

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son insectos que se encuentran distribuidos en todo el mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde las larvas y pupas siempre son acuáticas, (Faust *et al* 1974) Dentro de la subfamilia *Culicidae* destacan cuatro géneros de importancia médica, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* y *Armigeres*; *Culex quinquefasciatus* es un vector importante de filariasis, *C. tritaeniorhynchus* transmite la encefalitis japonesa, (Service 1986), en tanto que *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: *Culicidae*) es un vector de enfermedades virales como la fiebre amarilla, dengue clásico y dengue hemorrágico. La distribución del mosquito está limitada por la latitud, dada la incapacidad que tienen para soportar el invierno en los lugares donde la temperatura es más baja. Anualmente el pico de infecciones en nuestro país ocurre en octubre y noviembre, después de la temporada de lluvias, presentándose epidemias locales de marzo a junio. En 1985 se reportaron 17,706 casos de dengue clásico en el país, (Reyes-Villanueva, 1990) mientras que en los años posteriores 1997 y 1998 se reportaron cerca de 500 000 casos en toda América, (PAHO, 1998) con brotes locales, principalmente en los meses ya mencionados, siendo esto un problema de salud pública en varios estados de la República y de las zonas tropicales de América.

El empleo de tácticas efectivas de control del mosquito es quizá la única manera por la cual las enfermedades transmitidas por estos insectos sean prevenidas o controladas (WHO, 1982). En los pasados 50 años este control involucró el uso de larvicidas y adulticidas químicos, que aunque fueron inicialmente efectivos, eventualmente resultaron en el desarrollo de resistencia en las poblaciones de mosquitos blanco, supresión severa de organismos no blanco y/o contaminación general del ambiente (Klowden *et al.* 1983).

De esta manera es importante el uso de estrategias necesarias para manejar las poblaciones, tal como el empleo del control biológico. Dentro de estos agentes *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) ha demostrado ampliamente su efectividad, además de sus ventajas de seguridad ambiental, especificidad, bajas

efectividad, además de sus ventajas de seguridad ambiental, especificidad, bajas expectativas de desarrollo de resistencia en los insectos, además de la relativa facilidad de su producción a gran escala así como la estabilidad de almacenamiento y vida media larga (Su y Mulla, 1999).

Esta bacteria produce una protoxina o cristal tóxico durante la esporulación, (Angus 1954) denominada δ -endotoxina que son depositadas como inclusiones junto con la espora y son altamente tóxicas para los insectos susceptibles, quienes deben ingerirlas para que se ejerza su acción, posteriormente la protoxina se disuelve en el pH alcalino del intestino medio del insecto, se activan proteolíticamente y se unen a receptores específicos localizados en la superficie de las membranas epiteliales (Aronson, 1986; Baumann *et al*, 1991; Höfte y Whiteley, 1989), como consecuencia, las células se destruyen, la larva cesa de alimentarse y muere.

Hasta la fecha, se han utilizado diferentes preparaciones de esta bacteria, tales como líquidos, polvos, gránulos, pellets, microgránulos y otros, que se aplican a los sitios de criaderos dependiendo de la especie de mosquito (Thiéry *et al*, 1996)

Sin embargo a pesar de sus diversos atributos, las formulaciones a base de este microorganismo presentan ciertas desventajas, como son la sedimentación rápida de la toxina en el ambiente acuático donde se aplica, así como la degradación que sufre debido a la acción de la luz ultravioleta del sol, por lo que tratamos de resolver estos problemas que impiden la prolongación de la actividad, mediante la incorporación de sustancias de liberación lenta así como fotoprotectores solares, que incluyen diversos cromóforos.

A nivel local se ha implementado gran parte de la biotecnología de la producción de este microorganismo principalmente para el control de lepidópteros, sin embargo nosotros tratamos de contribuir a complementar nuestro conocimiento en el control de dípteros tales como mosquitos de los géneros *Aedes* y *Culex* en las diversas etapas como producción del extracto insecticida a nivel semipiloto, formulación, y evaluación tanto a nivel de laboratorio como de campo.

ANTECEDENTES

Actualmente se conocen 82 serovariedades de *Bacillus thuringiensis*. (Lecadet *et al.* 1999). De estos serotipos, solamente algunos presentan toxicidad hacia dípteros; entre estos se mencionan las subespecies *israelensis* (Goldberg y Margalit, 1977), *morrisoni* (Padua y col, 1984), *fukuokaensis* (Yu *et al* 1991), *darmstadiensis* (Padua y col, 1980) *kyushuensis* (Ohba y Aizawa, 1979) *medellin* (Orduz *et al*, 1992), además de una nueva cepa, denominada subsp. *jegathesan* (Kawalek *et al* 1995), también se encontró que la δ -endotoxina cryIC de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-229, activa contra lepidópteros, fue tóxica contra *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* y *Culex quinquefasciatus* (Smith *et al* 1996). La variedad *israelensis*, aislada inicialmente en Israel por Goldberg & Margalit, (1977), y caracterizada por De Barjac (1978) como serotipo H-14, es considerada la más tóxica e importante, de tal forma que los productos elaborados a base de ella han sido exitosamente aplicados en el campo, como agente de control biológico de mosquitos y moscas negras, en diversas partes del mundo (Guillet *et al* 1982; Lacey *et al*, 1982; Mulla *et al* , 1982; Foo y Yap 1982; García *et al* 1983), una alternativa importante al tradicional control químico.

Además de estas cepas tóxicas identificadas dentro de diversos serotipos, recientemente un grupo de investigadores importantes en el área propuso un nuevo sistema de clasificación de los genes cry y cyt, basado únicamente en la similitud de la secuencia de aminoácidos deducida (Crickmore *et al* 1995). En esta nueva clasificación se entiende como gen cry a todo aquel gene de Bt que codifique para una proteína parasporal que exhiba actividad plaguicida o algún efecto tóxico verificable experimentalmente hacia algún organismo blanco, o bien aquel que tenga una notable similitud de secuencia con las proteínas cry conocidas. Del mismo modo, un gen cyt será todo aquel gen de Bt que codifique para alguna proteína parasporal que exhiba actividad hemolítica o una similitud de secuencia obvia con las proteínas cry reportadas. Sólo se consideran aquellas secuencias presentes en algún banco de datos (Lorence-Quifiones y Quintero-Ramírez, 1996).

Dentro de esta nueva clasificación, se han descubierto las proteínas cry con actividad tóxica para dípteros, como las siguientes: a) la toxina Cry2Aa tiene actividad dual para lepidópteros y dípteros, (Donovan *et al* 1988a); b) Toxinas Cry 10, se denominaba antes Cry IVC, se produce como protoxina de 78 kDa y genera un fragmento activo de 58 kDa después del procesamiento, y fue aislada de una cepa del serotipo *israelensis*; c) toxinas Cry 11. Son dos holotipos representativos de la clase cry11, 11Aa y 11Ba (antes Cry IVD Y Jeg80, respectivamente). La primera se produce como un producto inactivo de 72 kDa que una vez procesado rinde un fragmento de 30 kDa. La segunda es una protoxina de aproximadamente 80 kDa y fue aislada a partir de una cepa correspondiente al serotipo *jegathesan* (Donovan *et al* 1988c; Delécluse *et al*, 1995; Kawalek *et al* 1995). d) Toxinas cry 14. Cry14 Aa es el único miembro de esta clase, que hasta hace poco se le conocía como cry VD. El gen correspondiente fue clonado a partir de una cepa del serotipo *sotto*. En su forma inactiva esta proteína pesa 72 kDa, y una vez activada es tóxica contra dípteros y coleópteros (Donovan *et al* 1988; Narva, *et al*, 1994).

1.- Factores que afectan la actividad de la δ -endotoxina

La gran potencia y especificidad de Bti, su velocidad de acción, aunado a su ausencia de efectos sobre otros organismos no blanco, propició su rápido desarrollo comercial a partir de su descubrimiento a fines de la década de los 70', de manera que, a la par que se efectuaban estudios de clasificación y caracterización, se realizaban pruebas de toxicidad tanto en laboratorio como en campo, contra diversas especies de dípteros. Estas primeras formulaciones experimentales se hicieron a base de polvos primarios, elaborados por los Laboratorios Roger Bellom en París Francia, con los cuales se obtuvo control contra larvas de simúlidos vectores de la Oncocercosis en Africa (Guillet y Escaffre, 1978). A partir de 1979, comenzó el desarrollo de formulaciones comerciales, por lo que se realizaron diversas investigaciones encaminadas a evaluar los distintos productos manufacturados por algunas compañías (Sandoz, Abbott y Biochem Products), en aplicaciones terrestres y aéreas, sobre una gran variedad de hábitats y especies de mosquitos culícidos, (Mulla

et al, 1982; Lacey *et al*, 1982; Guillet *et al*, 1982; García *et al*, 1983; Majori y All, 1984), también se determinó el impacto de los factores intrínsecos y extrínsecos del hábitat en la efectividad del producto sobre la especie blanco (García *et al* 1979; Schaefer *et al* 1980). Se demostró que Bti es inactivo sobre organismos acuáticos no blanco, su acción tóxica se reduce a especies de Dípteros Nematoceros de la familia Culicidae, Simulidae y Chironomidae. Diversos factores tienen influencia en la efectividad de los formulados a base de Bti, cuando se aplican en el campo, tales como edad de la larva, la vegetación circundante, la ausencia de contaminación, temperatura del agua, constituyentes del suelo (Hall *et al*, 1977; Van Essen y Hembree, 1980, 1982) así como el pH, cloro libre, profundidad y forma del criadero, tal como lo reportaron Sinigre *et al* (1981). Las conclusiones que obtuvieron de sus trabajos fueron que las larvas jóvenes fueron más susceptibles que las de mayor edad, debido a que los estadios larvales mayores consumen menor cantidad de alimento; en el caso de hábitats con vegetación densa, fue menos efectivo el control, en tanto que en ambientes contaminados se requiere mayor cantidad de producto; la temperatura del agua tiene una influencia moderada, el rango óptimo para la acción de la δ -endotoxina varía entre 19-33°C, debido a que a esta temperatura es mayor el metabolismo y actividad de alimentación de las larvas; la salinidad del agua se considera sin efecto, lo mismo que la forma y profundidad del criadero, dentro de ciertos límites, mientras que el cloro libre inhibe la acción de la toxina, así como la presencia de constituyentes del suelo, que se asocia con la pérdida de actividad larvívora.

El efecto de la baja temperatura en la actividad de la toxina fue comprobado también por Walker (1995) quien realizó experimentos para determinar los efectos de la baja temperatura (0 y 4 °C) contra alta temperatura (22°C), sobre la tasa de alimentación de larvas de *Aedes stimulans* y su susceptibilidad a Bti; las larvas disminuyeron la velocidad de alimentación, pero no pararon a 0 y 4° C, comparado a 22° C, mientras que la susceptibilidad, medida por los valores de CL₅₀, fue más alta a 22° C (CL₅₀=0.1 ppm) y menos a 4°C (CL₅₀= 0.2 ppm) y 0°C (CL₅₀=0.9 ppm) Estos

datos de experimentos de susceptibilidad y alimentación, sugieren que la eficacia disminuida de Bti a bajas temperaturas puede ocurrir debido a que la tasa de alimentación larval disminuye y debe ser considerada durante las aplicaciones operacionales de Bti para control larval en habitats de agua fría.

Una vez liberada la espora y el cristal en el medio acuático, donde generalmente se aplica el insecticida, se hundirán lentamente, y la proporción a la cual esto ocurre y el grado que permanezcan en el fondo, son factores en la persistencia del efecto larvicida. Algunos reportes indican que la tasa de sedimentación depende en parte de la naturaleza de los materiales particulados en el agua y su densidad, ya que existe una correlación negativa entre la densidad de las partículas suspendidas y el nivel de la actividad larvicida, (Lacey *et al*, 1984); como en el caso de la arcilla y carbón activado, a los cuales la toxina de Bti. tiene una tendencia mayor a adherirse y sedimentar junto con ellas (Yousten *et al*, 1992); además, el hecho de que su toxicidad carezca de residualidad, hace que desde el punto de vista económico sea una desventaja y lo convierta en poco atractivo, ya que la bacteria no se reproduce en los cuerpos de agua en forma natural, y su efecto tóxico desaparece de los criaderos de mosquitos en 24-48 horas después de su aplicación, ya que se destruye la toxina por la luz ultravioleta del sol (Puztai *et al* 1991). Debido a este y otros inconvenientes, que interfieren en la efectividad de la toxina, tales como el comportamiento alimenticio distinto de las diferentes especies de mosquitos culícidos y la edad de las larvas, se han intentado desarrollar formulaciones donde se incluyen diversas sustancias como dispersantes, fagoestimulantes, y coadyuvantes.

2.-Biotecnología de *B. thuringiensis var. israelensis*

En los últimos años ha sido extensa la información relativa a la optimización de la producción del bioinsecticida, también como reducción de los costos y desarrollo de formulaciones, así como considerable investigación en ingeniería genética.

2. 1. Medios de producción.

La producción de bioinsecticidas requiere del diseño de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento, esporulación y formación de la δ -endotoxina. Obviamente se tendrá que satisfacer el suministro de una fuente de Carbono adecuada, una fuente de Nitrógeno y requerimientos minerales, por lo que a manera de antecedentes, mencionaremos los trabajos realizados en materia de producción, específicamente con la variedad *israelensis* H-14. Así tenemos que en un documento de la Organización Mundial de la Salud, (WHO, 1979), se refiere a la preparación del estándar de referencia IPS- 78, en un medio compuesto por los siguientes ingredientes, (en g/l): Harina de trigo 15, glucosa 10, peptona 5, extracto de levadura 5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 3, y FeSO_4 0.1.

Por otra parte Smith, (1982), cultivó tres cepas de Bti en seis medios de fermentación, en casi todos usó glucosa como fuente de carbono y como fuente de Nitrógeno, diversos productos como harina de soya, harina de maíz, extracto de levadura, caldo nutritivo, casaminoácidos y proflo (Harina de semilla de algodón), adicionados todos con sales minerales como KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , CaCl_2 , K_2HPO_4 , CaCO_3 , FeSO_4 y ZnSO_4 , citrato de sodio, fosfato de sodio y amonio. Las cuentas de esporas/ ml obtenidas, variaron en el rango de 1×10^4 a 8.9×10^8 , y los medios que mostraron niveles mayores de crecimiento, así como también mayor toxicidad, fueron en primer lugar, los que contenían casaminoácidos, después los constituidos por proflo y extracto de levadura; sin encontrar diferencia en toxicidad en los medios con reguladores que sin reguladores de fosfatos; sin embargo, concluyó que es necesario hacer bioensayos para evaluar un producto y evitar hacer cuentas de esporas solamente.

La Organización Mundial de la Salud, como parte de uno de sus programas en países tropicales, auspició el delineamiento de las bases para la producción local de Bti en países en desarrollo; de acuerdo con esto, Vandekar y Dulmage, (1983), junto con otros investigadores prepararon un documento, donde señalaron los procedimientos para el cultivo, producción, recuperación, control de calidad y bioensayos de bioinsecticidas a base de Bti. Entre los ejemplos de materiales potenciales baratos disponibles en diversos países, para la producción de Bti se

mencionan el agua de coco, suero de leche, melazas, líquido de remojo de maíz, entre los sustratos líquidos, y también semillas de leguminosas secas y molidas, como chícharo, cacahuate, haba, soya, frijol, garbanzo, otros materiales, como maíz, papa y levadura seca, levadura húmeda, y materiales de origen animal como harina de pescado y harina de sangre entre los sólidos. Recomiendan también usar las fuentes de carbono y nitrógeno balanceadas, de tal forma que el pH de la fermentación se mantenga en niveles no muy extremos; asimismo, resaltan las propiedades nutritivas del líquido de remojo de maíz, como un importante cofactor de crecimiento en estos medios. En cuanto a los minerales mencionan cinco iones particularmente importantes en el crecimiento y esporulación de *Bacillus*: Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , y Ca^{++} , de tal forma que aunque estén normalmente presentes en las fuentes de carbono y nitrógeno usadas, tales como la melaza y harinas de leguminosas, es conveniente agregar a los medios en las cantidades siguientes, en g/l : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.02, y $CaCO_3$ 1.0.

Mas adelante, Obeta y Okafor (1984), en Nigeria, formularon cinco medios para la producción de δ -endotoxina de Bti. a partir de semillas de leguminosas molidas tales como *Arachis hypogea*, *Vigna unguiculata*, *Glycine soja* y *Voandzeia subterranean*, además, el medio basal contenía, en g/l, sangre seca de res 10, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, y $CaCO_3$ 1.0, observándose buen crecimiento en todos los medios; después de 70-80 h de fermentación, los extractos insecticidas obtenidos los probaron contra larvas de tres especies de mosquitos; el producido en el medio con semillas de *Voandzeia subterranean* fue el más efectivo, comparado favorablemente contra el estándar IPS-78, y las concentraciones letales medias obtenidas contra larvas de *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles gambiae* fueron de 1.13×10^{-2} , 1.83×10^{-2} y 2.25×10^{-2} mg/ml, respectivamente.

Posteriormente, Pearson y Ward, (1988), en sus estudios de fermentación con Bti, evaluaron distintos medios tanto para la obtención del inóculo, como para la producción. Usaron un sistema de dos pasos para la preparación del inóculo, en el

primero de los cuales un medio compuesto por agua triptonada y sales y para el segundo, el medio empleado contenía, en g/l : extracto de levadura 2.5, líquido de remojo de maíz 5, y melazas 5; exhibiendo este último densidades celulares superiores a 31×10^7 /ml. Para la producción usaron cinco medios ya previamente descritos por Drake y Smythe (1963), Megna (1963), Dulmage (1971) y CRC (1978); obtuvieron cuentas viables dentro del rango de $0.3- 2.5 \times 10^9$ / ml, con 90 % de lisis celular. Cabe hacer notar que todos estos medios contenían un exceso significativo de carbohidrato: proteína. Para el proceso de selección hicieron variaciones de los medios de producción anteriores y determinaron que el medio P3 (a) de Dulmage, (1971), compuesto de, (g/l), harina de soya 15, melazas 10, almidón 10 y CaCO_3 1.0, produjo el mayor rendimiento y actividad insecticida, con una población de 3×10^9 células viables/ ml y más del 90% de lisis celular en una fermentación de 48 horas, alcanzando una actividad insecticida de $11.5-13.0 \times 10^4$ UTI/ ml, a nivel de matraz. Posteriormente, al escalar el proceso a nivel de planta piloto obtuvieron 6.5×10^9 células viables / ml con más del 95% de esporulación. Concluyeron señalando que los medios ricos en contenido de proteína inhibieron la esporulación, y los medios convenientes para esporulación y formación de bioinsecticida contenían tasas altas de carbohidrato a proteína, y en general existió buena correlación entre las cuentas de esporas y la actividad insecticida. Sikdar *et al* (1991), en su trabajo realizado para determinar los requerimientos minerales de Bti en la producción de la δ -endotoxina, probaron un rango de concentraciones desde 0-1.5 g/l; las óptimas encontradas fueron de 1 para K_2HPO_4 , 0.3 para $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, y 1.0 para CaCO_3 estos dos últimos minerales, en concordancia con Vandekar y Dulmage, (1983). También encontraron que el CaCl_2 dió el mismo rendimiento de toxina que el CaCO_3 , solo que hay ventaja al utilizar este último, por que puede usarse como fuente de calcio y como agente neutralizante; por otra parte, no encontraron relación directa entre el crecimiento celular y la producción de δ -endotoxina. En su estudio sobre la caracterización de las condiciones de fermentación para la producción de δ -endotoxina de Bti, con cepas aisladas en Egipto, Abdel-Hameed *et al*, (1991), usaron seis medios de fermentación, combinando tres ingredientes principales: melaza,

harina de soya y Proflo, en un rango de concentraciones de 2-5 % las dos últimas y la primera de 0-2 %.

Aunque las seis combinaciones de medios dieron buen crecimiento y esporulación, la combinación compuesta por 1% de melaza y 3 % de harina de soya, dió el mejor rendimiento de toxina; concluyeron que la producción de toxina fue más afectada por la concentración de melazas que por la concentración de harina de soya en los rangos probados, ya que el medio sin melazas dió un rendimiento de 55% menos de aquel obtenido con 1 % de melaza.

Maldonado-Blanco (1994), propagó siete cepas de Bti en seis medios de fermentación constituidos por materias utilizadas en nutrición animal y subproductos agroindustriales tales como harina de soya, harina de pescado, pasta de soya, gluten de maíz, melazas, harinolina (residuo de semilla de algodón), líquido de remojo de maíz y un subproducto de la fabricación de pastas para sopa (pasta en polvo); obtuvo buen crecimiento y esporulación de las diferentes cepas bacterianas, sin embargo, los resultados de las evaluaciones de los cultivos totales bacterianos obtenidos contra larvas de cuarto estadio temprano de *Aedes aegypti*, determinaron que los cultivos más tóxicos fueron los producidos en medio con melazas, pasta en polvo y líquido de remojo de maíz, dicho medio, formulado posteriormente para optimizar actividad insecticida y producción, con 1% de melaza, 3% de pasta en polvo y 1% de líquido de remojo de maíz, produjo el extracto insecticida más potente, con una CL_{50} de 0.0317 mg/l, y una potencia de 4,400 unidades tóxicas internacionales /mg contra *Aedes aegypti*.

2. 2. Condiciones de fermentación.

2. 2.1 Inóculo.

Vandekar y Dulmage (1983), propusieron un procedimiento estándar para estudios de fermentación en matraces agitados, que consiste en un inóculo de dos

pasos que se prepara en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de caldo- triptosa-fosfato, se incuba en agitación a 340 rpm. y a una temperatura de 30°C durante 12 horas. Después se toma un volumen de 2% para inocular un matraz similar, incubar bajo las mismas condiciones y finalmente tomar un 2% de volumen de inóculo para las series de fermentaciones; mientras que Pearson y Ward,(1988), emplearon también un inóculo de dos pasos, en un medio rico en contenido de proteína, con células vegetativas de 24 horas de edad, propagado a 30°C de temperatura y agitación de 150 rpm, de este cultivo tomaron un 5 % v/v para las series de fermentación.

En tanto, Abdel-Hameed *et al*, (1991) usaron un inóculo de tres pasos, cultivado en caldo TYG (triptona, extracto de levadura y glucosa) con células de seis horas de edad en cada paso, incubados a temperatura de 28°C y agitación de 180 rpm; después usaron un 2 % de este inóculo en TYG para sembrar en el medio de producción, el cual incubaron por 15 horas a las mismas condiciones anteriores

2. 2. 2. Temperatura y pH

Los rangos de temperatura para crecimiento de B.t. están en los límites de 20-42° C, pero el crecimiento cercano a esta última cifra generalmente resulta en pérdida de la producción de δ -endotoxina (Insell, 1983) La producción óptima de endotoxina ocurre a 28-32° C (Vandekar y Dulmage 1983), mientras que Pearson y Ward, (1988) emplearon exactamente 30°C en todos sus experimentos. Más adelante, Abdel-Hameed *et al* (1991) probaron un rango de temperatura de 28-33° C y determinaron el efecto sobre la producción de toxina; encontraron que influyó en forma importante, ya que disminuyó a 90 y 45%, comparado con el rendimiento a 30°C cuando las temperaturas de incubación se mantuvieron a 28 y 33° C respectivamente. En lo referente a pH, el crecimiento de esta bacteria ocurre entre 5.6 a 8.5, generalmente el pH inicial usual es de 6.8 a 7.2, disminuye típicamente a 5.8 cuando se libera el acetato, sin embargo, se eleva a 7.5-8.0 cuando se consume este último, (Dulmage 1981).

Abdel-Hameed *et al* (1991) determinaron también el efecto del pH en la producción de toxina de Bti, en un rango de 6.5 - 8.0 y encontraron que la

producción no fué afectada por cambios en el rango de 6.5 - 7.5, pero cuando se incrementó a 8.0 el rendimiento fue de un 50% menos, que el obtenido a pH de 7; cuando no usaron ningún control de pH el rendimiento fue de un 80% del óptimo.

2. 2. 3. Agitación y Aireación.

