marrone P.G. y S.C. Macintosh. 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and Resistance Management. en "*Bacillus thuringiensis* an Environmental Biopesticide: Theory and Practice". (Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs Eds.). John Wiley & Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.: 221-235.

Meadows J., S.S. Gill y L. W. Bone. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. *Invertebr. Reprod. Dev.* **17**:73-76.

Meadows M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the Environment: Ecology and Risk Assessment. en "*Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice". (Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs Eds.). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto.Singapore. : 193-220.

Mechalas. 1963. Method for the production of microbial insecticides. U. S. Patent # 3'086,922.

Megna, J. C. 1963. Preparation of Microbial Insecticide. U. S. Patent # 3'073,749.

Metcalfs, W.P. y Flint, C. 1979. Insectos Destructivos e Insectos Utiles Ed. CECSA, 8a. Ed. :448-455.

McCown, B.H., D.E. McCabe, D.R. Russell, D.J. Robinson, K.A. Barton y K.F. Raffa. 1991. Stable Transformation of Populus and Incorporation of Pest Resistance by Electric Discharge Particle Acceleration. Plant Cell Reports, 9: 590-594.

McGaughey W.H. y R.W. Beeman. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Colonies of the Indian Meal Moth and Almond Moth (Lep.:Pyralidae). J. Econ. Entomol. 81: 28-33.

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., 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.

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

McGuire, M.R. 1991. Encapsulation of pesticides in starch. Annual Agricultural Outlook Conference. USDA. Washington, D.C.

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 y T.C. Nelson. 1994. Residual Activity of Granular Starch-Encapsulated *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 87: 631-637.

McGuire, M.R., R.L. Gillespie y B.S. Shasha. 1994. Survival of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) After Exposure to *Bacillus thuringiensis* Berliner Encapsulated in Flour Matrices. J. Entomol. Sci. 29: 496-508.

McGuire, M.R., B.S. Shasha, C.E. Eastman y H. Oloumi-Sadeghi. 1996. Starch and Flour-Based Sprayable Formulations: Effect on Rainfastness and Solar Stability of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 89: 863-869.

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

Morales, L.H. 1993. Formulación de bioinsecticidas. Capítulo No 10. en "Biotecnología para la Producción de Bioinsecticidas Microbianos Centrada en *Bacillus thuringiensis*". (Galán Wong L.J. Ed.) UNAM, México, D.F. : 85-90.

Nambiar, P.T. C., S.W. Ma, y V.N. Iyer. 1990. Limiting and Insect Infestation of Nitrogen-Fixing Root Nodules of the Pigeon Pea by Engineering the Expression of an Entomocidal Gene in its Root Nodules. *Appl. Env. Microbiol.* **56**: 2866-2869.

Norris, J.R. 1964. The Classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **27**: 439-447.

Obukowicz, M.G., F.J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer, S.L. Bolten y L.S. Watrud. 1986. Tn5-mediated Integration of the Delta-endotoxin Gene from *Bacillus thuringiensis* into the Chromosome of Root-Colonizing *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **168**: 982-989.

Pääkkönen K., y L. Plit. 1991. Equilibrium Moisture Content and State of Water in Chitin. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **24**:259-262.

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

Payne, J.M., J.C.R. Cannon y A.L. Bagley. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides. International Patent. Application number PCT/US92/03546. Publication Number WO 92/19106.

Pereira, R.M. y D.W. Roberts. 1991. Alginate and Cornstarch Mycelial Formulations of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econ. Entomol.* **84**: 1657- 1661.

Perlak, F.J., R.W. Deaton, T.A. Armstrong, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate y D.A. Fischhoff. 1990. Insect Resistent Cotton Plants. *Bio/Technology.* **8**: 939-943.

Pimentel, D., H. Acquay, M. Biltonen, P. Rice, M. Silva J. Nelson, V. Lipner, S. Giordano, A. Horowitz, y M. D' Amore. 1992. Environmental and economic costs of pesticide use. *BioScience* . **42**: 750-760.

Pozsgay, M., P. Fast, H. Kaplan y P.R. Carey. 1987. The effect of Sunlight on the Protein Crystal from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: a Raman Spectroscopic Study. *J. Invertebr. Pathol.* **50**: 246-253.

Pristavko, W. P. 1965. On the use of *Bacillus thuringiensis* insecticide combinations to control insect pests. Resumen VI-5. pp 212-214.

Pruett, C.J.H., H.D. Burges, y C.H. Wyborn. 1980. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* **35**: 168-174.

Quisumbing A.R. y A.F. Kydonieus, 1990. Controlled-release Technologies for Pest Management. Capitulo 3. en "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M. Ed.) Taylor & Francis. London. N.Y. Philadelphia. 43-58.

Rechapel-Messal, J. 1990. Les pesticides. *Biofutur*. Juillet/Aout. pp 23-34. Simone, A. 1991. Research on biological pest control moves ahead. *Science.* **252**: 211-212.

Rhodes D.J., K.A. Powell, M.P. Macqueen y M.P. Graves.1990. Controlled Delivery of Biological Control Agents. Capitulo 11. en "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M. Ed.) Taylor & Francis. London. N.Y. Philadelphia. 215-231.