Para el crecimiento se requiere el oxígeno, (Jarai 1972). La demanda de oxígeno de un proceso de fermentación se satisface normalmente mediante aireación y agitación del caldo de fermentación, (Karow *et al*, 1953, Linek *et al* 1988); sin embargo, la productividad de la mayoría de las fermentaciones está limitada por la disponibilidad de oxígeno. Algunos autores han mencionado que son esenciales velocidades de aireación altas para la formación de espora y toxina, (Dulmage, 1981, Lüthy *et al*, 1982, Zamola *et al* 1981). En experimentos con matraces, Vandekar y Dulmage (1983) recomiendan una agitación de 340 rpm, mientras que Pearson y Ward (1988), emplearon solo 150 rpm y obtuvieron buena esporulación y producción de δ -endotoxina de Bti. En su reporte, Abdel-Hameed *et al* (1991) emplearon varios niveles de agitación, de 100 a 400 rpm y volúmenes de aireación de 0.37 a 1.25 vol/vol min^{-1} , en sus estudios realizados en fermentadores de 8 l de volumen de trabajo; concluyeron que su valor óptimo para la agitación fue de 200 rpm, ya que tasas de agitación mayores causaron un decremento gradual en el rendimiento de toxina, mismo efecto logrado con tasas de agitación menores a la óptima; mientras que en lo referente a la aireación, tasas de 0.37 a 0.62 vol/vol min^{-1} resultaron en rendimientos igualmente potentes.

3.-ESTANDARIZACIÓN

En la Universidad de California, Hall y Arakawa (1980) sugirieron un método de bioensayo estandarizado, para determinar la potencia de los formulados preparados a nivel de laboratorio; esto surgió de un trabajo conjunto de investigadores del Departamento de Agricultura de Estados Unidos en Texas, Florida y Louisiana, e incluyó el uso del Estándar Internacional IPS-78, desarrollado por el Centro

Internacional de Referencia en *B. thuringiensis*, establecido en el Instituto Pasteur de París, elaborado a partir de la cepa de Bti aislada en Israel, al cual se le asignó una potencia arbitraria de 1,000 Unidades Tóxicas Internacionales/mg contra *Aedes aegypti* cepa Bora Bora (De Barjac, 1979; WHO 1979; WHO 1982). Dicho estándar fue empleado para la evaluación de todas las formulaciones producidas hasta entonces.

Posteriormente, en 1982, elaboraron otro estándar, el IPS-82, basado en el anterior, con una potencia de 15,000 Unidades Tóxicas Internacionales por miligramo (UTI/mg) sobre la misma especie de prueba; este producto sería el sustituto del anterior y hasta la fecha, es el estándar reconocido internacionalmente para evaluar todas las formulaciones producidas a base de Bti (Vandekar y Dulmage, 1983).

Actualmente se ha descubierto una heterogeneidad tanto en el estándar IPS-82, como en la cepa original ONR- 60A, con base en estudios de la composición de ácidos grasos celular, mediante cromatografía gas-líquido de estas cepas, depositadas en diversas colecciones de cultivo del mundo, tales como el Instituto Pasteur, El Bacillus Genetic Stock Center, el USDA *Bacillus thuringiensis* culture collection; esto fue realizado por Siegel, Smith y Novak (1995), quienes analizaron la composición de ácidos grasos celular de Bti, e identificaron once cepas en ONR-60A y tres en IPS-82, también analizaron algunos de los productos comerciales recientemente producidos y determinaron que aproximadamente 84% del material fue identificado como perteneciente a las cepas encontradas en ONR-60A e IPS-82, por lo que formularon tres hipótesis para esta variabilidad: la diversidad puede haber estado presente en el aislado original de ONR-60A, o puede haber resultado de los efectos acumulativos de mutaciones espontáneas, combinadas con la introducción de contaminantes sobre los pasados 18 años.

Además de lo anterior, diversos estudios llevados a cabo por Skovmand *et al* (1997), quienes investigaron diversos parámetros que influyen en la potencia de los productos de Bti, encontraron que el tamaño de partícula del polvo estándar o formulados de Bti afecta la CL₅₀ y la pendiente, y por lo tanto la potencia del

producto, en bioensayos contra *Aedes aegypti*. Estos investigadores analizaron tanto productos líquidos, como polvos, así como el estándar IPS-82, aplicando diferentes tiempos de sonicación lo que originó diferentes tamaños de partícula, esto es, extendiéndose el tiempo de sonicación resultó en una frecuencia mayor de pequeñas partículas y una significativamente más baja frecuencia de partículas grandes; en general, las muestras fluidas produjeron pendientes más grandes que las muestras de polvo, de tal manera que para todas las muestras hubo una correlación negativa entre pendiente y tamaño medio de partícula, demostraron también que cambiando el tamaño de partícula, cambia la CL_{50} de los productos, de tal forma que disminuyendo el tamaño de partícula, también baja la CL_{50} , y de esta manera se incrementa la potencia calculada, y a la inversa, incrementando el tamaño de partícula, se aumenta la CL_{50} , y la potencia disminuye. Recomendaron que cuando se realicen bioensayos para determinar la actividad de los productos de Bti, estos deben ser homogenizados al mismo tamaño de partícula.

Continuando con la investigación acerca de la variabilidad del estándar IPS-82 y productos a base de Bti, Skovmand *et al* (1998) realizaron una prueba para determinar las variaciones interlaboratorio de los bioensayos de estos productos. Para esto, reunieron los datos de seis laboratorios donde se ensayan regularmente estas preparaciones, tales como Novo Nordisk, de Dinamarca, Instituto Pasteur, EID-Mediterrannée, y ORSTOM de Francia, KABS, de Alemania en cooperación con el Instituto de Salud Pública de Praga y Benzon Research de Estados Unidos, quienes analizaron el estándar IPS-82, y un producto fluido, proporcionado por Novo Nordisk, siguiendo los protocolos de la OMS y del Depto. de Agricultura de Estados Unidos, se examinaron los factores que pudieran influir en los resultados, tales como edad, estadio de la larva de prueba, cepa de larva usada, cantidad y tipo de alimento proporcionado a la larva, y procesamiento de las muestras; entre los resultados obtenidos, encontraron significativas diferencias en los valores de potencia y CL_{50} entre laboratorios, para ambos el producto fluido y el estándar internacional IPS-82, que no pudieron explicarse por el uso de diferentes temperaturas de cría, diferentes

cepas de *Aedes aegypti*, o el uso de larvas de tercer estadio tardío contra el recomendado cuarto estadio temprano. Entre laboratorios, la variación en la CL₅₀ fue mayor para el estándar, que para el producto fluido, mientras que dentro de laboratorios, la variación en la CL₅₀ del estándar fue mayor que la del producto fluido; de acuerdo con esto, la mayoría de las variaciones encontradas en las determinaciones de potencia fueron debidas a la variación en la CL₅₀ del estándar. En conclusión, ellos mencionan que las desviaciones de los protocolos estándar, con relación al estadio larval, temperatura mantenida durante la prueba y régimen de luz pueden no ser tan importantes como las diferencias en el procesamiento de la muestra y las condiciones de cría antes del ensayo, por lo que proponen que un protocolo de prueba debe especificar condiciones de cría larval, tales como tipo de alimento y esquema de alimentación, densidad larval, métodos de tratamiento de la muestra, el tamaño de los vasos de bioensayo y la densidad de las larvas en cada vaso.

En los últimos años se llevó a cabo una prueba de estabilidad del Estándar IPS-82 de Bti y SPH88 de *Bacillus sphaericus* por Thiéry y Hamon (1998), del Instituto Pasteur, donde evaluaron estos polvos estándares a lo largo de 16 años para IPS-82 y 9 años para SPH88, con evaluaciones mensuales para cada año transcurrido; los resultados obtenidos mostraron que la potencia se mantuvo estable, ya que la media global de cada media de año para IPS-82 fue de 0.012 ± 0.0020 mg/l en *Aedes aegypti* cepa Bora-Bora y mostró un coeficiente de variación de 16%, mientras que para el estándar SPH88 la media global sobre el período de 9 años fue de 0.0091 ± 0.0018 mg/l en *Cx. Pipiens*, con un coeficiente de variación de 19%; entre otros resultados los autores consideraron que la cría larval fue el factor más importante en la reproducibilidad del bioensayo, aunque alguna variación también se originó de la persona que lo realizó. Adicionalmente mostraron que el estándar SPH88 puede ser guardado en una suspensión stock a 4° C por tres años sin pérdida de potencia.

4.-FORMULACIÓN

En una investigación llevada a cabo por Levy *et al*, (1984) y Perich *et al* (1987), usaron formulaciones comerciales mezcladas con Arosurf®, una película monomolecular de superficie, cuyo efecto consiste en la modificación fisicoquímica de la interfase del agua del hábitat de los mosquitos; evaluaron estos productos en laboratorio y campo contra *Anopheles albimanus* y los resultados que obtuvieron fueron satisfactorios tanto como larvicida como pupicida, adicionalmente se observó compatibilidad en la mezcla con Teknar®, Vectobac® y Bactimos®, en las cuales se usó agua como base en las formulaciones.

En similar trabajo Aly *et al* (1987) desarrollaron una formulación de superficie con un atrayente alimenticio, para esto probaron mezclas de diversas sustancias, tales como aceite de maíz, lecitina de soya, Arosurf® y Liparol®, disueltos en tetracloruro de carbono y mezclados con harina de trigo en concentraciones de 1, 5 y 25% en peso. A cada mezcla se determinó su acción dispersante, (con un tensiómetro) y fagoestimulante, exponiendo larvas de *Anopheles albimanus*; los resultados revelaron que la mayor reducción (36%), en la tensión superficial los causó el Arosurf®, cuando se mezcló en un 5%, mientras que el aceite de maíz fue un buen fagoestimulante y que además induce una reducción de la tensión superficial. El uso de estos coadyuvantes que brinden acción dispersante y fagoestimulante puede ser una forma de resolver la ineficiencia de algunos formulados de Bti contra larvas de anofelinos; sin embargo, para la selección de una formulación en particular debe tomarse en consideración varios factores como la especie en particular de que se trate, el hábito alimenticio en relación a la profundidad del criadero y otros (Weiser, 1991).

Margalit *et al* (1984) señalaron las características que debe poseer una formulación de Bti.: a) lenta liberación del ingrediente activo, de esta manera extendiendo su vida residual, b) incremento en eficacia, especialmente en agua lodosa, donde la formulación normal de Bti, rápidamente pierde su efectividad, y c) potencia de flotación alta, asegurando que Bti permanezca en la superficie del agua donde la larva se encuentra. Estos investigadores formularon la toxina de Bti. en

polietileno de baja densidad, adicionado con extracto de levadura como fagoestimulante y obtuvieron efectividad en larvas de *Aedes aegypti* hasta por 37 días en agua con ciemo, con una concentración de 0.4 ppm, en condiciones de laboratorio, simulando condiciones naturales.

Además, en el estudio llevado a cabo en Florida, por Lacey *et al* (1984), probaron diferentes formulaciones de Bti, y *B. sphaericus*; suspensiones de polvos humectables, Bactimos® W.P. comparados con pellets flotantes de lenta liberación, formulados con azúcar y polvo de polipropileno (29.8% de ingrediente activo); además Bactimos® Briquetas formuladas con 5% de ingrediente activo y 95% de ingrediente inerte, para el control de *Culex quinquefasciatus*, en recipientes de 15 y 8 litros.; los resultados que obtuvieron mostraron que a la concentración de 1 mg de polvo /l las suspensiones de Bti y *B. sphaericus* proporcionaron completo control de las larvas, sin embargo, este control duró casi una semana, mientras que el Bactimos W. P. formulado en los pellets flotantes proporcionó un control limitado por algunas semanas y fue marcadamente inferior a la briqueta de Bactimos; la mitad de la briqueta dio completo control por 3 semanas, aunque la efectividad declinó en tanto los constituyentes de la briqueta se hundieron. Todos los tratamientos con *B. sphaericus* proporcionaron un continuo y excelente control por las 8 semanas de observación. Estos Investigadores concluyeron que, en cuanto a requerimientos de formulación se refiere, dependerá de los habitats y conducta de los mosquitos blanco, así como del nivel de control y duración de la actividad residual que se desee, también señalaron los objetivos que son deseables para futuras formulaciones contra mosquitos: mejoramiento de la actividad, mediante la mayor estabilidad y contacto maximizado con la larva blanco, incremento de la facilidad de manejo y aumento de la actividad residual.

Recientemente también se elaboraron diferentes formulaciones de plaguicidas y agentes de control biológico utilizando una tecnología de formulación en diferentes matrices poliméricas; este proceso es ampliamente usado para la inmovilización de enzimas y células con aplicación en la industria de alimentos, química, farmacéutica y

otras, consiste en la formación de una película delgada, de un polímero, resina, vidrio o metal alrededor de un gas, líquido o sólido para producir un formulado (Morales-Ramos, 1996); este concepto de formular patógenos no es nuevo, Raun y Jackson, (1966), utilizaron este método para mantener la viabilidad de las esporas de *Bacillus thuringiensis* utilizando gránulos de talco, su eficacia fue confirmada tanto en laboratorio como en campo.

Por otra parte, diversos Investigadores en Estados Unidos, han desarrollado formulados en matrices de almidón (Dunkle y Shasha, 1988) empleados en el control de lepidópteros. Asimismo, también se pensó en la utilización de diversos cromóforos, como protectores de luz UV, para agregar a las formulaciones, debido a que la toxina de Bti al igual que la de otras serovariedades de Bt se destruye por la luz ultravioleta del sol (Pusztai *et al* 1991). Entre algunas de estas sustancias se encuentra el rojo congo, empleado por Shapiro (1989), como fotoprotector para el virus de la nucleopoliedrosis, en diversos formulados elaborados para el control de *Lymantria dispar* L.; las concentraciones usadas del agente fueron 1.0, 0.50, 0.25 y 0.10% y los formulados conteniendo el virus fueron expuestos a la radiación de lámparas de alta intensidad durante 60 minutos; aún a concentración del 0.10%, el rojo congo mejoró la persistencia del patógeno y el efecto fue dependiente de la concentración, sin embargo, cuando se empleó 1.0%, la actividad viral original permaneció sin pérdida, esto es, 100%, después de la exposición a la radiación ultravioleta.

Bohm y Friend, (1988), utilizaron un polímero llamado Eudragit para formular Baculovirus o *Bacillus thuringiensis*, formando partículas suaves y digestibles, además incorporaron verde de malaquita, como protector de la luz solar.

Por su parte, Liu *et al* (1993), investigaron el pigmento melanina producido por *Streptomyces lividans* 66, en la protección de la actividad larvica de mosquito de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* al exponer la toxina a dosis de

radiación ultravioleta de 1.34×10^5 J/m², a la longitud de onda de 253 nm y determinaron que la toxina perdía toda actividad, sin embargo, en la presencia de 0.8 a 3.4 µg/ml de melanina la actividad tóxica de Bti fue casi completamente protegida de la radiación UV a la misma dosis empleada.

En el trabajo realizado por Castro-Franco (1994), con *B. thuringiensis* GM-10 var. *aizawai*, formulado con extracto de *Agave lechuguilla*, para el control de *Spodoptera frugiperda*, probó tres fotoprotectores, rojo congo, verde de malaquita y carbón vegetal, a una concentración de 0.05% cada uno; después de la exposición a la luz ultravioleta encontró que los formulados preparados con verde de malaquita produjeron un 78.4% de mortalidad, aquellos con rojo congo 70.2, y los de carbón vegetal 45.8, contra las larvas de prueba, estadísticamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Duncan, por lo que el más efectivo fue el verde de malaquita, ya que perdió sólo un 22% de la actividad original.

Otro de los polímeros naturales empleado en formulaciones contra mosquito es el alginato, cuya composición química es un copolímero lineal de α -L guluronato y β -D manuronato, uno de los pocos polisacáridos soluble en agua y extraído del alga gigante *Macrocystis pyrifera* pertenecientes a la familia de las Phaeophyceae (Connick, 1988).

Este polímero fue empleado por Murat-Elcin, (1995), en formulaciones de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de *Culex sp.* para examinar el efecto de la concentración de alginato, en proporción de 1, 1.5 y 2% sobre la viabilidad de las esporas, así como la actividad larvicida en el laboratorio, en diferentes ambientes de pH, químicos, luz uv. y alta temperatura. Entre los resultados obtenidos se menciona que la actividad tóxica no disminuyó en ambientes ácidos, aún con la toxina no formulada; sin embargo, las esporas de *B. sphaericus* fueron afectadas por el pH, disminuyendo a casi cero viabilidad a pH 3, cuando se encontraban libres (sin formular) mientras que las encapsuladas en alginato al 1.5% disminuyeron a casi la mitad de las iniciales (4×10^5 UFC/ml), al cabo de 15 días, permaneciendo aún 4×10^4 esporas después de 60 días. En cuanto a la persistencia de las esporas después de la exposición por 12 h a luz ultravioleta, redujo las esporas viables de 1×10^8 hasta

8×10^3 , cuando se encontraban en forma libre (no encapsulada) mientras que al cabo de 48 h. de irradiación, tanto las esporas no formuladas como las encapsuladas en alginato al 1% no fueron viables en su totalidad. Al aumentar la concentración de alginato a 1.5 y 2%, los números de esporas viables fueron de 8×10^1 y 3×10^4 , respectivamente, para ambas concentraciones de alginato. A temperatura de 50°C , después de 90 días, las esporas no encapsuladas disminuyeron en 4 logaritmos, en tanto que las encapsuladas en alginato al 1% se redujeron solo dos, mientras que las concentraciones de alginato al 1.5, y 2% permitieron mantener el mismo número de esporas viables, por lo que concluye que incrementando el contenido de alginato permitirá más alta persistencia y actividad larvicida de *B. sphaericus*

Por otra parte, en estudios realizados en nuestro laboratorio, Morales-Ramos (1996), determinó que los formulados de *B. thuringiensis* GM-7 preparados con gelatina, e ingrediente activo al 1% después de un año, mantuvieron una actividad tóxica del 100%, mientras que los preparados con alginato de sodio disminuyeron 68%, de su actividad inicial, en estudios efectuados contra larvas de *Trichoplusia ni*.

En los últimos años, la investigación y esfuerzos de desarrollo se han enfocado en comercializar formulaciones con alta potencia y mínima dosis efectiva que son convenientes para embarque a grandes distancias. En un estudio de semicampo llevado a cabo por Ali *et al* (1994), en el estado de Florida, con el fin de evaluar distintas formulaciones granulares de *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14 y maíz (corncob), proporcionadas por Laboratorios Abbott, elaboradas para proporcionar diferentes características de liberación, y probadas a dos concentraciones, alta y baja, contra larvas de *Aedes taeniorhynchus*, criadas en el laboratorio y colocadas cada tres días en los recipientes de prueba, determinaron que todas las formulaciones a la tasa baja produjeron al menos 92% de mortalidad larval acumulada durante seis días de postratamiento, mientras que una de las formulaciones, (79-976-BD) fue ligeramente superior en actividad residual, causando el 75% de mortalidad larval a los 9 días después de aplicado; sin embargo, para los

10 días postratamiento los números de mortalidad bajaron drásticamente hasta 12-4%.

La eficacia de nuevas formulaciones de Bti continúa evaluándose alrededor del mundo, así tenemos que en el reporte de Becker y Rettich (1994) probaron cuatro formulaciones comerciales: dos de Teknar®, Bactimos® y Vectobac®, contra las especies de mosquitos *Aedes vexans*, *Ae. cantans* y *Culex pipiens*, en programas de control en Alemania, tanto en laboratorio como en pruebas de campo. Las mínimas dosis efectivas (CL_{99}) encontradas fueron de 0.023 y 0.038 mg/l para las larvas de 2º y 3er estadio de *Ae. cantans*, con Teknar TC; con el 2º producto de Teknar, las mínimas dosis fueron de 0.010, 0.022 y 0.051 mg/l, para las larvas de 2º, 3º y 4º estadio respectivamente, mientras que con Bactimos® y Vectobac® la mínima dosis efectiva para larvas de 3er estadio fue de 2-4 veces más alta que con los dos productos de Teknar® (Bactimos®:0.073 y Vectobac®:0.08 mg/l); aunque no hubo diferencias esenciales en susceptibilidad entre las larvas de *Ae. cantans* y *Ae. vexans*, las larvas de *Culex* se encontraron de 2-4 veces menos susceptibles que las larvas de *Aedes* del mismo estadio, en laboratorio. Mientras que en campo, las dosis óptimas encontradas fueron 0.03, 0.02, 0.07 y 0.1 mg/l, para los dos productos de Teknar®, Bactimos® y Vectobac® respectivamente, contra *Ae. cantans*. Cuando se probó la sedimentación del bioinsecticida en polvo, menos del 50% de la delta-endotoxina permaneció en el primer centímetro de la capa de agua después de 25 minutos, 20% tras 2 horas y menos de 2% transcurridas 24 h, de tal forma que los valores de CL_{50} alcanzaron 0.75 mg/l, comparados con 0.01, al inicio del experimento, o dicho de otro modo, más del 90% de la toxina había sedimentado en las capas más profundas del agua después de 24 h.

Otros intentos se han llevado a cabo, mediante el uso de Bti además de un depredador, como en el caso del trabajo reportado por Neri-Barbosa *et al* (1997), quienes usaron Bactimos® briquetas conteniendo Bti y el nadador de dorso *Notonecta irrorata*, en su estudio llevado a cabo en contenedores plásticos, dejados colonizar por diferentes especies de mosquito, para evaluar la eficacia de los dos agentes, en combinación o solos. Entre los resultados obtenidos por estos

investigadores se muestra que las densidades larvales en los tratamientos con Bactimos fueron menores a 0.8/calada en promedio hasta los 35 días postaplicación, mientras que en el tratamiento con el depredador había 0.5 a 4.9 larvas/calada, y con ambos agentes (Bactimos® y depredador) al principio de la prueba había 3.9 larvas/calada, sin embargo disminuyó hasta 0 al final de la prueba, en comparación con el control no tratado, que contenía de 2.2 hasta 15.6 larvas/calada, por lo que concluyeron que había una diferencia estadística entre los tres tratamientos, y recomendaron el uso de Bactimos® + depredador, desde el punto de vista económico.

Algunos otros reportes de manejo integrado de larvas de mosquito, utilizan el copépodo *Mesocyclops longisetus*, como el estudio llevado a cabo por Tietze *et al* (1994) quienes evaluaron la compatibilidad y eficacia de este depredador junto con B.t.i., *Bacillus sphaericus* o Methopreno, combinados o solos, en llantas de desecho. También se determinó la toxicidad de los microbianos y el methopreno, al copépodo, exponiéndolo a concentraciones 10 veces mayores a la marcada, en ensayos en laboratorio. Los resultados obtenidos indicaron que tanto los bioinsecticidas como el methopreno, no fueron deletorios a los copépodos a concentraciones excediendo a las utilizadas en el campo; mientras que en la prueba de campo de aproximadamente 5 meses, cuando los copépodos fueron combinados con Bti o metopreno, se logró una reducción de más del 90% de las larvas de 3° y 4°estadio de *Culex sp* y *Ae. albopictus*. Bti aplicado solo, temporalmente produjo un alto grado de reducción larval (casi del 100%) por dos semanas postratamiento, sin embargo, fué necesario hacer reaplicaciones para mantener el nivel de control.

Asimismo se han evaluado distintas formulaciones de Bti y *B. sphaericus*, (B. s), desarrolladas por Laboratorios Abbottt, como las reportadas por Su y Mulla (1999), quienes usaron una nueva formulación granular dispersible en agua (WDG) de Bti, con una potencia de 4,000 Unidades Tóxicas Internacionales/mg y denominada ABG-6490 y dos formulaciones de B. s. designadas como ABG-6491 Lote 30-073-BR y lote 32-094-BR, con potencia de 350 y 630 ITU/mg respectivamente,

además de estas formulaciones también se efectuó la comparación con polvos técnicos, esto es, extracto de esporas y cristales de Bti y *B. sphaericus*, contra larvas de cuarto estadio criadas en laboratorio, de *Culex quinquefasciatus* Say. Posteriormente, las formulaciones se probaron en campo, contra las especies de mosquitos colonizantes *Cx. stigmatosoma*, *Cx. quinquefasciatus* y *C. tarsalis*, también se midió la temperatura del agua, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica y salinidad. Entre los resultados encontrados por estos investigadores tenemos que el polvo técnico y la formulación WDG de Bti mostraron valores de CL₅₀ de 0.014 y 0.024 mg/l respectivamente, mientras que los valores de CL₉₀ fueron de 0.030 y 0.059 ppm, para cada uno, en tanto que para *B. s.* los valores de CL₅₀ fueron de 0.024, 0.049 y 0.025 ppm para polvo técnico, y las dos formulaciones, respectivamente, mientras que la CL₉₀ fue de 0.085, 0.088 y 0.065 ppm en el mismo orden;. en los resultados de las pruebas de campo, estadísticamente todos los tratamientos mostraron significativa reducción en el día 7 postratamiento, pero después ocurrieron diferencias en el nivel de eficacia con base en la formulación, indicando que la formulación WDG de Bti fue mucho menos efectiva que las formulaciones de *B. s.* a las dos dosis empleadas de 1.1 y 2.7 libras/acre, ya que la formulación de Bti perdió su eficacia a ambas dosis hacia el día 12 postratamiento, en tanto que para *B. s.* se determinó un excelente control de mosquitos *Culex* hasta por 20 días postratamiento a la dosis de 0.05-0.10 libras/acre.

Algunos investigadores han revisado nuevamente los factores bióticos y abióticos que pueden influenciar la actividad larvicida de Bti, como en el trabajo reportado por Nayar *et al* (1999), quien evaluó un polvo técnico de Bti, VectoBac TP de 5,000 UTI/mg, una suspensión acuosa, (VectoBac 12 AS 1,200 UTI/mg) y una formulación granular (Vectobac CG, 200 UTI/mg) en el laboratorio, bajo diferentes condiciones contra larvas de *Aedes taeniorhynchus* y *Culex nigripalpus*. Entre los resultados obtenidos se menciona que los estadios segundo, tercero y cuarto de *Culex nigripalpus* fueron de 1.3-3 veces más susceptibles a ambos VectoBac TP y VectoBac 12AS de lo que fueron los respectivos estadios larvales de *Ae.*

taeniorhynchus, también, las larvas probadas a densidades más bajas expuestas a las concentraciones de Bti sostuvieron de 5-9 veces más altas mortalidades que las larvas expuestas bajo condiciones de densidad altas. Tanto el VectoBac TP, como el VectoBac 12AS permanecieron en suspensión por más de 24 horas con similar eficacia larvicida, la cual fue mayor a 32-35°C que a 15-20°C, mientras que cuando se mantuvo a 60°C por 24 h, el VectoBac 12AS fue adversamente afectado 2-3 veces en términos de potencia, pero el Vectobac TP no, comparado con el almacenamiento a 5 y 25°C; cuando se expusieron a alta intensidad de luz (140,000-170,000 lux) por 6 h, y 35-37°C, ambos productos (Vectobac TP y 12AS) sufrieron significativa pérdida de potencia; en tanto que incrementando los niveles de salinidad de 0 a 50% causaron una gradual declinación de la eficacia de los productos anteriormente mencionados *contra Ae. taeniorhynchus*. El formulado granular, VectoBac CG causó insignificantes mortalidades larvales de ambas especies de mosquito, ya que esta formulación no liberó el ingrediente activo en ninguna concentración significativa. El almacenamiento de las tres formulaciones bajo condiciones constantes de laboratorio y variables del campo, por más de 8 meses, no produjeron pérdida de potencia detectable.

Uno de los reportes más recientes sobre formulación de *B. thuringiensis* es el realizado por Tamez-Guerra *et al* (2000) quienes utilizaron diversos polímeros para formular más de 80 mezclas con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* con 64,000 UI/mg, como ingrediente activo, contra larvas de *Ostrinia nubilalis*. Las formulaciones fueron preparadas variando el pH, ingredientes, tales como almidón de maíz pregelatinizado, goma, gelatina, gluten de trigo, harina de maíz pregelatinizada, harina de maíz nixtamalizada y lignato de potasio, además de azúcar, aceite y ácido láctico o cítrico, en tanto que el ingrediente activo se agregó en proporción del 10-50%; todas las formulaciones se probaron bajo condiciones de lluvia y luz solar simuladas, y posteriormente, en campo. Entre los resultados más importantes encontrados tenemos que dos formulaciones, hechas con harina de maíz o lignina+harina de maíz pregelatinizada (PCF) mataron el 51.6 y 75.3% de las larvas,

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

5.-PRUEBAS DE TOXICIDAD

Por otra parte, en tanto se trabajaba con aspectos relacionados con la estandarización, al mismo tiempo se realizaban investigaciones sobre otras áreas no menos importantes, acerca de la toxicidad de Bti, como los llevados a cabo por Tyrell *et al* (1979) quienes determinaron la actividad de los cristales parasporales purificados de esta bacteria sobre tres especies de mosquitos, *Aedes aegypti* (Linnaeus), *Culex pipiens var. quinquefasciatus* (Say) y *Anopheles albimanus* (Wiedemann), donde encontraron concentraciones letales medias de 1.9×10^4 , 3.7×10^4 y 8×10^3 mg/ml, respectivamente, a las 48 horas de exposición, de tal forma demostraron la susceptibilidad diferente de los insectos de prueba, hecho que fue comprobado posteriormente por Foo y Yap (1982) al probar tres diferentes formulados a base de este microorganismo, sobre cuatro especies de mosquitos de Malasia; los resultados mostraron que *Aedes aegypti* fue el más sensible, seguido de *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles balabacensis* y *Mansonia indiana*. Por su parte, Ignoffo *et al* (1981) compararon la actividad de las toxinas de Bti y Bt. var. *kurstaki* (Btk) sobre *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*; después de una exposición de 24 horas encontraron concentraciones letales medias sobre *Aedes* de 0.054 y 210 mg/l para Bti y Btk. respectivamente, en tanto que en los bioensayos contra *Culex* los valores fueron de 0.11 y 2.2 mg/l para Bti y Btk. en ambos casos.

6.-ACTIVIDAD RESIDUAL

En el trabajo llevado a cabo por Thiéry *et al* (1999), compararon los polvos liofilizados de Bti, *Bacillus thuringiensis* serovar. *medellín* cepa 163-131 y *B. thuringiensis* serovar. *jegathesan* cepa 367, además de una formulación de microgránulos (ABG 6462) de Laboratorios Abbottt, en condiciones de laboratorio y campo, contra larvas de *Aedes aegypti* (cepa Bora-Bora y cepa Guayana Francesa) y dos cepas de *Culex pipiens* (SLAB y Montpellier). Las concentraciones letales encontradas del polvo de Bti fueron de 10-20 veces más bajas que aquellas de *Bt medellín* y *Bt jegathesan* contra *Aedes aegypti*, y de 5-8 veces más bajas contra *Culex pipiens*, aunque *Bt medellín* y *Bt jegathesan* fueron más tóxicos contra *Culex* que contra *Aedes*, de tal forma que el título del polvo de Bti fue 4, 13 y 30 veces más alto que aquel del microgránulo, de *Bt medellín* y *Bt jegathesan* respectivamente. En las pruebas realizadas en exteriores, los cuatro productos probados resultaron con más del 90% de mortalidad durante 8-11 días con exposición directa al sol, mientras que en la sombra la actividad tóxica permaneció entre 14-34 días, con iguales porcentajes de mortalidad, con *Bt medellín* como el menos persistente. Cuando se adicionó arena a los recipientes de prueba, se redujo la actividad residual hasta 2 veces menos; mientras que cuando se añadió agua contaminada al 20%, se registró un 90% de mortalidad hasta por 4-8 días para Bti y *Bt jegathesan*, en tanto que para *Bt medellín* fue de 50% de mortalidad acorde a la concentración usada, que fue de 0.1 a 0.8 mg/l. En agua 100% contaminada, Bti mostró de 100-30% de mortalidad inicial (24 h) dependiendo de la concentración (0.02 a 0.16 mg/l), y en 5 días la toxicidad bajó a casi cero; mientras que *Bt jegathesan* mostró 50% de mortalidad por 4-7 días.

7.-USO ACTUAL DE BTI EN EL CONTROL DE MOSQUITOS Y MOSCAS NEGRAS.

Algunas de las estrategias de control de mosquitos realizadas actualmente involucran el uso de aviones con una ala rotatoria, para aplicación de formulaciones granulares o líquidas de Bti, como en el caso del estudio llevado a cabo en Michigan por Knepper *et al* (1994), quienes examinaron la eficacia de Acrobe™ (Bti líquido) para el control de mosquitos de las inundaciones, de las especies *Ae. stimulans*, *Ae. intrudens*, *Ae. provocans* y *Ae. canadensis*. La formulación fue aplicada a una dosis de 4.68 l por hectárea y diluida con agua 1:3, mientras que para la evaluación del control se realizó un muestreo, una vez 5-7 días antes del tratamiento y también una vez 5-7 días después del tratamiento, en cada uno de 39 estanques, 6 de los cuales incluidos como control no tratados. Se tomaron cuatro muestras por estanque para un total de 48 caladas/estanque. La eficacia de Bti fue expresada como la media del porcentaje de reducción en los números larvarios en estanques tratados contra estanques control usando la fórmula de Mulla *et al* (1971), y el valor encontrado fue de 88.5%, sin embargo, hubo algunas variaciones considerables entre estanques individuales, mostrando reducciones entre el 51-81%, aunque fueron las menos frecuentes.

Se ha probado también el uso de formulaciones de Bti y Temephos de ultra bajo volumen (ULV), en España, mediante aplicaciones terrestres en camionetas conducidas a baja velocidad, como en el trabajo realizado por Eritja y Aranda (1995) quienes hicieron determinaciones del arrastre del spray de ULV en campos de prueba simulados, a cero velocidad del viento, donde usaron a *Culex pipiens* como bioindicador; ellos obtuvieron 100% de control de larvas, entre 10 y 50 m del punto de aplicación, con una mezcla 50:50 de Temephos:aceite aplicada a 350 ml/min viajando a 9 kph, mientras que con la formulación de Bti (Bactimos 1,200 ITU/mg) obtuvieron 92-100% de control dentro de 12 m disminuyendo hasta cerca del 11% a 30 m. Sin embargo, ellos notaron una falta de cobertura uniforme, lo cual es probable que ocurra bajo condiciones operacionales.

Algunas formulaciones de Bti (Bactoculicide) se han usado para el control de larvas de *Anopheles* en diversas partes del mundo, sobre todo donde este vector ocasiona epidemias de malaria, como sucede en la India, país donde se

realizaron diversas pruebas de campo en criaderos de *Anopheles stephensi*, como fueron sitios de construcción, tanques abandonados y cuerpos de agua; entre los resultados obtenidos, se logró controlar la densidad larval de tercer y cuarto estadio (100%) hasta por 7 días, continuando el control aunque menor (60-70%) por 21-24 días, asimismo no se observó producción pupal hasta por 21 días, a la dosis empleada de 1g/m² de superficie; sin embargo, en los tanques abandonados, la producción pupal repuntó hacia el 7º día postaplicación, por lo que se requeriría una reaplicación a intervalos de 3 días, debida principalmente a la presencia de algas ya que el pH, y la temperatura en los demás habitats fueron similares (Kumar *et al* 1995)

Hasta 1996 más de 200 toneladas de Bti. se aplicaban anualmente en todo el mundo en campañas para control de mosquito, sin evidencia de ningún impacto dañino en el ambiente (Becker *et al* 1996). En Suiza, como en otras partes de las zonas templadas del hemisferio norte, el uso principal de Bti, es para el control de *Aedes vexans*, el mosquito de las inundaciones, que se lleva a cabo mediante aplicaciones por helicóptero, las cuales han probado ser las más efectivas, mientras que las aplicaciones terrestres son recomendadas solo para tratamientos cortos, de sitios pequeños bien definidos. Como las aplicaciones de Bti resultan caras, solo pueden ser justificadas en regiones donde el costo-beneficio está en balance, tales áreas incluyen reservas naturales, cerca de lugares densamente poblados, especialmente sitios turísticos.

Los pronósticos meteorológicos exactos orientarán en el desarrollo de situaciones de inundación y junto con el monitoreo en profundidad y planeación serán instrumentos importantes para determinar el tiempo óptimo de los tratamientos (Lüthy, 1996).

Los únicos sitios vírgenes, no contaminados, en Yugoslavia, son las áreas rurales bañadas por los ríos Danubio y Tisa, favorables para criaderos de mosquito *Aedes vexans*, quien ha sido objeto de control por más de 20 años. Mientras que la entomofauna de la región rural ha sido irreversiblemente suprimida con malathion, deltamethrine o lambdacyhalothrine, la mayoría de los organismos acuáticos fueron

afectados con tratamientos con Temephos, en tanto que en muchos habitats de mosquito, los estados inmaduros más susceptibles de insectos del agua (Ephemeroptera, Odonatoptera, Heteroptera, Coleoptera y Diptera: Chironomidae, también como Collemboda: Podura) toleraron los tratamientos con Bti en diferentes formulaciones; simultáneamente, las dosis de Bti aplicadas, lograron muy alta eficacia en el control de los estados larvales de *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*. Sin embargo, los factores ambientales influenciaron la efectividad de Bti, en alguna extensión, ya que de acuerdo a sus resultados, la temperatura baja del agua (5°C), produjo un aumento de 10 veces la CL₅₀ y CL₉₀, comparado con aquellas a temperatura alta (25°C). Así, la disminución en la eficacia de Bti, fue relacionada al incremento en la densidad larvaria y la intensidad de luz solar, como una función lineal (Zgomba, 1996).

En Alemania, 95 ciudades y municipalidades a lo largo de 300 km del Río Rhin, con una población total de 2.5 millones de personas, han unido fuerzas para formar la Asociación Alemana de Control de Mosquito (KABS), para el control principalmente de *Aedes vexans*, sobre un área de criaderos de algunos 600 km², y se basa únicamente en el uso de Bti, cuya estrategia de control se elabora mediante un trazado preciso de los sitios de criaderos, el cual toma en cuenta no solo la población de mosquitos, sino también consideraciones ecológicas. En años pasados, se han usado 30 ton de polvo de Bti, y casi 500 ton de gránulos, así como 25 ton de concentrados líquidos, para el tratamiento de más de 700 km² de áreas de criaderos, resultando en una reducción de más del 90% de la población del mosquito; mientras que la seguridad ambiental de tratamientos con Bti es confirmada por cada tratamiento de rutina, en un extensivo programa de monitoreo. Todas las investigaciones han mostrado que los números de mosquitos *Aedes* han sido drásticamente reducidos, pero todos los otros insectos continúan desarrollándose en el agua, hasta adultos, proporcionando una fuente de alimento para pájaros, anfibios y murciélagos.

Después de la erradicación de la malaria indígena, el interés en el control de mosquito en Italia disminuyó, y los esfuerzos han sido dedicados a especies nocivas,

cuya presencia afecta la calidad de vida de la población. El incremento de la conciencia pública acerca de las cuestiones ambientales requiere que el control adecuado de mosquito sea realizado usando métodos y productos no peligrosos. En los pasados diez años se han estado promoviendo métodos de seguridad ambiental de control, enfocándose en el desarrollo de prácticas con larvicidas basados primariamente en Bti. Un punto clave a señalar, relativo al uso exitoso y aplicación incrementada de esta bacteria, sería el entrenamiento continuado del personal (Bellini,1996).

HIPÓTESIS

“ES POSIBLE PRODUCIR Y FORMULAR BIOINSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis* VAR. *israelensis* H-14 PARA EL CONTROL EFECTIVO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* POR PERÍODOS MAYORES A 30 DÍAS”.

OBJETIVO GENERAL

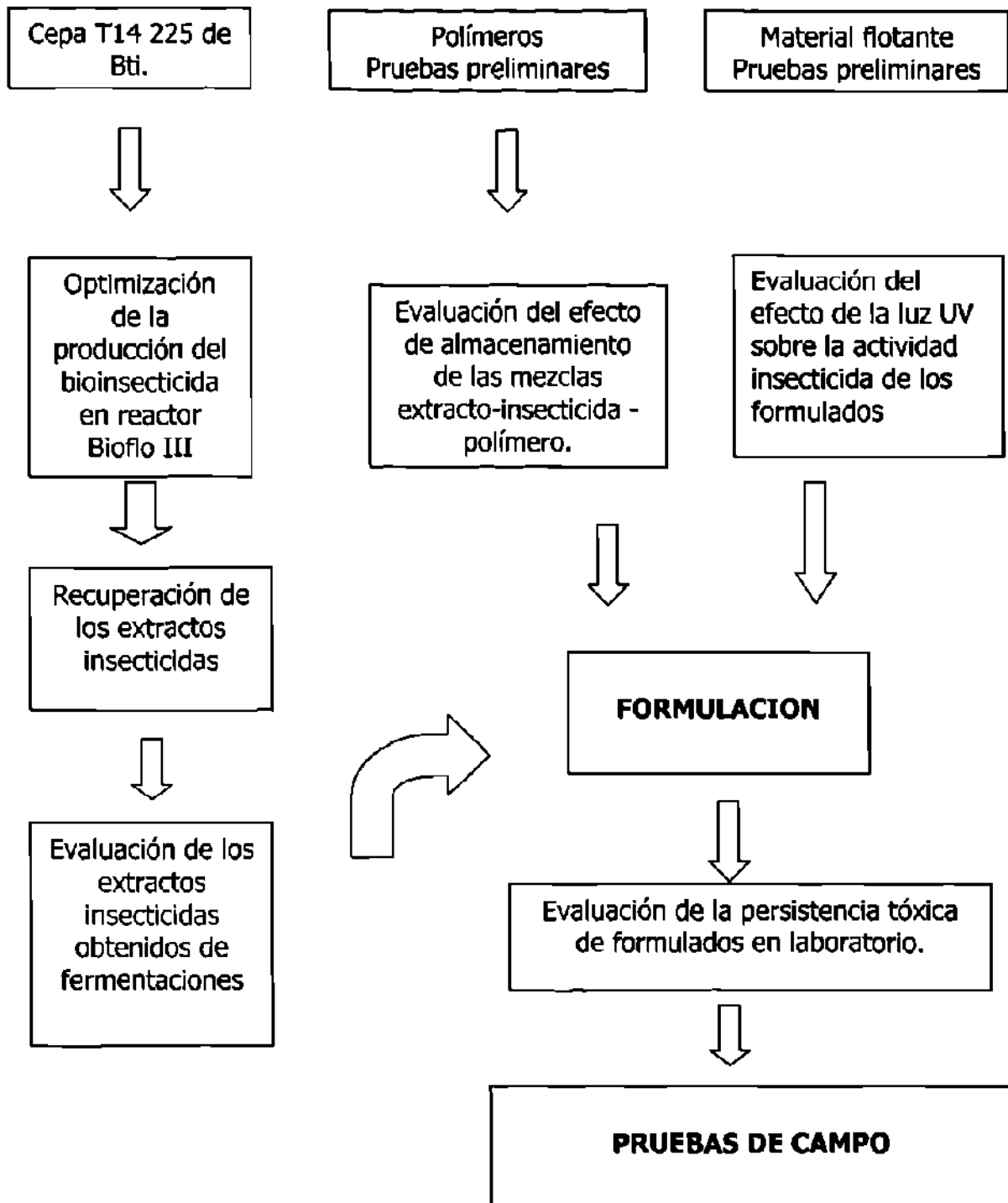
Optimización de la producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 cepa T14 225 a nivel de fermentador Bioflo III, usando diversos subproductos agroindustriales, así como el diseño y fabricación de formulados granulados flotantes del bioinsecticida para incrementar la persistencia tóxica contra larvas de *Aedes aegypti*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Optimización de la producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* H-14 a nivel de fermentador modelo Bioflo III de cinco litros de capacidad total.
- 2.-Recuperación de los extractos insecticidas y su evaluación contra larvas de *Aedes aegypti*, a nivel de laboratorio.
- 3.- Formulación del extracto insecticida más efectivo, dentro de diversas matrices poliméricas, material flotante y fotoprotectores.
- 4.- Evaluación en laboratorio de la persistencia tóxica presentada por los formulados flotantes elaborados.
- 5.- Pruebas de campo con los formulados más efectivos, contra larvas de mosquitos colonizantes en contenedores plásticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La estrategia general del proyecto se presenta en forma gráfica en el siguiente esquema:



1-PRUEBAS PRELIMINARES.

1.1 Se seleccionaron dos de los ingredientes para la elaboración de los formulados en base a su disponibilidad y precio, así como a algunos datos de la literatura. Así, se eligieron cuatro polímeros, que fueron los siguientes 1) grenetina comercial, 2) alginato de sodio 3) goma acacia, y 4) parafina comercial. También se eligieron tres materiales flotantes para proporcionar un medio para mantener el formulado sobre la superficie del agua: A) corcho, B) aserrín y C) polvo de polipropileno (Lacey *et al*/1984).

1.2 Se realizaron pruebas con los dos ingredientes mencionados polímero + material flotante, en diversas proporciones, se dejaron secar al ambiente y posteriormente se colocaron en agua para observar flotación y adhesión de los dos componentes. Las proporciones probadas fueron las siguientes:

Polímero % p/p	Material flotante% p/p
2	93
3	92
5	90
10	85
15	80
20	75

2- OPTIMIZACION DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOINSECTICIDA DE Bti 225.

2.1. Cepa de Bti.

En este trabajo utilizamos la cepa T14 225 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 seleccionada previamente en un estudio anterior (Maldonado-Blanco *et al* 1998), así como el medio de cultivo.

2.2. Medio de cultivo.

El medio de producción utilizado estaba compuesto por los siguientes ingredientes, en g/l: Melaza, 10, Líquido de remojo de maíz, 10, pasta en polvo, 30, y sales minerales, CaCO_3 , 1.0, MgSO_4 , 0.3, y ZnSO_4 , Fe SO_4 , y MnSO_4 en concentración de 0.02, $\text{pH}=7.0\pm 0.2$. Se utilizó una solución de NaOH y HCl al 10% para ajustar el pH del cultivo durante la fermentación, así como antiespumante marca Dow Corning al 10% P/V.

2. 3. Las condiciones de fermentación establecidas fueron las siguientes: pH 7, temperatura 30° C y 2% de inóculo de 8 h de edad.

2. 4. Diseño estadístico

Se utilizó el diseño Matriz Rotacional de Box (Howard, 1988), para establecer las condiciones de aireación y agitación en el fermentador, en base a datos obtenidos de la literatura, con otras variedades de *B. thuringiensis* (Galán-Wong *et al* 1993) así como a fermentaciones con Bti (Abdel-Hamed, 1991) y comprendieron las condiciones siguientes:

Combinación	Aireación (vol/vol min^{-1})	Agitación (rpm)
1	0.60	100
2	1.0	300
3	0.60	500
4	0.20	300
5	0.60	300

Cada una de las combinaciones anteriores se corrieron por triplicado, para tener un total de 15 corridas.

2. 5. Fermentador utilizado

En nuestros experimentos empleamos el reactor Modelo Bioflo III (New Brunswick Scientific Co. U.S.A), con control automático de temperatura, pH y espuma.

2. 6. Monitoreo de la fermentación.

En cada corrida se registró el pH del cultivo, Oxígeno disuelto y se hicieron observaciones microscópicas del caldo de fermentación, para control de pureza del cultivo, así como la formación de esporas y cristales y posterior lisis del cultivo, hasta la obtención de 80-90% de esporulación, lo que determinaría el fin de la fermentación.

2. 7. Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L a$)

Se utilizó la fórmula $K_L a = \frac{Na}{C^* - CL}$

Donde Na= Demanda de Oxígeno por el microorganismo, en mg O₂/l/h

C*= Saturación de O₂=6.3 mg O₂/l

CL= mg O₂/L en determinado tiempo.

La demanda de O₂ por el microorganismo(Na) se determinó con base en la pendiente obtenida al graficar la caída del O₂ disuelto (%) con respecto al tiempo transcurrido(en seg) al cortar agitación y aireación al cultivo en fase log.

3.- RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE Bti.

Al terminar la fermentación, se recuperaron los extractos insecticidas según el método descrito por Dulmage *et al* (1970) con lactosa y acetona. Se molieron en mortero y se guardaron en frasco cerrado hasta su evaluación.

4.- EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS INSECTICIDAS PRODUCIDOS EN FERMENTADOR BIOFLO III.

4. 1 Antes de realizar la evaluación de los extractos en base a la determinación de la CL₅₀ se hizo una selección preliminar de los mismos para determinar el rango de concentraciones a usar. Para ello todos los extractos producidos en las 15 corridas se probaron a la concentración de 0.05 mg/l (por triplicado) y se determinó el porcentaje de mortalidad presentado contra *Aedes aegypti*, para posteriormente

hacer la evaluación de CL_{50} de los extractos más tóxicos. Para ello, así como para el estándar IPS-82, se empleó el método propuesto por de Barjac y Larget-Thiéry (1984) y de Barjac (1985) a partir de una suspensión de 50 mg de extracto en 10 ml de agua, se agregaron 10 perlas de vidrio y se agitó durante 120 seg, posteriormente se tomó un volumen de 0.1 ml en 9.9 ml de agua destilada y se agitó en un vortex, de esta solución stock (50mg/l) se tomaron las cantidades correspondientes en μ l, para obtener concentraciones en vasos plásticos previamente llenados con 148 ml de agua destilada desde 0.005 hasta 0.06 mg/l, con tres repeticiones de grupos de 25 larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano por concentración y 4 para el control (con agua destilada únicamente). Las condiciones de prueba se mantuvieron a $25 \pm 3^\circ$ C y 70-80% de humedad relativa durante 24 h, al cabo de las cuales se registraron las larvas muertas. Se descartaron aquellos bioensayos en los cuales se encontró más del 5% de mortalidad en el control. Los bioensayos se repitieron tres veces al menos en días diferentes.