Roberts, D.W., J.R. Fuxa, R. Gaugler, M. Goettel, R. Jaques y J. Maddox. 1991. Use of pathogens in insect control. en "CRC Handbook of Pest Management in Agriculture". (D. Pimentel y H.A. Angus Eds.), CRC Press, Boca Ratón, Fl. 2:243-278.

Rombach, M.C., R.M. Aguda, L. Picard y D.W. Roberts. 1989. Arrested Feeding of the Asiatic Rice Borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **82**: 416-419.

Rowe, G.E. y A. Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. en "Critical Reviews of Biotechnology". (G.G. Stewart y E. I. Russel Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Fl. **6**: 87-127.

Salama H.S. y O.N. Morris. 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in Developing Countries en "*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Entwistle P.F. et. al. (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapore.: 237-253.

Sawicka, E.M. y T.L. Couch. 1983. Formulations of entomopathogens, pesticide formulations and application systems: Third Symposium, ASTM STP. (T.M. Kaneko and N.B. Akesson, Eds.). American Society for Testing and Materials, Philadelphia.: 5-11.

Shahidi F. y Xlao-Qing Han. 1993. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**(6):501-547.

Shasha, B.S. y M.R. McGuire. 1989. Sprayable formulations of biological control agents-containing starch and sugary material. US Secretary of Agriculture. Patent # US7389090.

Shasha, B.S. y M.R. McGuire. 1991. Slow release formulations of pesticides. en "Pesticide Formulations and Application System". (A.D.G. Chasing and L.E. Bode Eds.). American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

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

Skot, I.,S.P. Harrison, A. Nath, L.R. Mytton y B.C. Clifford. 1990. Expression of Insecticidal Activity in Rhizobium Containing the delta-endotoxina Gene Cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Plant Soil*. **127**: 285-295.

Smirnof, W.A. y P.M. Hutchison. 1965. Bacteriostatic and Bacteriocidal. Effects of Extracts of Foliage from Various Plants Species on *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol.* **7**: 273-280.

Smirnof, W.A. 1971. Effect of Chitinase on the Action of *Bacillus thuringiensis*. *Can. Entomol.* **103**: 1829-1831.

Smirnof, W.A. 1974. The Symptons of Infection by *Bacillus thuringiensis* & Chitinase Formulation in larvae of *Choristoneura funiferana*. *J. Invertebr. Pathol.* **23**: 397-399.

Soper, R.S. y G.W. Michael. 1980. Production, Fomulation and Application of Fungi for Insect Control in Beltsville Symposia in Agricultural Research.

Stock, C.A., T.J. McLoughlin, J.A. Klein y M.J. Adang. 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene in *Pseudomonas cepacia* 526. *Can J. Microbiol.* **36**: 879-884.

Stormo K.E. y R.L. Crawford. 1992. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 727-730.

Szalay-Marzó, L. 1971. Effect of Fungicides and Insecticides on the Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Preparations. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hungar.* **6**: 295-307.

Tamez Guerra P. 1996. Formulaciones Granulares y Microcapsulados de Diferentes Serovarietades de *Bacillus thuringiensis*. Tesis Doctorado en Ciencias con Esp. en Microbiología. División de Estudios de Posgrado. Fac. de Ciencias Biológicas U.A.N.L.

Tabashnik B.E., N. Finson, M.W. Johnson y D.G. Heckel. 1994. Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIF in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 60: 4627-4629.

Trevors J.T. 1991. Respiratory activity of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells introduced into soil. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35: 416-419.

Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. de Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. van Montagu y J. Leemans. 1987. Transgenic Plants Protected from Insect Attack. Nature (London), 328: 33-37.

Valenzuela, L.E. 1987. Microorganismos Entomopatógenos. Su Aprovechamiento en el control de insectos plaga. Dirección Gral. de Patronato Uni., U.A.Chapingo.: 83-88.

Van Rie, J. 1991. Insect control with transgenic plants: resistance proof?. Tibtech.

Walker H.L. y W.J. Connick. 1983. Sodium Alginate for Production and Formulation of Mycoherbicides. Weed Sci. 31: 333-338.

Weiser, J. 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on Applied Entomology in Eastern Europe and in the Soviet Union. en "Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem". (A. Krieg y A.M. Hunger Eds.). 233: 37-50.

Wilkins R.M. 1990. Biodegradable Polymer Methods. Capitulo 8 en "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M. Ed.). Taylor & Francis. London, New York, Philadelphia.: 149-165.

Wing R.E. y T.H. Otey. 1983. Determination of reaction variables for the starch xanthide encapsulation of pesticides. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 21: 121-140.

Wofford J.T., R.G. Luttrell y D.B. Smith. 1987. Relative effect of dosage, droplet size, deposit density, and droplet concentration on mortality of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae treated with vegetable-oil and water sprays containing permethrin. J. Econ. Entomol., 80: 460-464.

Zahora A.R. y M.E. Corden. 1985. Gelatin Encapsulation of Methylisothiocyanate for Control of Wood-decay Fungi. J. For. Prod. 35: 64-69.

Zomer E., A. Spielman y J.B. Perrone. 1989. Encapsulated bacterium containing insect toxin with polymer coating permeable to insect digestive enzymes but preventing environmental degradation. Harvard Collage. Patent # WO8907447.