4. 2 Los datos de mortalidad se analizaron mediante el programa de Probit computarizado (United States Applied and Environmental Health 1989), mediante el cual obtuvimos la CL_{50} y CL_{90} , la pendiente de la línea de regresión y análisis de Chi cuadrada (χ^2).

4. 3. Determinación de la potencia de los extractos obtenidos de fermentaciones.

Con los datos de CL_{50} , tanto de extractos como del estándar, obtuvimos la potencia desconocida de aquellos mediante la fórmula: CL_{50} (estándar IPS-82) X 15,000/ CL_{50} (extracto de Bti) = potencia en Unidades Tóxicas Internacionales/mg, (UTI/mg).

4. 4. Los datos de las CL_{50} de los extractos, se sometieron a la prueba T(Student), al nivel 0.05 para determinar el extracto más tóxico obtenido en las 5 combinaciones agitación-aireación probadas.

5.- FORMULACIÓN DEL EXTRACTO INSECTICIDA DE Bti.

5. 1. Materiales para formulación.

Se determinaron cuatro componentes básicos para los formulados. 1) ingrediente activo, representado por el extracto espora-cristal de Bti. 2) polímero, la matriz donde

la toxina de Bti se encuentra distribuida y que proporciona una liberación lenta. 3) agente fotoprotector, un cromóforo que protege la actividad de la toxina de Bti de los rayos UV del sol. 4) Material Flotante, agregado para mantener sobre la superficie los materiales y completar volumen.

5. 2. Concentraciones de los distintos componentes.

El ingrediente activo de esporas y cristales se adicionó en proporción del 5-10% en base a la información de la literatura. Los polímeros se seleccionaron tomando en cuenta su disponibilidad y precio, además de los reportes de la literatura como los de Morales Ramos *et al* (1998), incluyeron grenetina comercial, goma acacia (Desarrollo de Especialidades Químicas, S. A. de C. V), alginato de sodio (Sigma Chem. Co.) y parafina comercial, en tanto los materiales flotantes fueron: corcho, aserrín y polvo de polipropileno. El agente fotoprotector seleccionado para agregar a los formulados fue verde de malaquita, de acuerdo a los resultados obtenidos por Castro-Franco (1994), y la concentración utilizada fue del 1%, según el reporte de Shapiro (1989). Se hicieron pruebas preliminares mezclando el ingrediente activo y los cuatro polímeros a la concentración 15%, para observar la estabilidad de la toxina mezclada con los cuatro polímeros a lo largo de diferentes períodos de tiempo.

5. 3. Determinación del efecto de almacenamiento en la actividad insecticida de los formulados Bti-polímeros.

5. 3. 1. Antes de realizar este paso, el extracto de esporas y cristales de Bti utilizado en estas pruebas se evaluó contra larvas de *Aedes aegypti* de 4° estadio temprano, para obtener los valores de la CL₅₀ y CL₉₀, de acuerdo a la metodología propuesta por de Barjac y Larget-Thiéry (1984), con el fin de determinar su actividad tóxica antes y después de mezclar con los polímeros y observar el efecto del almacenamiento a temperatura de laboratorio (20-35° C) de las distintas mezclas extracto-polímero por diferentes períodos de tiempo.

5. 3. 2. Para realizar este procedimiento se pesaron 150 mg de cada uno de los 4 polímeros, posteriormente se agregó agua la necesaria para tener una mezcla homogénea, se agitó constantemente y enseguida se adicionaron 50 mg de extracto de esporas y cristales, además 10 mg de fotoprotector (verde de malaquita). Estas mezclas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 7 días. Se prepararon un total de siete lotes de cada polímero y se guardaron en cajas Petri selladas con papel parafilm durante un año, tomándose un lote de cada mezcla a los 0, 25, 60, 90, 120, 240 y 365 días. Al mismo tiempo se prepararon mezclas de polímero+ fotoprotector sin toxina (blancos), para observar si presentaban algún efecto sobre la larva de prueba.

5. 3. 3. Determinación de humedad de las mezclas ingrediente activo-polímero-protector solar.

Se determinó el porcentaje de humedad de cada una de las mezclas ingrediente activo- polímeros-protector solar, después del período de secado al ambiente, por triplicado, cada uno, llevado a cabo en una balanza para determinación de humedad mediante luz infrarroja (A&D Co. LTD).

5. 3. 4. Liberación del ingrediente activo

El ingrediente activo se liberó de la matriz del polímero a través de diversos procedimientos: a) para los formulados con grenetina se disolvió en agua caliente a 40°C, b) los formulados con goma acacia en agua a temperatura ambiente, c) los preparados con alginato de sodio se disolvieron en solución 1.64 M de KH_2PO_4 (Murat Elcin, 1995), en tanto que, d) los preparados con parafina se disolvieron en 5 ml de cloroformo y posteriormente se agregó agua destilada; con este procedimiento, las esporas y cristales pasaron a la fase acuosa y de allí se hicieron las diluciones decimales, para la evaluación contra el insecto de prueba. Este mismo procedimiento se usó para los preparados con polímero-fotoprotector sin toxina (blancos).

5. 3. 5. Evaluación del extracto de Bti liberado.

El extracto de esporas y cristales una vez liberado de la matriz del polímero, en concentración de 5,000 mg/l se diluyó 10 veces (500 mg/l) y a partir de esta dilución se prepararon vasos plásticos conteniendo 150 ml de la dosis 0.9 mg/l contra larvas de 4º estadio de *Ae aegypti*, con cuatro repeticiones de 25 larvas cada vaso, 4 para el control (sin toxina, solo ingredientes de formulación) y 4 para controles totales. Después de 24 h de exposición, se contaron las larvas vivas y muertas, se promedió y se expresó como porcentaje de mortalidad. Los datos se analizaron mediante Análisis de varianza para un factor y diferenciación de medias por el método Diferencia Mínima Significativa (DMS) al nivel 0.05 utilizando el Paquete de Diseños Experimentales FAUANL (Olivares-Saénz 1994)

5. 4. Determinación del efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad insecticida del extracto y mezclas Bti-polímeros.

5. 4. 1. Determinación del efecto de irradiación con luz ultravioleta sobre el extracto de Bti sin formular.

Antes de determinar el efecto de la luz ultravioleta sobre los formulados preparados, se determinó este efecto sobre el extracto sin formular. Para ello, el ingrediente activo se irradió durante 24 h con una lámpara (Spectroline, Spectronics Corp.), a 254 nm λ , y una distancia de 5 cm. Posteriormente se tomaron 50 mg de este extracto irradiado, se agregaron 10 perlas de vidrio, agitándose durante 2 min, con diluciones seriadas de esta suspensión, evaluándose contra larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano a tres concentraciones, 1, 0.1 y 0.05 mg/l, empleándose tres vasos plásticos con 25 larvas cada uno por concentración y también uno para el control, asimismo el extracto no irradiado se probó a las mismas concentraciones ya mencionadas. El complejo spora-cristal se continuó irradiando por 48 y 72 h, después se probó a concentración de 0.05 mg/l contra la misma especie blanco en iguales condiciones. Los bioensayos fueron realizados en el laboratorio, a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y 50-80% de humedad relativa. Se mantuvieron 24 h de exposición, registrándose las larvas muertas, se promediaron y se expresaron como

porcentaje de mortalidad. Los resultados se analizaron mediante una prueba T de Student al nivel 0.05, a través de un programa computarizado (Olivares-Saénz, 1994) para determinar diferencias entre extracto irradiado y sin irradiar.

5. 4. 2. Determinación del efecto de la luz ultravioleta sobre las mezclas Bti-polímeros.

Cuando se determinó el efecto de la luz ultravioleta sobre extracto de Bti sin formular, y la concentración a la cual se observó este efecto, se prepararon mezclas extracto + polímero+-fotoprotector en las proporciones siguientes: 300 mg de polímero (grenetina, goma acacia, alginato de sodio y parafina), además 100 mg de ingrediente activo, 20 mg de fotoprotector (verde de malaquita) y agua destilada suficiente para homogeneizar. Estas mezclas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 7 días. La mitad de cada una de estas mezclas (antes de irradiar con luz u.v.) se pesó y se liberó el ingrediente activo, mediante los procedimientos ya descritos, evaluándose posteriormente contra larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano, a la concentración 0.05 y 0.07 mg/l, usándose vasos plásticos con 25 larvas cada uno por tratamiento, con tres repeticiones y cuatro para el control no tratado. Los tratamientos y control se mantuvieron durante un período de exposición de 24 h a temperatura de 25 ± 3 °C y 50-80% de humedad relativa.

Posteriormente, la mitad restante de las mezclas se irradió con luz u.v. de 254 nm λ , durante 72 h, a una distancia de 5 cm. Entonces, se determinó la actividad insecticida de estas mezclas irradiadas, contra el insecto de prueba, a las mismas concentraciones y condiciones usadas para mezclas no irradiadas. Se registró el número de larvas vivas y muertas, se promedió y se expresaron los resultados como porcentajes de mortalidad. Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba T de Student al nivel 0.05 para cada par de mezcla irradiada y sin irradiar.

5. 4. 3. Evaluación de mezclas Ingrediente activo-polímero-sin fotoprotector.

Se prepararon mezclas ingrediente activo-polímero sin fotoprotector, en las mismas proporciones usadas que con fotoprotector, y se probaron contra la larva de prueba,

a la concentración de 0.07 mg/l, tanto sin irradiar como irradiadas, y se analizaron por el mismo procedimiento que para mezclas con fotoprotector.

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA RESIDUAL EN LABORATORIO DE LOS FORMULADOS PREPARADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLÍMERO.

6.1 Determinación de la CL₅₀ y CL₉₀ del extracto insecticida de Bti.

Antes de preparar los formulados necesarios para las pruebas en laboratorio, se evaluó el extracto insecticida de Bti de acuerdo a de Barjac y Larget-Thiéry (1984), para determinar la CL₅₀ y CL₉₀ con el fin de obtener la potencia de nuestros formulados.

6.2. Preparación de formulados para determinación de actividad tóxica residual en laboratorio.

En base a datos de la literatura se determinó que los componentes de los formulados fueran cuatro. 1) extracto insecticida de Bti, en cantidad de 3 veces la CL₁₀₀, obtenida en el paso anterior 2) polímero, se probaron de 3-6 concentraciones, que de acuerdo a trabajos anteriores, se han ensayado con formulaciones de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* (Murat-Elcin 1995, Morales Ramos 1996), para observar su liberación en el ambiente acuático: en el caso de grenetina y parafina, se probaron 2, 3, 5, 10, 15 y 20% peso/peso, para goma acacia fueron 2, 10, 15 y 20%, mientras que para alginato de sodio, únicamente 2, 3 y 5% debido a que es un polímero muy viscoso y forma mezclas de consistencia muy dura, que difícilmente liberarían el ingrediente activo. 3) el fotoprotector utilizado fue verde de malaquita al 1%, en base a los resultados obtenidos por Castro-Franco (1994) y Shapiro (1989), 4) por último se empleó corcho como material flotante, debido a que en los pruebas preliminares resultó el más adecuado, agregado en concentraciones complementarias desde 74-92%, para completar 100 %. En la Tabla 1 se muestra un resumen del total de formulaciones probadas:

Tabla 1. Formulaciones granulares de polímeros y *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 preparadas y evaluadas para actividad residual en laboratorio, a la concentración de 13.7 mg/l contra larvas de 4º estadio temprano de *Aedes aegypti*.

Formulación	Cantidades en mg				Polímero utilizado			
	Polímero	Material flotante	Ingred. Activo	Protector solar	Gelatina	Goma acacia	Alginato de sodio	Parafina
F(2%)	27	1,269	69	13	F(2%)	F(2%)	F(2%)	F(2%)
F(3%)	41	1,255	69	13	F(3%)		F(3%)	F(3%)
F(5%)	69	1,228	69	13	F(5%)		F(5%)	F(5%)
F(10%)	138	1,159	69	13	F(10%)	F(10%)		F(10%)
F(15%)	207	1,090	69	13	F(15%)	F(15%)		F(15%)
F(20%)	276	1,021	69	13	F(20%)	F(20%)		F(20%)
Peso total= 1.378 g								

6.2 Bioensayo para determinación de la actividad residual en laboratorio.

Las formulaciones preparadas tenían un tamaño de gránulo de 1-2 mm de diámetro y peso de 95-120 gránulos/g; se probaron para evaluar la liberación del ingrediente activo y actividad residual a lo largo de seis semanas en condiciones de laboratorio (temperatura 20-35°C y 50-80% de humedad relativa).

El método de bioensayo fue similar al de Margalit *et al* (1984), con algunas modificaciones: Se colocaron recipientes de poliestireno (15.6 X 13.8 x 9 cm profundidad), a cada uno se agregó 1 l de agua decolorada, 25 larvas de *Aedes*

aegypti de 4º estadio temprano, y los diversos tratamientos (formulaciones), aplicados en cantidad de 13.7 mg/l, con tres repeticiones por tratamiento y un control; además, se incluyó para comparación, un producto comercial (Bactimos® briquetas lote No. 50831) y extracto insecticida sin formular, probados a la misma concentración y condiciones que para los formulados preparados. La mortalidad larval se registró a las 24 h postratamiento, en donde todas las larvas vivas y muertas fueron cuidadosamente removidas con una pipeta de plástico, contadas y descartadas. Un lote nuevo de 25 larvas de 4º estadio temprano se introdujeron nuevamente en los contenedores a los 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días postaplicación y 24 h después se registró la mortalidad. Los datos obtenidos, corregidos contra controles, se analizaron mediante análisis de varianza de un factor y comparación de medias al nivel 0.05.

7- PRUEBAS DE CAMPO EN CONTENEDORES PLÁSTICOS DE 200 l.

7. 1. Preparación de formulaciones.

Las formulaciones más efectivas obtenidas en laboratorio se prepararon para pruebas de campo. Estas incluyeron las formulaciones con gelatina y goma acacia al 10% peso/peso y la de parafina 5%, mientras que el ingrediente activo se preparó a partir de la cepa de Bti 225 y producido en microfermentador modelo Bioflo III, en las condiciones ya mencionadas en la parte de optimización de la producción del bioinsecticida. El ingrediente activo seleccionado se adicionó en la cantidad de 10% del peso total de la formulación, en tanto que el protector solar (verde de malaquita) se adicionó al 1% del peso total. Por último, el material flotante se mezcló en proporción del 79-84%, para completar el 100% del peso. Se prepararon tres lotes de cada formulado.

7. 2. Sitio y fecha del experimento de campo.

El estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), localizado en el municipio de Apodaca,

N. L, en un lugar arbolado y con períodos alternados de sol y sombra, rodeado de pasto, a partir del 16 de octubre al 18 de noviembre del 2000.

7. 3. Colonización de contenedores plásticos.

Antes de empezar las pruebas, se llenaron con agua 8 tambos plásticos de 200 l de capacidad y fueron expuestos 15 días antes del tratamiento a la oviposición natural por las poblaciones locales de mosquitos.

7. 4. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño de bloques al azar, con cuatro tratamientos, aplicados a la concentración de 13.7 mg/l, en donde la formulación F1 (con gelatina 10%) se aplicó a dos contenedores, la formulación F2% (con goma acacia 10%) a otros dos; la formulación F3 (con parafina 5%) en los siguientes dos y por último 2 contenedores que sirvieron como control no tratado.

7. 5. Muestreo.

Las poblaciones larvales se registraron en los días 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28 y 33 días después de la aplicación; para esto se tomaron 10 muestras (350 ml) de cada tratamiento, con un calador plástico. Las muestras recolectadas se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas. Se registró el número de larvas y pupas totales, y también por especies. Los números promedio de larvas y pupas se compararon entre control y tratamientos en cada día de muestreo por Análisis de Varianza de un factor y Diferencia Mínima Significativa al nivel 0.05. Además, se llevó un registro de los números de adultos encontrados en las paredes de los contenedores, que aunque no representaban el total de adultos emergidos, sí nos pudiesen proporcionar una indicación de la efectividad del tratamiento. Los larvas de mosquitos se identificaron usando las claves de Darsie y Ward (1981).

7. 6. Medición de actividad tóxica residual.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad tóxica residual presentada por muestras de agua obtenida de contenedores tratados, en los días 21 y 33 postratamiento. Para ello, se tomaron dos a tres muestras de agua y sedimentos de 150 ml de cada tratamiento y controles, se colocaron en vasos plásticos y después se adicionaron 25 larvas de *Ae. aegypti* de 4º estadio temprano obtenidas en

laboratorio a cada vaso, se dejaron 24 h de exposición a temperatura de laboratorio (20-30° C). Después se registró el número de larvas vivas y muertas, se corrigieron contra los presentados por los controles y se compararon mediante análisis de varianza para un factor y Diferencia Mínima Significativa al nivel 0.05.

7. 7. Registro de factores ambientales.

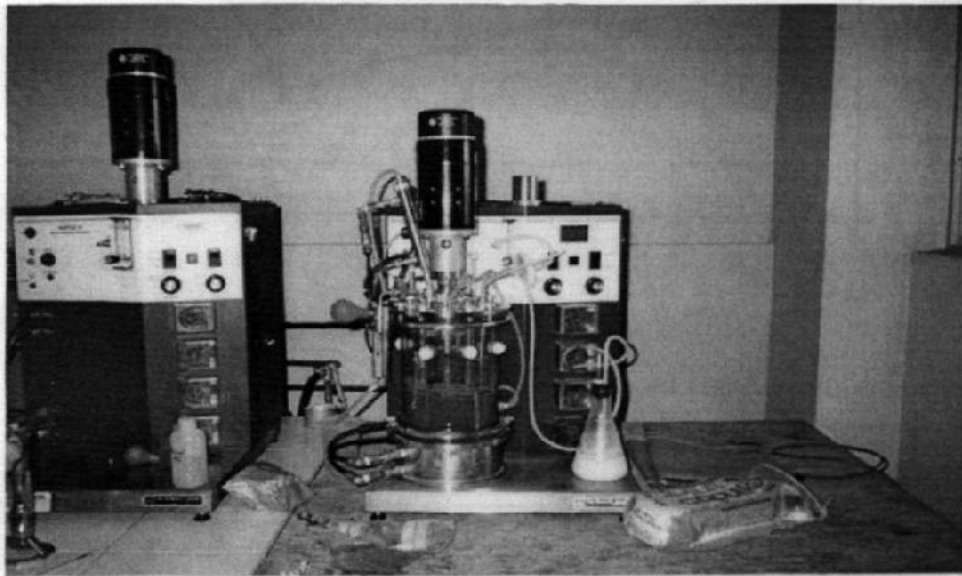
Durante el período de prueba, se registraron la temperatura y pH del agua de cada uno de los contenedores (con potenciómetro Beckman Instruments).

RESULTADOS

1. PRUEBAS PRELIMINARES.

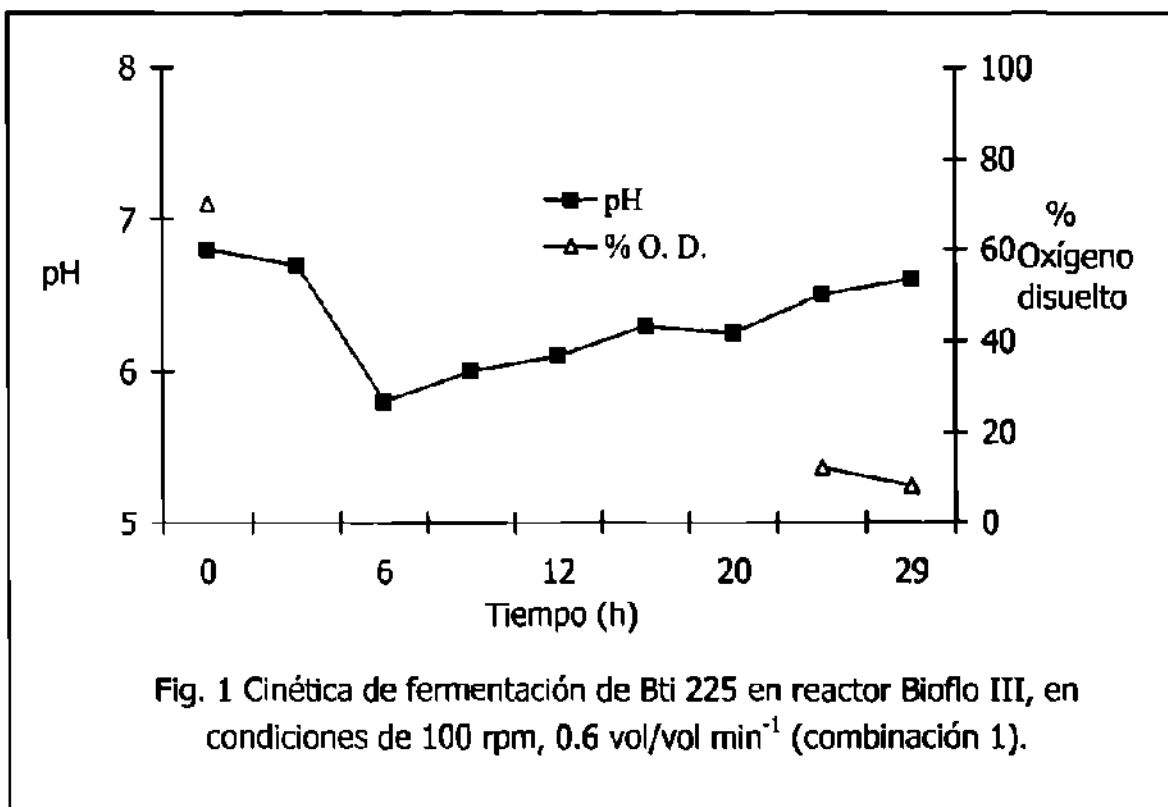
De acuerdo a los resultados obtenidos, de todas las mezclas polímero-material flotante, las que resultaron convenientes para la preparación de los formulados fueron las que contenían corcho como material flotante, mezcladas con todas las proporciones ensayadas de polímeros, excepto las que incluían alginato de sodio a concentraciones mayores al 5%, que resultaron sumamente compactadas y difíciles de liberar el ingrediente activo. Por lo tanto, se ensayaron concentraciones de polímero de 2, 3, 5, 10, 15 y 20% peso/peso, mientras que las concentraciones de material flotante variaron entre 92-74%.

2- OPTIMIZACION DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOINSECTICIDA.

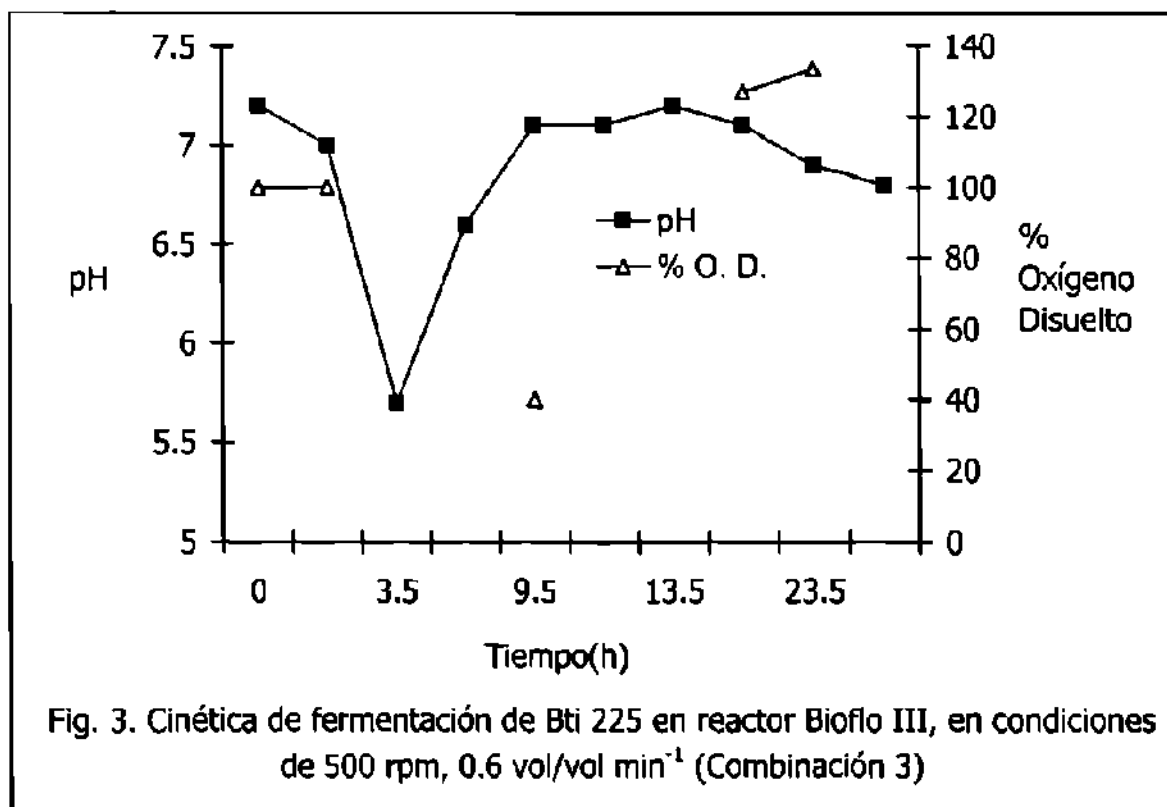
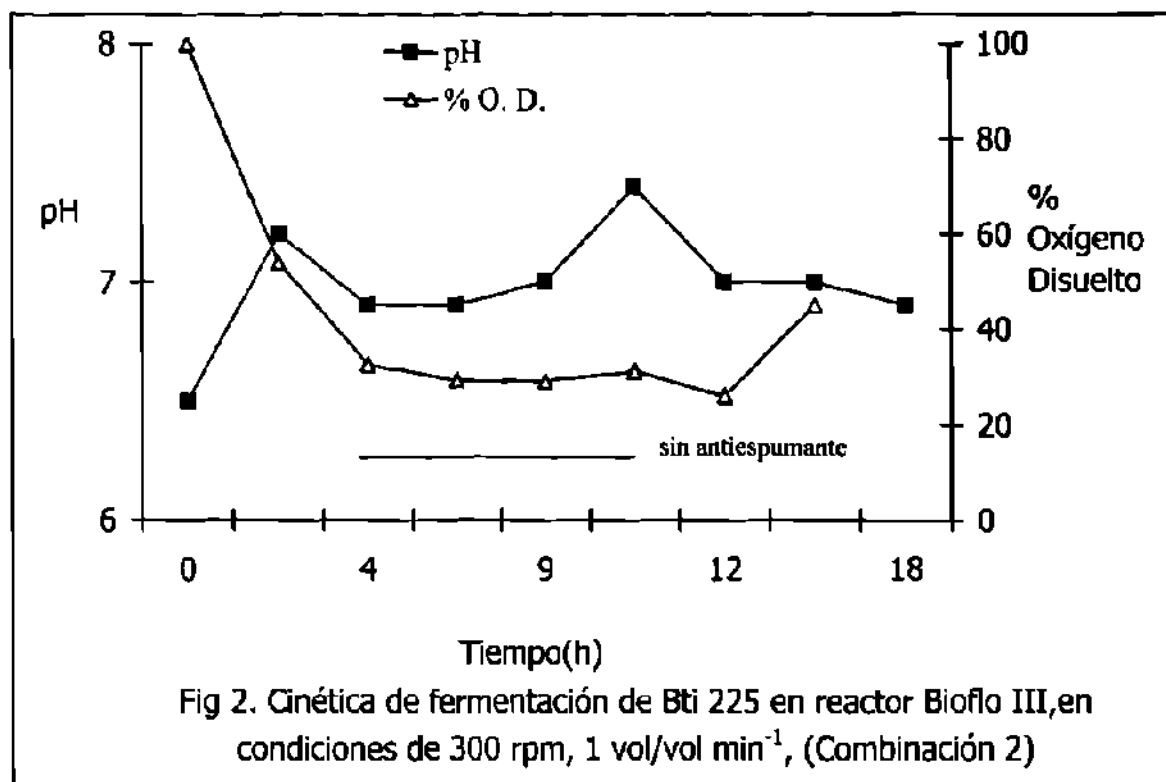


De acuerdo al Diseño estadístico utilizado para ello (Matriz Rotacional de Box), se probaron cinco combinaciones de agitación aireación, para la producción en el reactor Bioflo III, con tres repeticiones cada una para un total de 15 corridas.

2. 6. Los resultados de la cinética observada en las fermentaciones en el reactor Bioflo III se muestran en las siguientes figuras 1-5. En la Figura 1 se muestran los valores de pH y oxígeno disuelto mantenidos en el reactor, usándose la combinación 1 (100 rpm, $0.6 \text{ vol/vol min}^{-1}$), donde se observa que el pH se mantiene por debajo de 7.0 durante el tiempo total de fermentación, en tanto el oxígeno disuelto al final de la corrida baja hasta menos del 20%. El valor de $k_L a$ obtenido en esta combinación fue de 15.3 h^{-1} , tomado a las 4 horas de edad del cultivo.

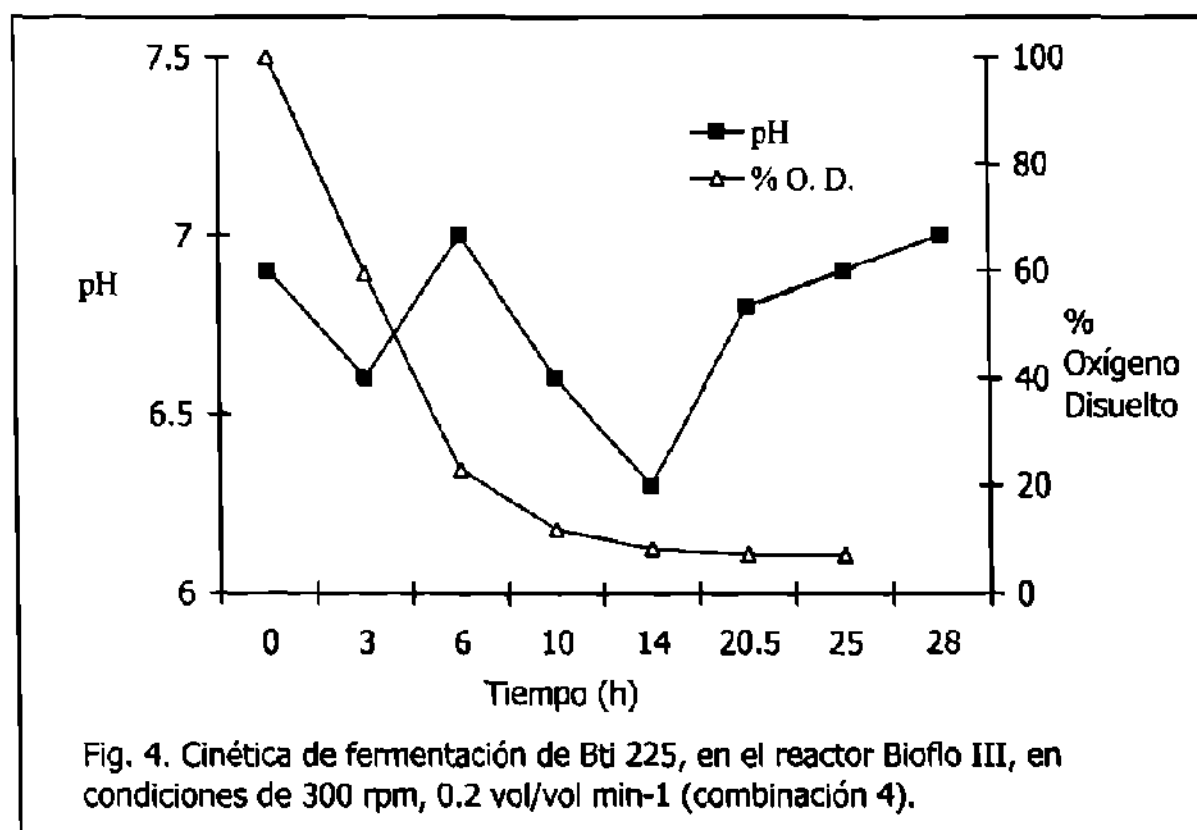


En la Figura 2 se muestran los valores mantenidos durante la fermentación de Bti para la combinación 2 (300 rpm, $1 \text{ vol/vol min}^{-1}$), donde observamos el mismo comportamiento para el pH, que en la combinación anterior (1), mientras que el oxígeno disuelto llega a un valor mínimo de 26% a las 12 h. Para el $k_L a$ se obtuvo un valor de 58.4 h^{-1} tomado a las 4 horas de edad del cultivo.

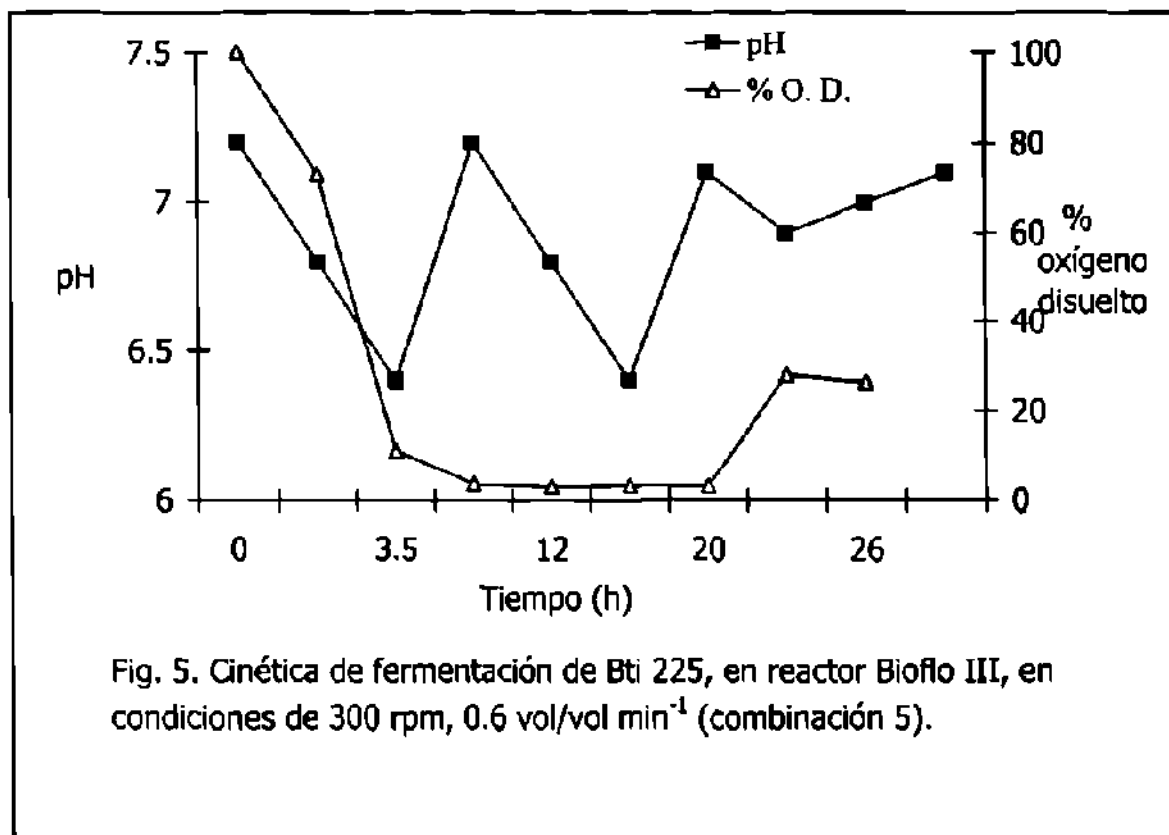


En la Fig. 3 se presenta la cinética de fermentación de Bti observada con la combinación 3 (500 rpm, 0.6 vol/vol min⁻¹) donde se muestra que los valores de pH disminuyen hasta cerca de 5.7, en las primeras horas, para después mantenerse cercanos a 7.0, en tanto que los números de oxígeno disuelto llegan a un valor mínimo de 40% a las 9.30 h de fermentación. El valor de $k_L a$ obtenido en esta combinación fue de 24.8 h⁻¹

En la Fig. 4 observamos la cinética de la fermentación de Bti mantenida en la combinación 4 (300 rpm, 0.2 vol/vol min⁻¹), donde se presentan valores de pH por debajo de 7.0 durante todo el tiempo de fermentación, mientras que el oxígeno disuelto disminuye paulatinamente hasta niveles bajo el 20% después de las seis h de fermentación. El valor de $k_L a$ obtenido fue 82.4 h⁻¹, determinado a las 2.7 h de edad del cultivo.

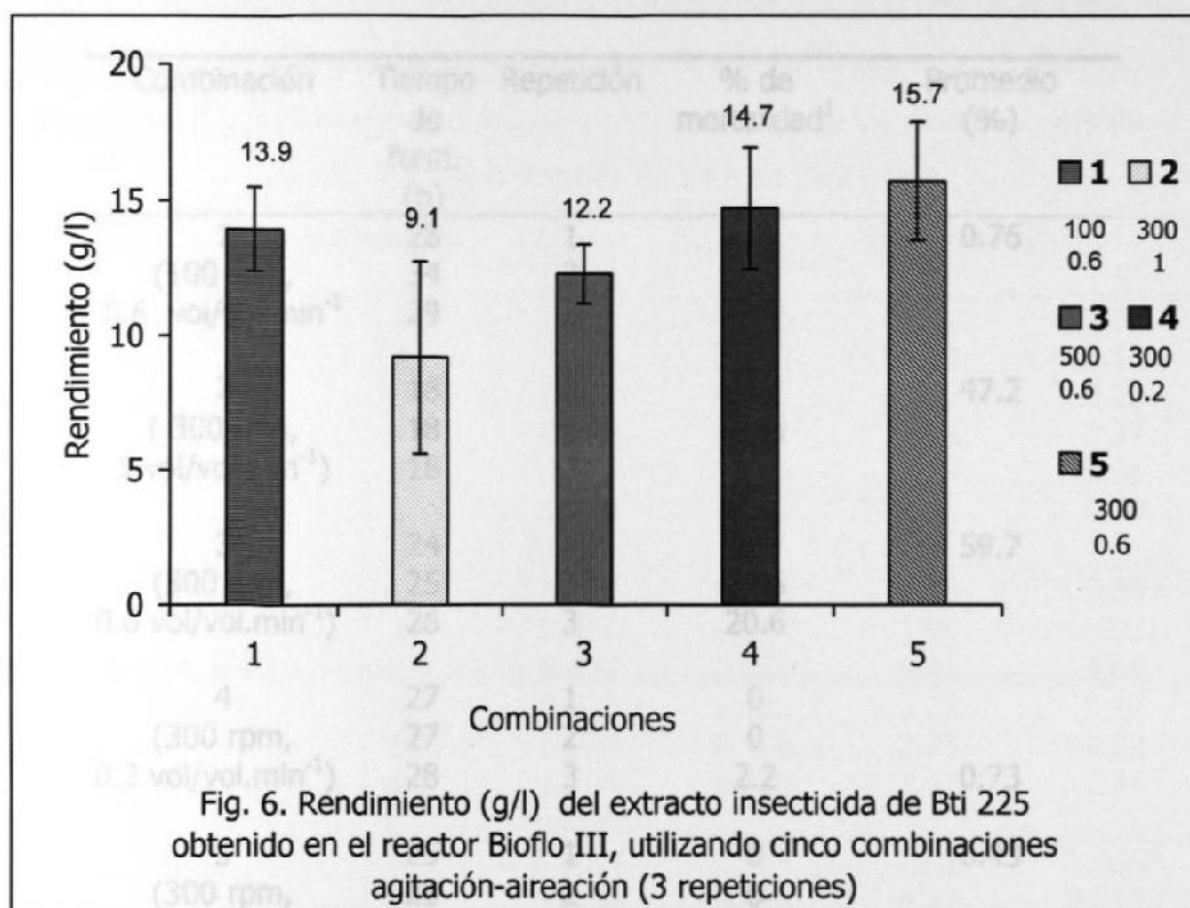


En la Fig. 5 se presenta la cinética de fermentación observada en la combinación 5 (300 rpm, 0.6 vol/vol min⁻¹) que muestra los valores de pH registrados en el rango de 7.2 a 6.4, mientras que los valores de oxígeno disuelto oscilaron entre 100-3.1% este último registrado a las 20 h de fermentación. El valor de $k_L a$ determinado en esta corrida fue de 37 h⁻¹, a las 4 horas de edad del cultivo.



3- RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE Bti.

Al final de la fermentación se recuperaron los extractos insecticidas, cuyos rendimientos se muestran en la Fig. 6. donde podemos observar que el rendimiento máximo fue obtenido usando la combinación 5 (300 rpm, y 0.6 vol/vol min⁻¹) con promedio de 15.7 g/l, mientras que el mínimo fue de 9.1 g/l con la combinación 2 (300 rpm, 1 vol/vol min⁻¹).



4. EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS INSECTICIDAS PRODUCIDOS EN FERMENTADOR BIOFLO III.

4.1 Los resultados de la evaluación preliminar contra larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano a concentración de 0.05 mg/l se presentan en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Actividad tóxica mostrada por extractos insecticidas de Bti obtenidos en el reactor Bioflo III utilizando cinco combinaciones de agitación aireación, probados contra larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano a la concentración 0.05 mg/l.

Combinación	Tiempo de ferm. (h)	Repetición	% de mortalidad ¹	Promedio (%)
1 (100 rpm, 0.6 vol/vol.min ⁻¹)	28	1	0	0.76
	34	2	0	
	29	3	2.3	
2 (300 rpm, 1 vol/vol.min ⁻¹)	18	1	100	47.2
	18	2	32.6	
	18	3	9.2	
3 (500 rpm, 0.6 vol/vol.min ⁻¹)	24	1	100	59.7
	25	2	58.6	
	26	3	20.6	
4 (300 rpm, 0.2 vol/vol.min ⁻¹)	27	1	0	0.73
	27	2	0	
	28	3	2.2	
5 (300 rpm, 0.6 vol/vol.min ⁻¹)	25	1	0	0.43
	25	2	0	
	29	3	1.3	

¹ promedio de 3 bioensayos a cada extracto.

La actividad tóxica de los extractos obtenidos en cinco combinaciones de agitación-aireación fue variable, de tal forma que los complejos espóra-cristal de las

combinaciones 2 (300 rpm, 1 vol/vol min⁻¹) y 3 (500 rpm, 0.6 vol/vol min⁻¹) resultaron con mayor toxicidad, con valores promedio de 47.2 y 59.7% de mortalidad respectivamente, resultado de 9 bioensayos cada uno, en tanto los restantes extractos presentaron menos del 1% de mortalidad, en promedio; por lo tanto, únicamente a los extractos obtenidos de las combinaciones 2 y 3 se determinaron sus concentraciones letales medias (CL₅₀) con el fin de establecer una diferencia estadística entre ellos. En cuanto a la productividad promedio para estos dos extractos se obtuvo un valor de 0.5 g/l/h para ambos extractos

Tabla 3. Actividad tóxica mostrada por extractos insecticidas de Bti producidos en reactor Bioflo III utilizando dos combinaciones de agitación-aireación, 2 (300 rpm, 1 vol/vol min⁻¹) y 3 (500 rpm, 0.6 vol/vol/min⁻¹) contra larvas de *Aedes aegypti* de 4^o estadio temprano después de 24 h de exposición.

Extracto	Repetición	¹ CL ₅₀	¹ CL ₉₀	Pendiente	χ ² /g.l.
2 (300 rpm, 1 vol/vol min ⁻¹)	1	0.030	0.063	3.8	0.62
	2	0.025	0.066	3.04	0.15
	3	0.021	0.052	3.2	0.12
	4	0.432	0.647	7.32	4.37
	5	0.615	1.305	3.92	0.85
	6	0.479	1.099	3.56	0.28
Media		0.2675*			
3 (500 rpm, 0.6 vol/vol min ⁻¹)	1	0.054	0.159	2.73	1.08
	2	0.061	0.287	1.90	8.02
	3	0.030	0.059	4.41	5.68
	4	0.072	0.182	3.22	0.49
	5	0.088	0.308	2.35	0.22
	6	0.104	0.320	2.62	1.24
Media		0.0685*			
Estándar IPS-82	1	0.0071	0.024	2.42	0.0058
	2	0.0054	0.010	4.37	0.0128
	3	0.0065	0.013	4.19	1.16
Media		0.0063	0.016		

*ambas medias globales de cada CL₅₀ obtenidas y posteriormente analizadas mediante una prueba T de Student al nivel 0.05, resultaron sin diferencias significativas, al obtener un valor t=1.78, mientras que los valores de tablas fueron t_{0.05}=2.22, t_{0.01}=3.16

¹ Concentración en mg/l

Por otro lado, en la Tabla 3 se presentan los resultados de las evaluaciones de la CL_{50} y CL_{90} de estos extractos obtenidos en las combinaciones 2 y 3 contra larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano, donde observamos concentraciones letales medias promedio de 0.2675 y 0.0685 mg/l, respectivamente, sin diferencias significativas según una prueba T de Student al nivel 0.05.

Las cifras estadísticas de estos bioensayos se muestran a continuación en la Tabla 4, donde se observa que la media global de las CL_{50} obtenidas del extracto insecticida producido en la combinación 2 (300 rpm, 1 vol/vol min^{-1}) fue mayor que la media global de las concentraciones letales medias obtenidas en la combinación 3 (500 rpm, 0.6 vol/vol min^{-1}), así como también la desviación estándar obtenida fue diez veces menor, con este último extracto, sin embargo, la prueba T (Student) realizada nos indicó que no existía diferencia significativa entre las toxicidades presentadas por ambos extractos, por último, observamos un coeficiente de variación mayor en los bioensayos realizados con los extractos obtenidos con la combinación 2 (300 rpm, 1 vol/vol min^{-1}) que los obtenidos con la combinación 3 (500 rpm, 0.6 vol/vol min^{-1}).

Tabla 4. Estadísticos de la evaluación de extractos de Bti obtenidos de dos combinaciones de agitación-aireación, en bioensayos contra larvas de *Aedes aegypti* de 4° estadio temprano, a las 24 h de exposición.

	Combinaciones agitación-aireación	
	300 rpm-1 vol/vol.min ⁻¹	500 rpm 0.6 vol/vol.min ⁻¹
N	6	6
Media	0.2675	0.0685
Desviación estándar	0.27	0.027
Varianza	0.0737	0.0007
Coefficiente de Variación.	1.01	0.37

5-. FORMULACION DEL EXTRACTO INSECTICIDA DE Bti.

5. 3. 1. El extracto de Bti, obtenido en matraz, antes de formularlo con los 4 diferentes polímeros para las pruebas del efecto de almacenamiento y de la luz ultravioleta sobre la actividad insecticida de formulados presentó una concentración letal media de 0.016 mg/l resultado de tres bioensayos realizados contra larvas de *Aedes aegypti* de 4° estadio temprano, los cuales mostramos en la tabla 5. De acuerdo con estos resultados, la potencia presentada por el extracto fue de 5906 UTI/mg por lo tanto la potencia arbitraria de nuestras formulaciones fue de 295.7 UTI/mg.

Tabla 5. Actividad insecticida presentada por extracto de Bti 225 obtenido en matraz, y probado contra larvas de 4º estadio temprano de *Aedes aegypti* después de 24 h de exposición.

	Bioensayo 1	Bioensayo 2	Bioensayo 3	Media	Desv. Est.
CL ₅₀	0.014	0.017	0.019	0.016	0.0025
CL ₉₀	0.049	0.052	0.053	0.051	0.0021
Pendiente	2.39	2.74	2.95		
χ^2 / g.l.	2.46	1.25	5.83		

g.l. grados de libertad

5. 3. 2. Porcentaje de humedad de las mezclas Bti-polímeros.

Las mezclas ingrediente activo-polímero-protector solar, después del secado al ambiente durante siete días, y posterior al almacenamiento durante un año a temperaturas de 20-35°C y 50-80% H. R. presentaron porcentajes de humedad mostrados en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de humedad de las mezclas extracto-polímero- protector solar, antes y después del almacenamiento en laboratorio a 20-35°C, durante un año.

Mezcla IA-Polímero	% de humedad ¹	
	(antes)	posterior(1año después)
IA-gelatina	6.2	4.6
IA-Goma acacia	6.75	4.3
IA-alginato	5.5	6
IA-Parafina	5.3	5.7

IA ingrediente activo, ¹ promedio de 3 repeticiones

5. 3. 3. Efecto del almacenamiento sobre la actividad insecticida de las mezclas Bti-polímeros.

Los formulados de Bti-polímeros almacenados por distintos períodos de tiempo y probadas contra *Ae. aegypti* a la concentración 0.9 mg/l, mostraron los resultados de la Tabla 7, donde se puede observar que presentaron actividad tóxica estable durante ocho meses aproximadamente, con ligeras variaciones posteriores, en donde la formulación con parafina presentó reducción significativa en la toxicidad de 19%, en comparación con los restantes formulados cuya variación no fue significativa.

Tabla 7. Actividad tóxica de extracto de Bti sin formular y mezclas ingrediente activo-polímero (gelatina, goma acacia, alginato de sodio y parafina) adicionados 1:3, además de 1% verde de malaquita, almacenados por varios períodos de tiempo bajo temperatura variable (20-35°C, 50-80% H. R.) y evaluados contra larvas de 4º estadio temprano de *Aedes aegypti* a 0.9 mg/l.

Almacenamiento	Media % mortalidad larval ¹					
	7 días	25 días	60 días	120 días	240 días	365 días
Extracto of Bti	100	100	100	100	100	100a
IA- gelatina	100	100	100	100 a	100 a	100a
IA- goma acacia	100	100	100	100 a	100 a	98a
IA- alginato de sodio	100	100	100	92 a	98 a	95a
AI-paraffin	100	100	100	98 a	100 a	81b

¹promedio de 4 repeticiones.

Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes. ANDEVA, DMS $p \leq 0.05$

5. 3. 4. Efecto de formulaciones blanco (sin toxina).

Al mismo tiempo se evaluaron las mezclas de polímero-fotoprotector sin toxina (blancos) almacenados durante 7, 25 y 60 días, cuyos resultados se muestran en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8. Actividad tóxica de formulados adicionados con 1% verde de malaquita (sin ingrediente activo) almacenados por varios períodos de tiempo bajo temperatura y humedad variable y evaluados contra larvas de 4º estadio temprano de *Aedes aegypti* a 0.9 mg/l.

Mezcla	Media del % de mortalidad ¹		
	7 días	25 días	60 días
Gelatina-V. M.	3	0	1
G. acacia-V. M.	0	0	1
Alginato-V. M.	0	0	0
Parafina-V. M.	1	0	1

¹ promedio de 4 repeticiones de 25 larvas cada una

5. 4. Efecto de la irradiación con luz ultravioleta sobre la actividad insecticida de extracto de Bti sin formular y formulados Bti-polímeros.

5. 4. 1 El extracto Insecticida de Bti sin formular, irradiado y no irradiado con luz ultravioleta de 254 nm λ durante 24 h, probado a las concentraciones 1 y 0.1 mg/l presentó la misma actividad, por lo tanto no se pudo detectar algún cambio, sin embargo, cuando el extracto se probó a 0.05 mg/l se observó una disminución del 26.4% en la mortalidad de *Ae. aegypti*, aunque sin diferencias significativas, según una prueba T de Student al nivel 0.05 (valor $t = 2.2942$, $t_{Student (0.05)} = 2.77$; Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de irradiación con luz ultravioleta de 254 nm λ durante 24 h sobre el extracto de Bti, probado a 3 concentraciones contra larvas de 4º estadio temprano de *Aedes aegypti* después de 24 h de exposición.

Concentración (mg/l)	Media % mortalidad ¹	
	Irradiado	No irradiado
1	100	100
0.1	81.2	81.2
0.05	12	38.4

¹Promedio de 3 repeticiones.

Posteriormente el extracto insecticida, irradiado por 48 y 72 h se evaluó a concentración de 0.05 mg/l, donde se observó una reducción en la mortalidad de *Aedes aegypti* del 30 y 40% respectivamente, esta última significativamente diferente al extracto sin irradiar, según una prueba T al nivel 0.05, (valor t = 2.9002, t Student (0.05) = 2.776. g.l. = 4; Tabla 10).

5 4. 2. Efecto de irradiación con luz UV sobre los formulados Bti-polímeros.

Después de observar el efecto de la irradiación con luz ultravioleta sobre el extracto de Bti sin formular, se prepararon las distintas mezclas ingrediente activo-polímero-protector solar, para observar el efecto de la irradiación sobre la actividad insecticida de los formulados preparados, cuyos resultados se muestran en la siguiente Tabla 11, donde observamos reducciones en la actividad de mezclas ingrediente activo-polímero-fotoprotector después de 72 h de irradiadas, con respecto a no irradiadas, de 9.1, 4, 33.6 y 54.6%, para cada una de las mezclas con gelatina, goma acacia, alginato y parafina respectivamente, esta última con una diferencia altamente

significativa, según una prueba T de Student al nivel 0.05 (valor $t = 8.7412$, t Student $(0.01) = 4.604$).

Tabla 10. Efecto de irradiación con luz uv a 254 nm λ , durante 48 y 72 h sobre el extracto de Bti, probado a concentración de 0.05 mg/l contra larvas de 4° estadio de *Aedes aegypti* después de 24 h de exposición.

Tiempo (h)	Media % mortalidad ¹	
	Irradiado	No irradiado
48	16	46.4
72	6.4*	

¹Promedio de 3 repeticiones

* indica diferencia significativa entre extracto irradiado y sin irradiar por una prueba T(Student) al nivel 0.05. $t = 2.9002$, g.l.= 4

5. 4. 3. Efecto de irradiación con luz UV sobre los formulados Bti-polímeros sin fotoprotector .

Como una prueba adicional, se realizaron bioensayos con mezclas ingrediente activo-polímero-sin fotoprotector y se probaron en las mismas condiciones que para mezclas con protector solar, aunque a concentración de 0.07 mg/l obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 12, donde observamos reducciones en la actividad tóxica, de mezclas irradiadas que no contenían fotoprotector con respecto a las no irradiadas, de aproximadamente 28, 34, 60 y 77% para las mezclas con gelatina, goma acacia, alginato y parafina respectivamente, las dos últimas significativamente diferentes según una prueba T de Student al nivel 0.05 (para mezclas con alginato, valor $t = 4.7725$, t Student $(0.01) = 4.604$, para mezclas con parafina, valor $t = 5.7523$, t Student $(0.05) = 3.128$).

Tabla 11. Efecto de la irradiación con luz uv por 72 h sobre extracto de Bti y formulados, evaluados a 0.05 mg/l contra larvas de *Aedes aegypti* después de 24 h de exposición.

	Media % mortalidad ¹	
	Irradiado	No irradiado
Extracto de Bti	48*	94.6
IA-gelatina	77.3	86.4
IA-goma acacia	94.6	98.6
IA-alginato de sodio	58.4	92
IA-parafina	20*	74.6

¹ promedio de 3 repeticiones

IA= ingrediente activo

* indica diferencia significativa entre extracto y mezclas irradiadas y sin irradiar por una prueba T (Student) al nivel 0.05. t= 8.7412, g.l.= 4

Tabla 12. Efecto de la irradiación con luz uv por 72 h sobre extracto de Bti y formulados sin protector solar, probados a 0.07 mg/l contra larvas de *Aedes aegypti* después de 24 h de exposición.

	Media % mortalidad ¹	
	Irradiado	No irradiado
Extracto de Bti	48*	100
IA ² -gelatina	72	100
IA-goma acacia	65.2	100
IA-alginato de sodio	40**	100
IA-parafina	14.6*	92

¹ promedio de 3 repeticiones

² ingrediente activo

* indica diferencia significativa entre extracto y mezclas irradiadas y sin irradiar por una prueba T (Student) al nivel 0.05, g.l.= 4

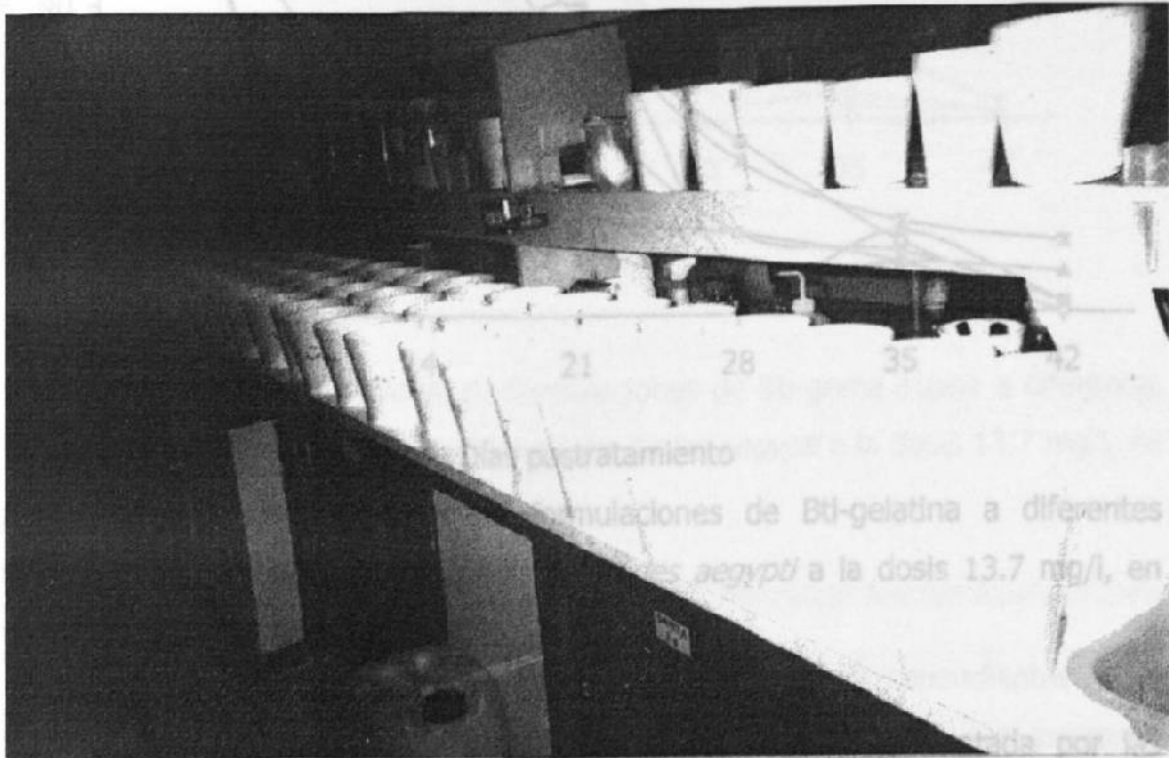
** indica diferencia altamente significativa.

Por lo tanto, las mezclas conteniendo fotoprotector, después de irradiadas, presentaron menores reducciones en la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*, (9.1, 4, 33.6 y 54.6%), que las mezclas irradiadas que no contenían fotoprotector (28, 34, 60 y 77%).

las formulaciones con 10 y 15% de gelatina, disminuyendo la actividad paulatinamente al transcurso del tiempo.

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA RESIDUAL DE FORMULACIONES DE Bti-POLÍMEROS EN LABORATORIO.

Se evaluaron un total de 21 tratamientos (19 formulaciones, además de un formulado comercial y extracto de Bti sin formular), aplicados a la concentración de 13.7 mg/l. De acuerdo con los resultados de CL_{50} del ingrediente activo y el estándar IPS-82 (mostrados en la Tabla 4), la potencia arbitraria de nuestras formulaciones fue de 295.7 UTI/mg



formulaciones extracto de Bti-goma acacia en diferentes concentraciones, contra las larvas de *Ae. aegypti*. Estas preparaciones de Bti-goma acacia mostraron un patrón de actividad tóxica similar a las formulaciones con gelatina, mantuvieron niveles de mortalidad cercanos al 100% en los primeros 3 días postaplicación, posteriormente entre los 7-14 días se observaron entre 67-56% de mortalidad, particularmente en el caso de

las formulaciones con 10 y 15% de gelatina, disminuyendo la actividad paulatinamente al transcurso del tiempo.

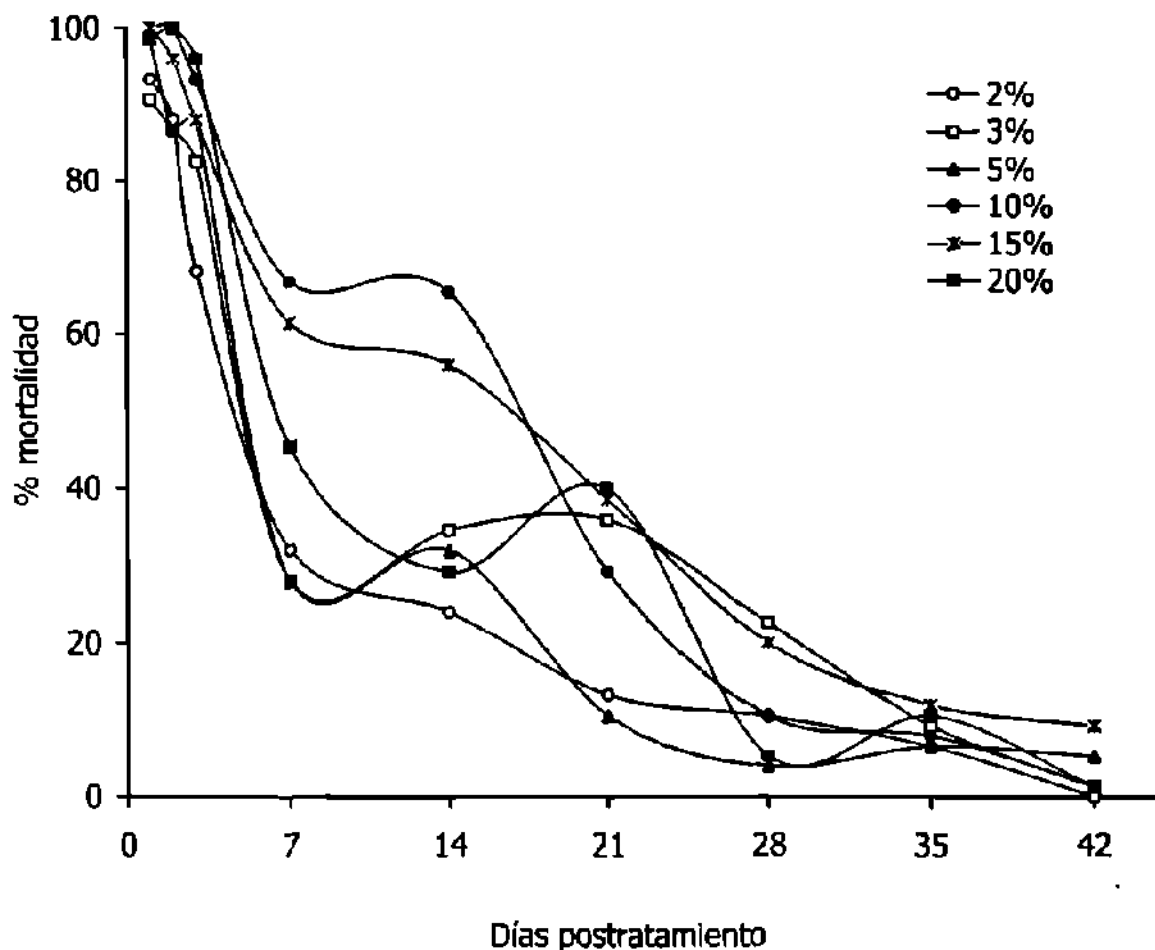


Fig. 7. Actividad tóxica residual de formulaciones de Bti-gelatina a diferentes concentraciones, probadas contra larvas de *Aedes aegypti* a la dosis 13.7 mg/l, en condiciones de laboratorio.

En la Figura 8 se muestra la actividad tóxica residual presentada por las formulaciones extracto de Bti-goma acacia en diferentes concentraciones, contra larvas de *Ae. aegypti*. Estas preparaciones de Bti-goma acacia mostraron un patrón de liberación semejante a las formulaciones con gelatina, mantuvieron niveles de toxicidad cercanos al 100% en los primeros 3 días postaplicación, posteriormente disminuyeron de 80-60% en 7-14 días respectivamente, para concluir en valores alrededor del 20% a los 28 días.

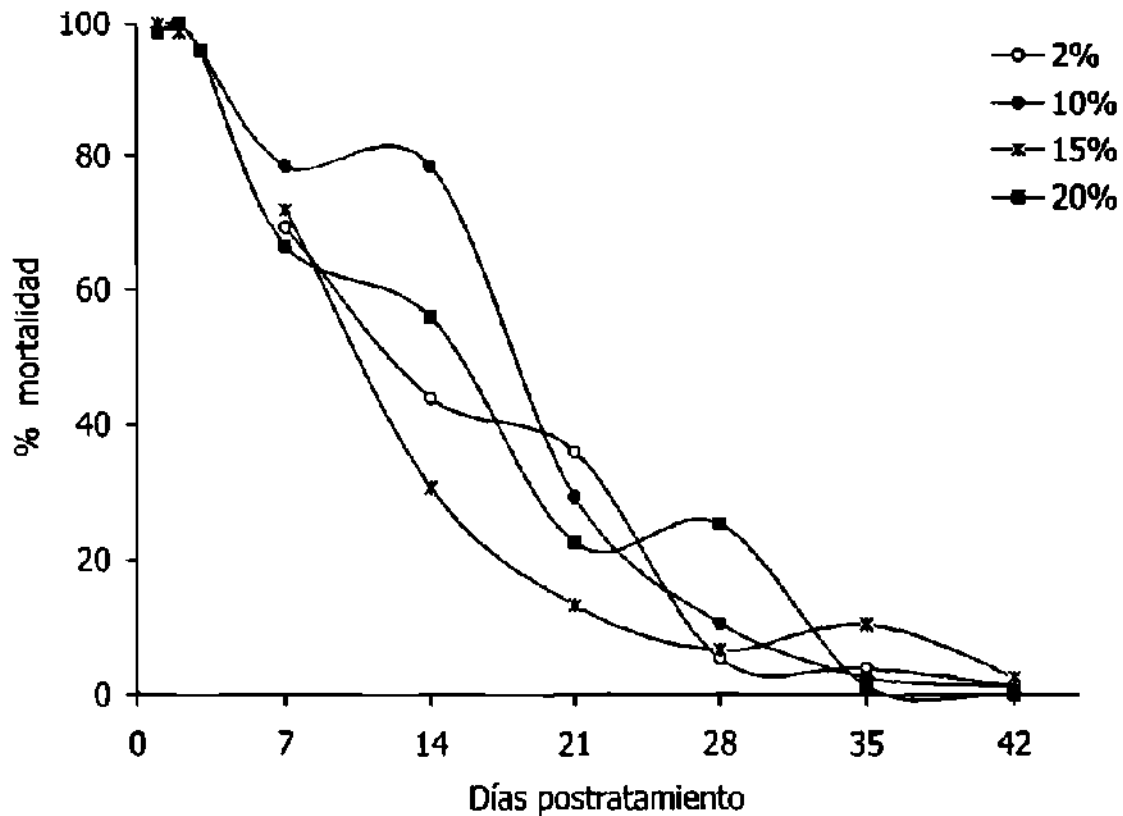


Fig. 8. Actividad tóxica residual de formulaciones de Bti-goma acacia a diferentes concentraciones, probadas contra larvas de *Aedes aegypti* a la dosis 13.7 mg/l, en condiciones de laboratorio.

En la siguiente Figura 9, se muestran los resultados correspondientes a las formulaciones Bti-alginato de sodio, donde se observa que las preparaciones mostraron baja actividad, y el ingrediente activo no se liberó adecuadamente, de tal manera que las mortalidades presentadas estuvieron por debajo del 30%, a lo largo de seis semanas de evaluación.

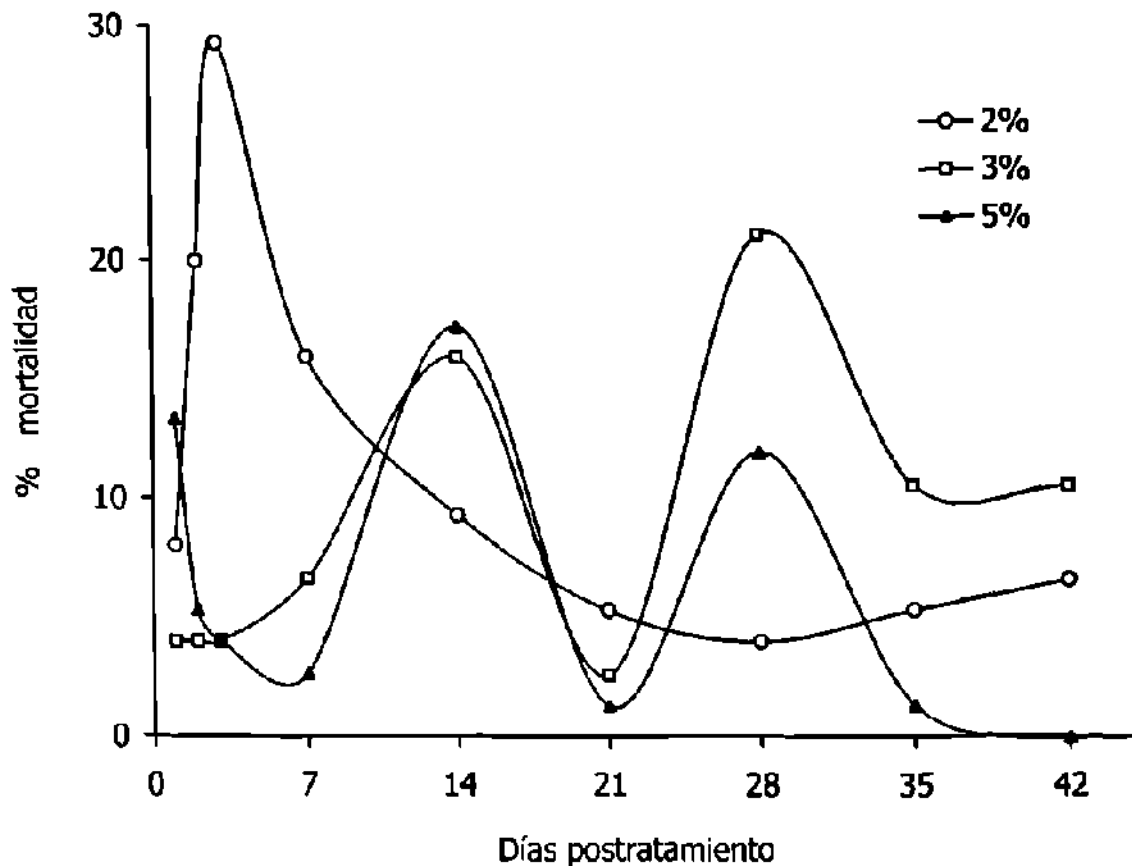


Fig 9. Actividad tóxica residual de formulaciones de Bti-alginato de sodio a diferentes concentraciones, probadas contra larvas de *Aedes aegypti* a la dosis 13.7 mg/l, en condiciones de laboratorio.

En la Figura 10 presentamos la actividad residual mostrada por las formulaciones Bti- parafina en varias concentraciones, en donde las preparadas al 2 y 3 % mostraron toxicidad cercana al 80% al inicio del experimento, mientras que las contenían mayores concentraciones (5, 10, 15 y 20%) presentaron baja mortalidad en *Ae. aegypti*, sin embargo, después estas preparaciones mantuvieron niveles de toxicidad entre 56-78% hasta por 21 días, en el caso particular para formulaciones conteniendo 5 y 10% de parafina. Finalmente a los 35 días postratamiento, la formulación conteniendo 5% parafina mostró todavía toxicidad cerca al 50%, de tal forma que fue la más extensa en actividad residual. En este día, las cifras de

mortalidad de acuerdo con análisis de varianza para un factor y comparación de medias por Tukey mostraron diferencias altamente significativas ($F = 25.41$, g.l.=3, $P \leq 0.001$, Tukey= 5.63)

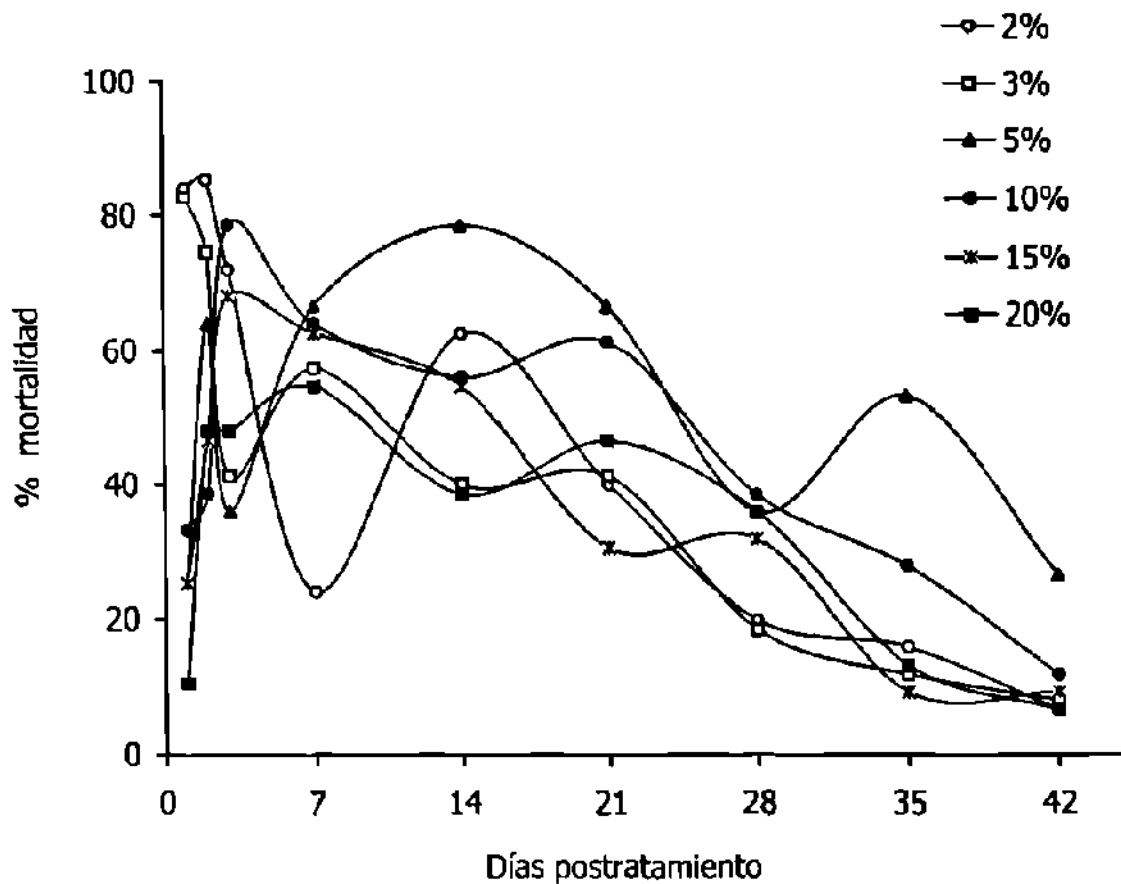


Fig 10. Actividad tóxica residual de formulaciones de Bti-parafina a diferentes concentraciones, probadas contra larvas de *Aedes aegypti* a la dosis 13.7 mg/l, en condiciones de laboratorio.

En la Figura 11 se muestra la actividad residual comparativa de las formulaciones más tóxicas de cada uno de los 4 polímeros, así como la presentada por un producto comercial, Bactimos Briquetas, Lote No. 50831 y extracto de Bti sin formular, aplicados a la misma concentración que las formulaciones preparadas.

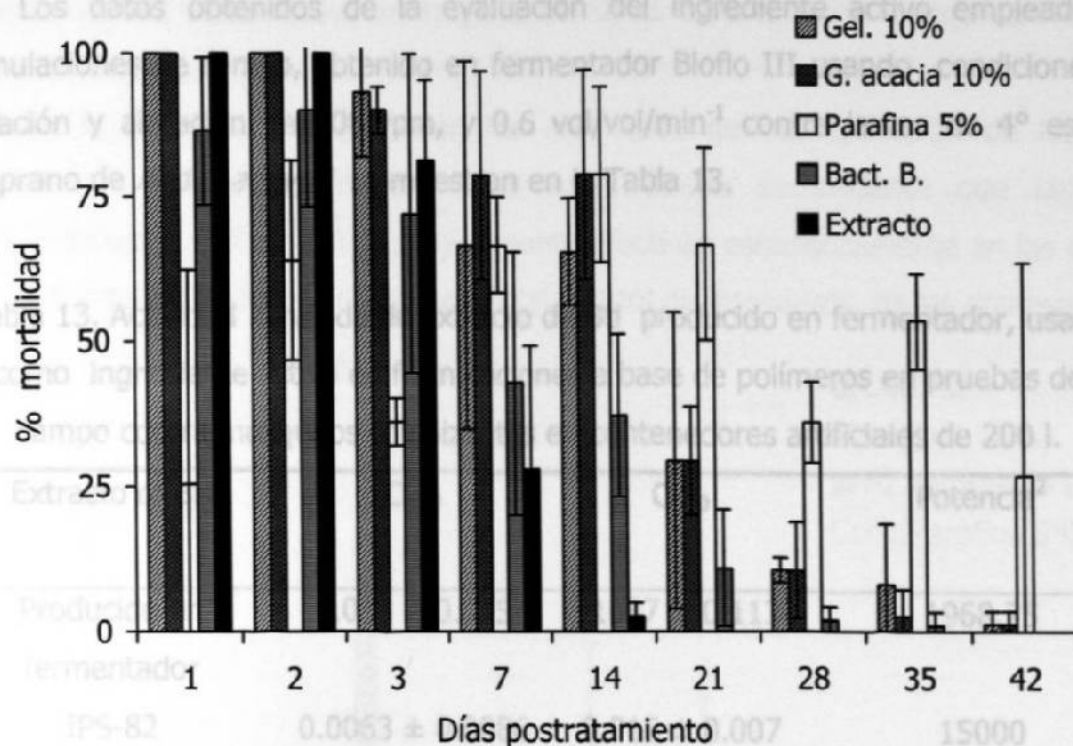


Fig 11. Actividad residual comparativa de formulaciones Bti-polímeros (gelatina, goma acacia, y parafina), Bactimos® briquetas, y extracto de Bti sin formular contra larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

Las formulaciones con gelatina y goma acacia al 10% p/p, presentaron mortalidades entre el 65-78% hasta por 14 días, en tanto la preparación con parafina al 5% mostró más del 50% de mortalidad hasta los 35 días postaplicación, en comparación con el formulado comercial (Bactimos Briquetas) que presentó entre 42-37% en los primeros 7-14 días postratamiento y el extracto sin formular que declinó su actividad hasta 2% en 14 días postaplicación.

7. PRUEBAS DE CAMPO EN CONTENEDORES ARTIFICIALES DE 200 l.

7. 1 Preparación de formulaciones.

Los datos obtenidos de la evaluación del ingrediente activo empleado en formulaciones de campo, obtenido en fermentador Bioflo III usando condiciones de agitación y aireación de 500 rpm, y 0.6 vol/vol/min⁻¹ contra larvas de 4º estadio temprano de *Aedes aegypti* se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad larvicida de extracto de Bti producido en fermentador, usado como ingrediente activo en formulaciones a base de polímeros en pruebas de campo contra mosquitos colonizantes en contenedores artificiales de 200 l.

Extracto of Bti	CL ₅₀	CL ₉₀	Potencia ²
Producido en fermentador	0.048 ± 0.015	0.1687 ± 0.1139	1968.75
IPS-82	0.0063 ± 0.0086	0.016 ± 0.007	15000

¹ CL₅₀ concentración letal media (mg/l) son medias ± Desv. Estándar de 3 experimentos; CL₉₀, concentración letal 90.

² Potencia se expresa en Unidades Tóxicas Internacionales (UTI/mg) de polvo usando el estándar IPS-82 como la referencia contra *Ae. aegypti*.

Con base en la potencia obtenida para el extracto de Bti, de 1968.75 UTI/mg, los formulados preparados a partir de este extracto poseían una potencia arbitraria de 196.8 UTI (10% de ingrediente activo).

7. 2. Evaluación de formulaciones Bti-polímeros en contenedores de 200 l de capacidad.

Se encontraron dos géneros de mosquitos colonizantes. *Aedes aegypti* L. y *Culex* sp. Además de estos, en algunos de los contenedores se encontraron larvas pertenecientes al género *Toxorhynchites* sp, conocido por ser activo depredador de larvas de mosquitos, estas larvas se encontraron en los contenedores que sirvieron como controles, hecho que pudo tener influencia en los resultados, ya que por su

mayor actividad alimenticia, disminuyó la densidad larvaria de los mosquitos *Aedes* y *Culex* del control.

En la Figura 12 se muestran los resultados de la aplicación de los tres tratamientos sobre la densidad larval total, donde es evidente que las tres formulaciones F1, F2 y F3 fueron igualmente efectivas estadísticamente en los días 4 y 7 postratamiento, obteniéndose casi total control de inmaduros, de las dos especies

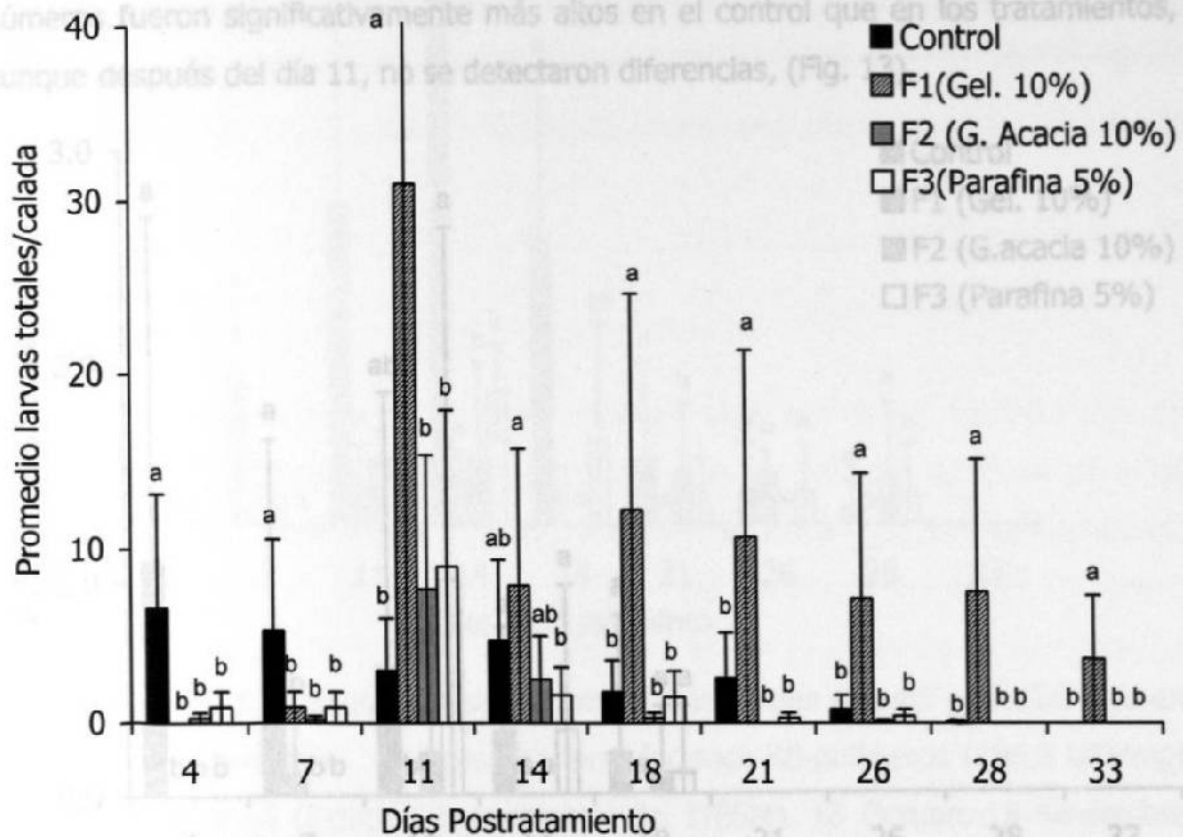


Fig. 12. Densidad de larvas totales de mosquitos *Aedes aegypti* and *Culex sp* en contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

Aedes y *Culex*, sin embargo, para el siguiente día de muestreo (día 11) los números de larvas se incrementaron al más alto nivel durante la prueba, hecho más

evidente para el tratamiento F1, repetición 1, quien mostró un incremento en la población de larvas de 57.2/calada, aunque estos números disminuyeron en los siguientes días de muestreo, se mantuvieron mayores que los otros tratamientos. Para el día 14 después de la aplicación, el tratamiento 3 mostró alguna diferencia parcial con respecto al control.

En relación al número de pupas totales, en los días 4 y 7 postratamiento, los números fueron significativamente más altos en el control que en los tratamientos, aunque después del día 11, no se detectaron diferencias, (Fig. 13).

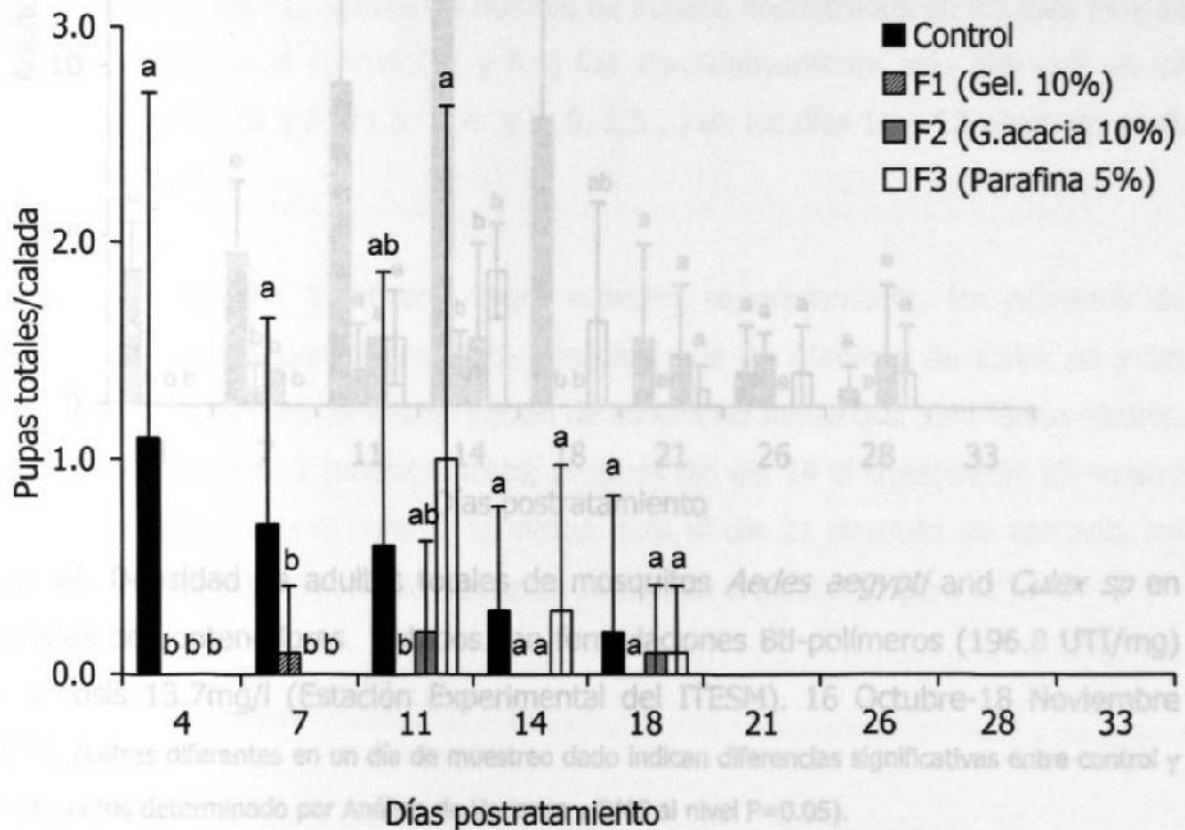


Fig. 13. Densidad de pupas totales de mosquitos *Aedes aegypti* and *Culex sp* en contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

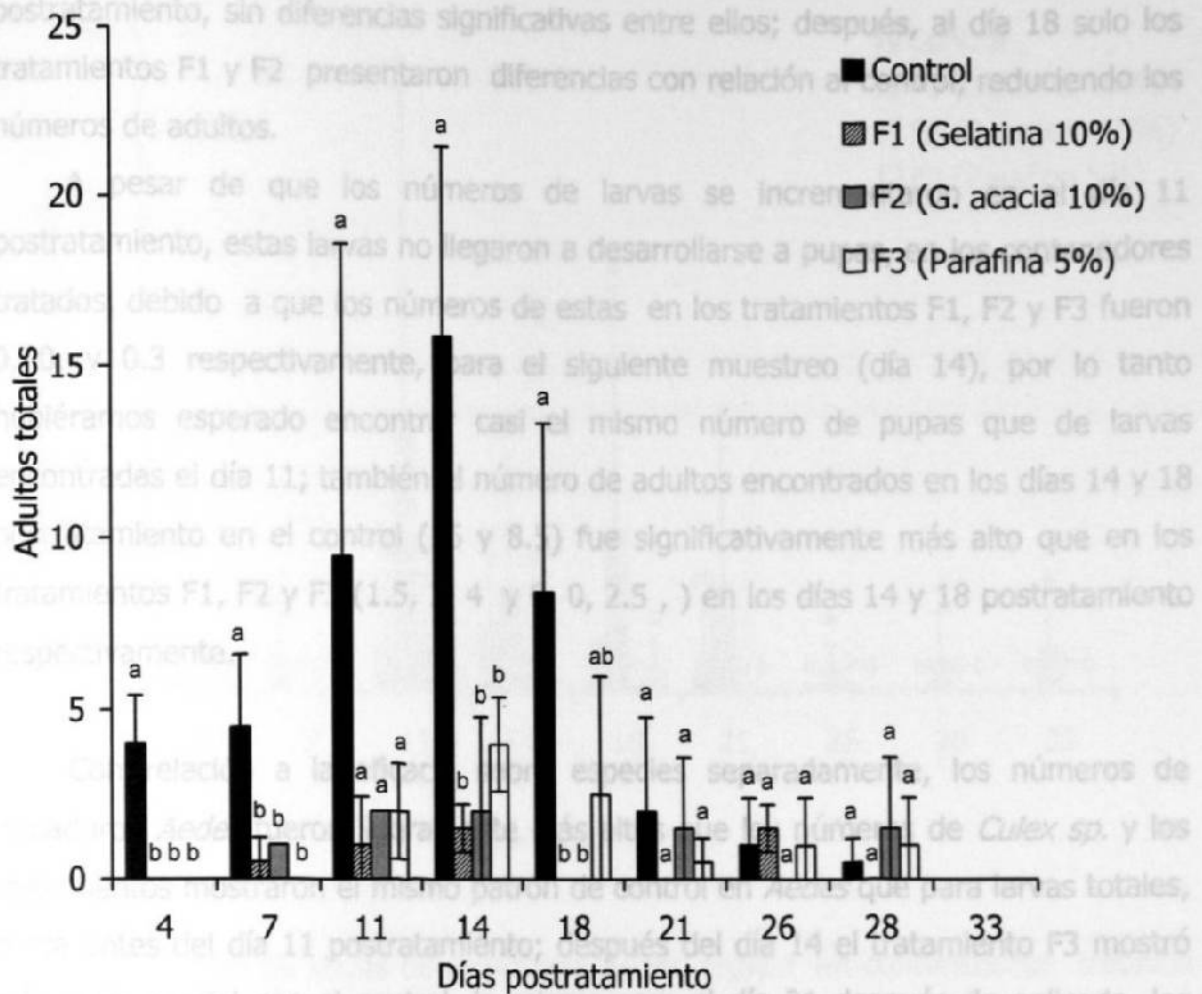


Fig. 14. Densidad de adultos totales de mosquitos *Aedes aegypti* and *Culex sp* en paredes de contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

Aunque el número de adultos generalmente no se reporta en estas pruebas, decidimos registrarlo, para que nos proporcionara un indicativo de la duración de la eficacia de los tratamientos empleados, por lo tanto presentamos estos números, en la Figura 14, que aunque no representan el total de adultos si nos puede indicar que existieron diferencias entre control y tratamientos, ya que estos números fueron significativamente más altos en el control que en los tratamientos, hasta el día 14

postratamiento, sin diferencias significativas entre ellos; después, al día 18 solo los tratamientos F1 y F2 presentaron diferencias con relación al control, reduciendo los números de adultos.

A pesar de que los números de larvas se incrementaron en el día 11 postratamiento, estas larvas no llegaron a desarrollarse a pupas, en los contenedores tratados, debido a que los números de estas en los tratamientos F1, F2 y F3 fueron 0, 0, y 0.3 respectivamente, para el siguiente muestreo (día 14), por lo tanto hubiéramos esperado encontrar casi el mismo número de pupas que de larvas encontradas el día 11; también el número de adultos encontrados en los días 14 y 18 postratamiento en el control (16 y 8.5) fue significativamente más alto que en los tratamientos F1, F2 y F3 (1.5, 2, 4 y 0, 0, 2.5 ,) en los días 14 y 18 postratamiento respectivamente.

Con relación a la eficacia sobre especies separadamente, los números de inmaduros *Aedes* fueron ligeramente más altos que los números de *Culex sp.* y los tratamientos mostraron el mismo patrón de control en *Aedes* que para larvas totales, hasta antes del día 11 postratamiento; después del día 14 el tratamiento F3 mostró diferencia parcial con el control, lo mismo para el día 21 después de aplicado, los tratamientos F2 y F3 fueron parcialmente diferentes al control (Figura 15).

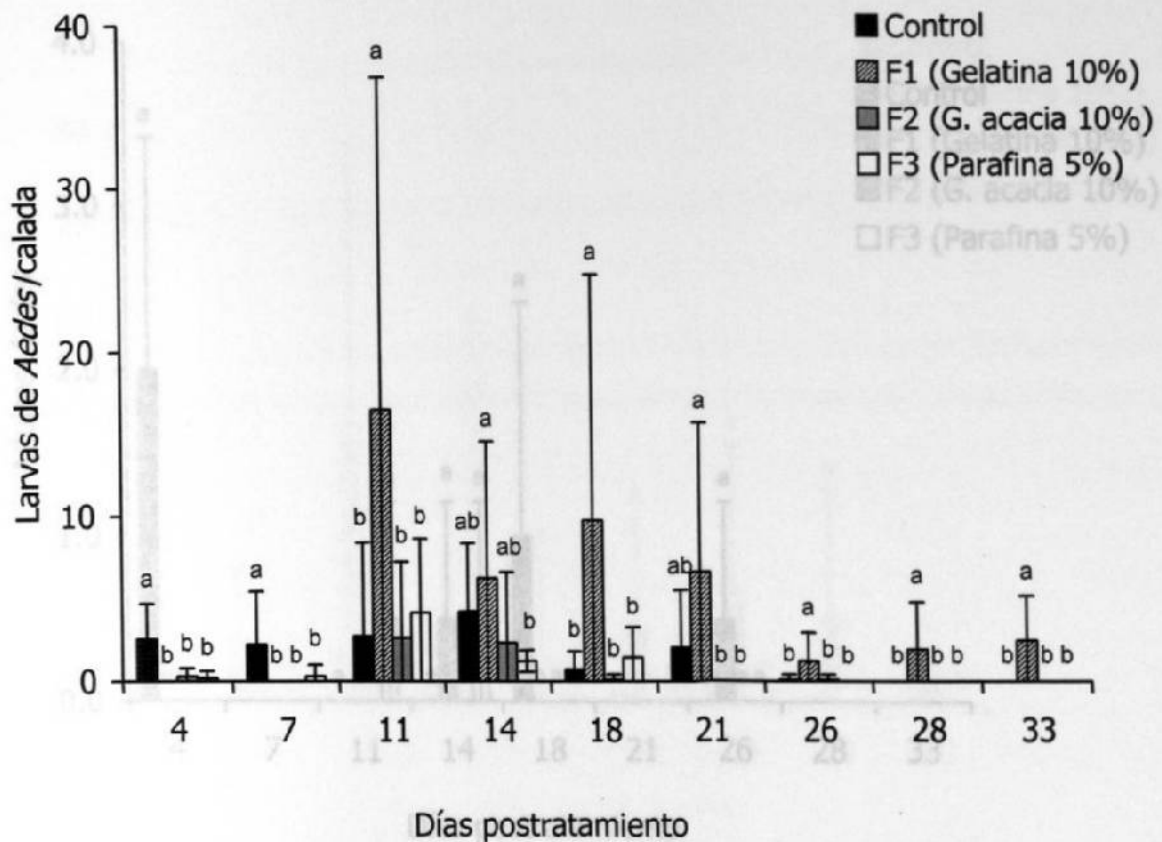


Fig. 15. Densidad de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* en contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

Respecto a los números de adultos *Aedes*, fueron iguales en control y tratamientos en todos los días de muestreo (Fig. 16). 11 postratamiento, todas las formulaciones perdieron su eficacia completamente (Fig. 17), mientras que los números de adultos *Culex* fueron más altos significativamente en el control que en los tratamientos hasta el día 14 postratamiento (Figura 18), después los números fueron similares para ambos, control y tratamientos.

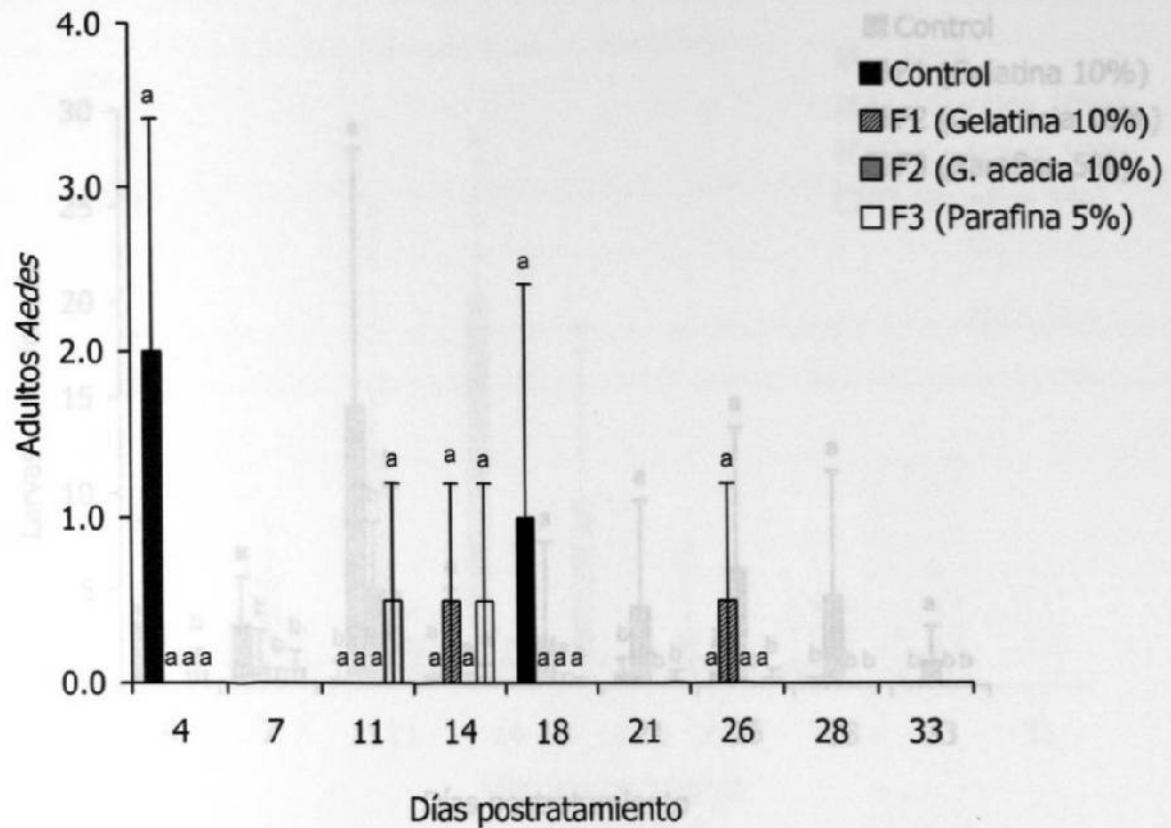


Fig. 16. Densidad de adultos *Aedes aegypti* en contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

Para larvas de *Culex sp* después del día 11 postratamiento, todas las formulaciones perdieron su eficacia completamente (Fig. 17), mientras que los números de adultos *Culex* fueron más altos significativamente en el control que en los tratamientos hasta el día 14 postratamiento (Figura 18), después los números fueron similares para ambos, control y tratamientos.

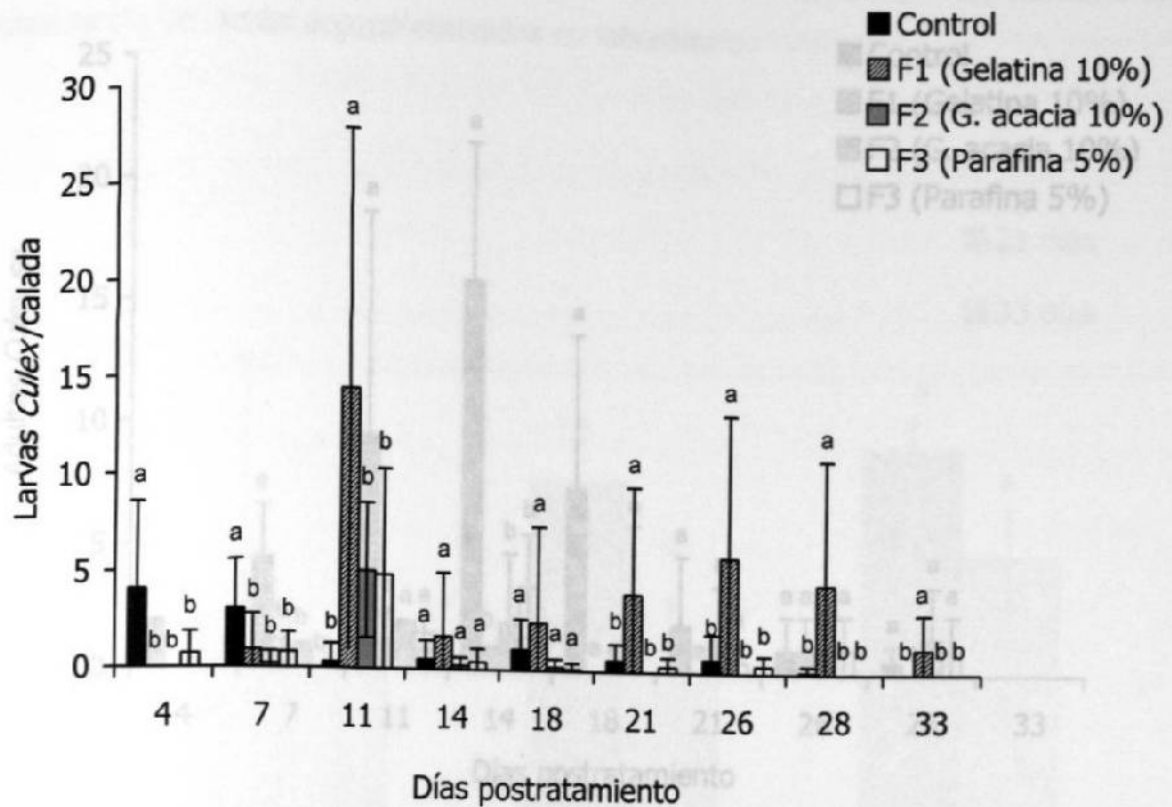


Fig. 17. Densidad de larvas de *Culex* sp. en contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

mostraron actividad tóxica residual de 69, 55 y 54% de mortalidad respectivamente, sobre larvas de *Aedes aegypti* obtenidas en laboratorio.

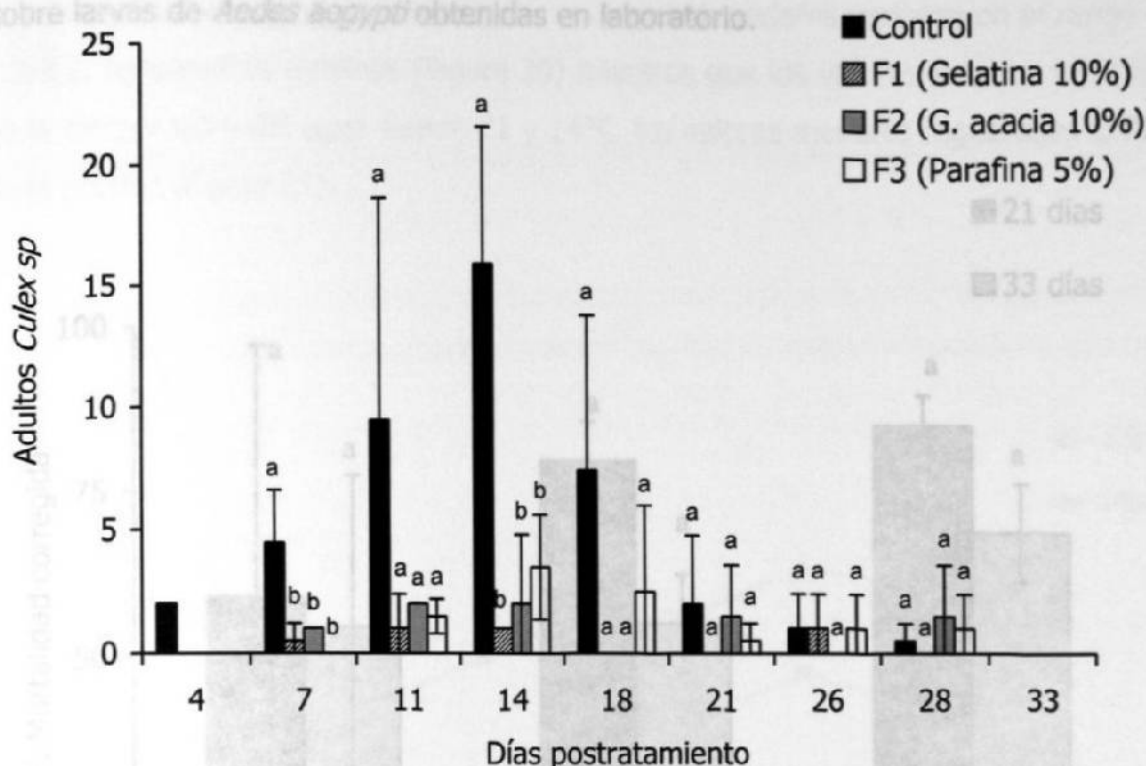


Fig. 18. Adultos de *Culex* sp. en contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg) a la dosis 13.7mg/l (Estación Experimental del ITESM). 16 Octubre-18 Noviembre 2000. (Letras diferentes en un día de muestreo dado indican diferencias significativas entre control y tratamientos determinado por Análisis de Varianza y DMS al nivel $P=0.05$).

7. 6. Actividad tóxica residual.

Para el día 21 postratamiento, encontramos actividad residual en agua y sedimentos obtenidos de contenedores tratados con formulaciones F3, F2 y F1 induciendo 85, 80 y 59% de mortalidad (corregida contra controles) respectivamente, en larvas de 4° estadio temprano de *Aedes aegypti* obtenidas en laboratorio (Figura 19), sin diferencias significativas entre los tres tratamientos. Posteriormente, para el día 33 postratamiento, al final de la prueba, las muestras de agua y sedimentos de los contenedores tratados con las formulaciones F3, F2 y F1,

7.7. mostraron actividad tóxica residual de 69, 55 y 54% de mortalidad respectivamente, sobre larvas de *Aedes aegypti* obtenidas en laboratorio. Los valores de pH variaron en el rango de 7.2-8.2, ligeramente alcalinos (Figura 20) mientras que los valores máximo y mínimo de la temperatura del agua fueron 22 y 14°C, los valores menores registrados al final de la prueba (Figura 21).

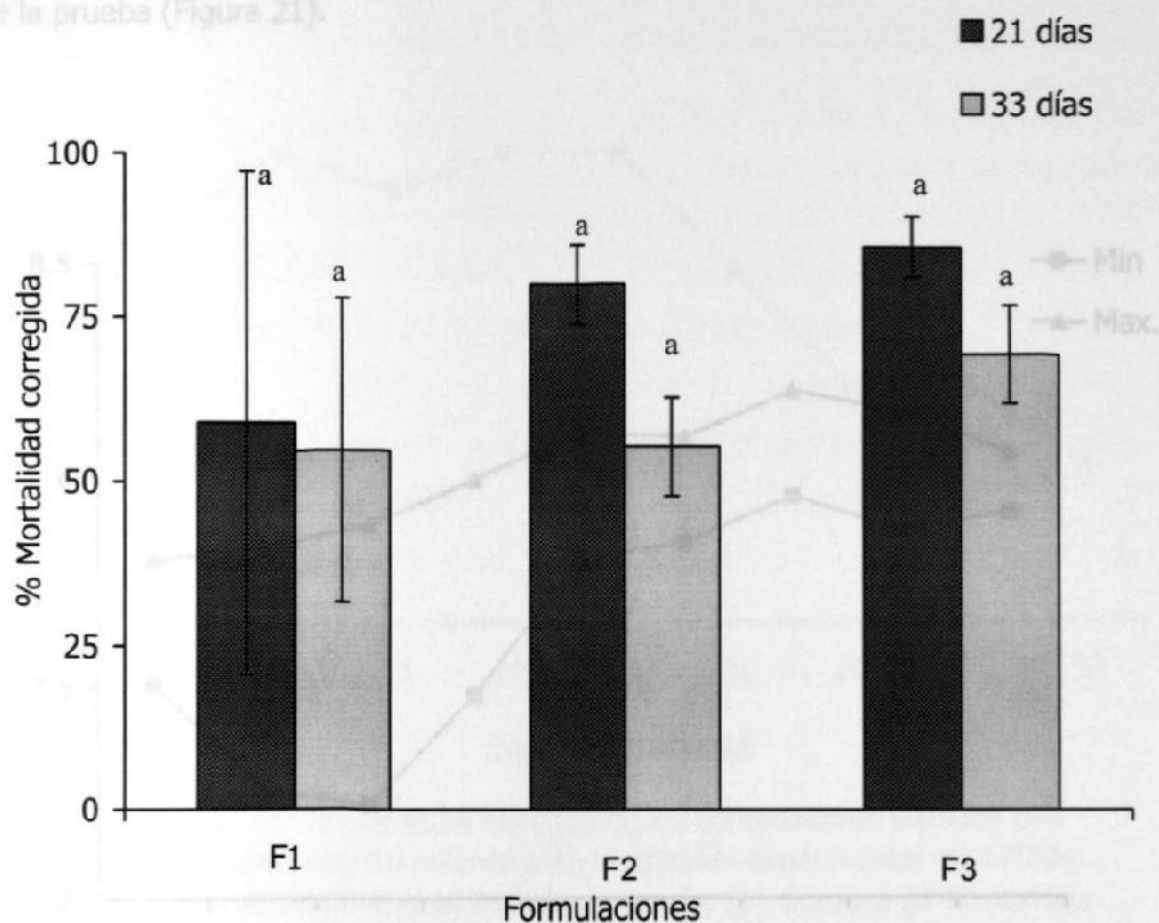


Fig. 19. Actividad residual en muestras de agua y sedimentos obtenidos de contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros (196.8 UTI/mg), F1(gelatina 10%), F2(Goma acacia 10%) y F3 (Parafina 5%) a la dosis 13.7 mg/l sobre larvas de 4° estadio de *Aedes aegypti* (corregido contra controles) en la estación experimental del ITESM en el período 16 octubre-18 Noviembre del 2000. (Letras iguales en un día de muestreo dado no indican diferencias significativas entre tratamientos determinado por Análisis de Varianza para un factor y DMS al nivel $p= 0.05$).

7.7. Registro de factores ambientales

Los valores de pH del agua presentados en los contenedores variaron en el rango de 7.2-8.2, ligeramente alcalinos (Figura 20) mientras que los valores máximo y mínimo de la temperatura del agua fueron 22 y 14°C, los valores menores registrados al final de la prueba (Figura 21).

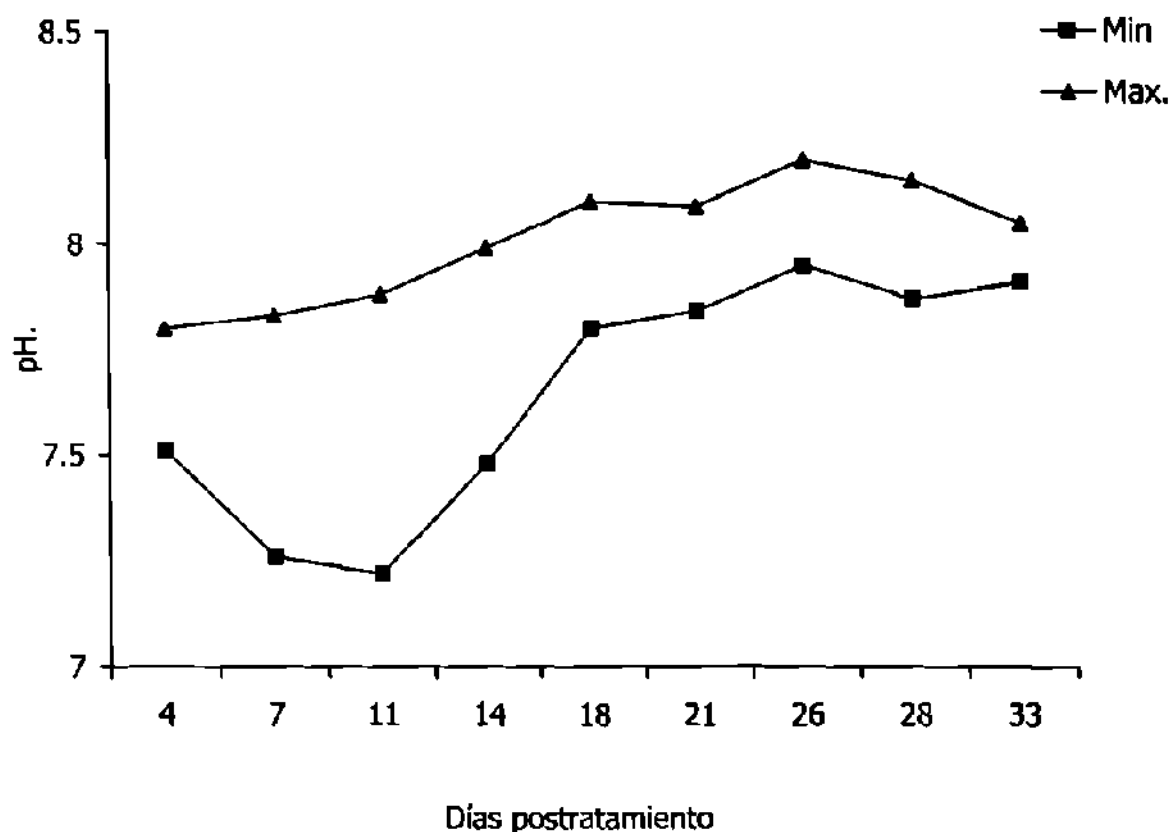


Fig. 20. Rango de pH del agua de contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros(196.8 UTI/mg) en el campo experimental del ITESM durante el período de prueba(16 de Octubre- 18 Noviembre 2000)

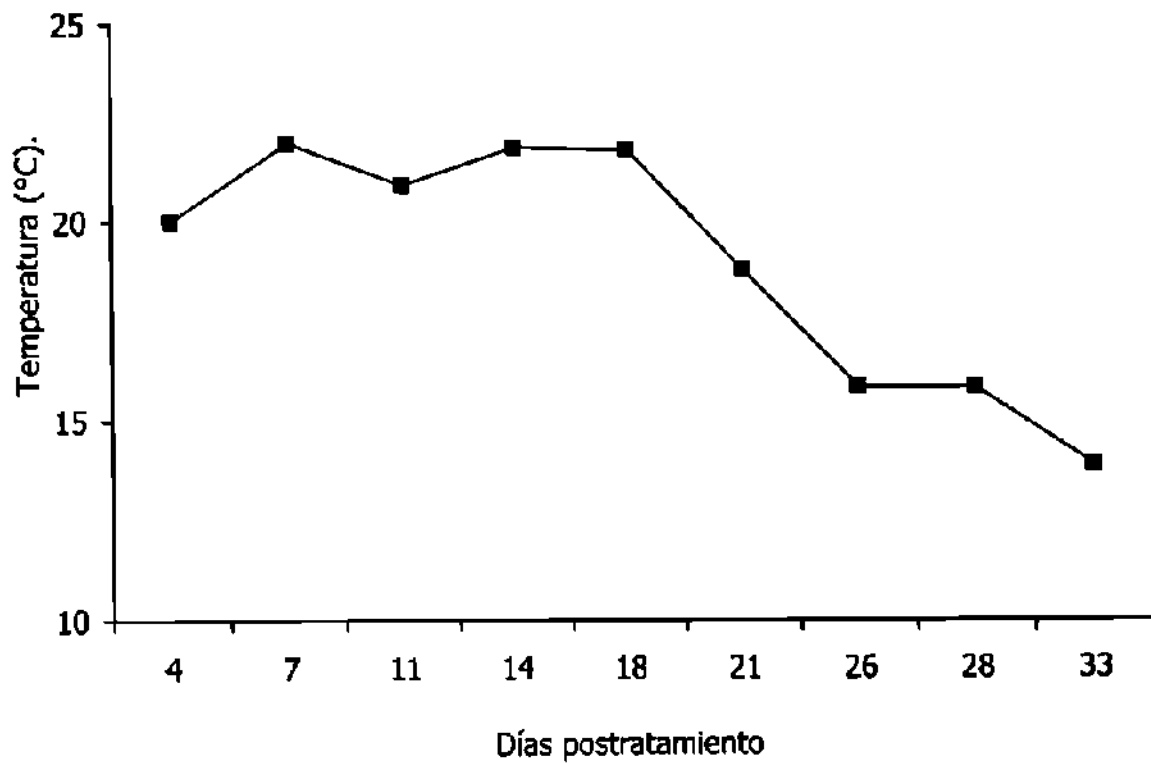


Fig. 21. Temperatura del agua de los contenedores tratados con formulaciones Bti-polímeros en la estación experimental del ITESM, observados durante el período de prueba (16 Octubre-18 Noviembre 2000).

DISCUSIÓN

Los bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* representan el más alto volumen de insecticidas naturales producidos en todo el mundo y se usan como parte de un sistema de manejo de plagas integrado (Feitelson *et al* 1992). Para la producción del complejo insecticida se han estudiado la producción por lote, por lote alimentado y por cultivo continuo, sin embargo, hasta la fecha, el cultivo por lote rinde la mayor tasa cry: espora.

La actividad insecticida del cristal producido por la misma cepa de Bt puede ser afectada por el medio de cultivo y las condiciones operacionales (Dulmage, 1971; Abdel-Hameed, 1991). De acuerdo con lo anterior, nuestra cepa T14 225 de Bti, propagada en el medio de cultivo basado en subproductos, previamente seleccionado, bajo diferentes condiciones de agitación-aireación, produjo rendimientos variables del complejo espora-cristal, desde 9.1 hasta 15.7 g/l, dependiendo de las condiciones operacionales usadas. Sin embargo, el criterio más importante para optimizar la producción fue basado en la actividad insecticida presentada sobre larvas de *Aedes aegypti* de 4º estadio temprano, de tal forma que los extractos más tóxicos fueron producidos en las combinaciones agitación-aireación 2 (300 rpm-1 vol/vol min⁻¹), y 3 (500 rpm-0.6 vol/vol min⁻¹), con valores promedio de 47.2 y 59.75% de mortalidad probados a la concentración 0.05 mg/l, mientras que los extractos restantes presentaron menos del 1% de mortalidad en las mismas condiciones.

Posteriormente al determinar la CL₅₀ de los dos más tóxicos, obtuvimos medias de 0.2675 y 0.0685 mg/l, para los extractos obtenidos de las combinaciones 300 rpm-1 vol/vol min⁻¹ y 500 rpm-0.6 vol/vol min⁻¹ respectivamente, dichas medias comparadas mediante una prueba T al nivel 0.05 resultaron sin diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, la desviación estándar alcanzada fue diez veces menor para los extractos obtenidos en la combinación 3 (500 rpm-0.6 vol/vol min⁻¹) que para los producidos en la

combinación 2 (300 rpm-1 vol/vol min⁻¹), por lo tanto el coeficiente de variación también fue mayor para los extractos producidos en esta última combinación.

Con relación al tiempo total de fermentación, al usar 300 rpm-1 vol/vol min⁻¹, el tiempo disminuyó hasta 18 h, mientras que para 500-0.6VVM, fueron 24.3 h en promedio. En cuanto a la productividad alcanzada se situó en un valor de 0.50 g/l/h en promedio para ambas combinaciones.

De esto se deduce que para nuestros resultados, la combinación de agitación-aireación más efectiva sería la de 500 rpm- 0.6 vol/vol min⁻¹ debido a que la actividad insecticida del extracto obtenido al usar esas condiciones resultaría con menores variaciones, aunque es conocido que ningún lote es exactamente igual a otro en toxicidad, como nos sucedió en nuestros experimentos, esto se apoya en forma importante con el reporte de Vicenteño *et al*, (2001), quien encontró cantidades diferentes de proteína cry obtenida de colonias reaisladas de la misma cepa de Bt y posteriormente crecidas en matraz agitado.

Nuestros resultados de fermentación con Bti, son cercanos a los obtenidos por Galán-Wong 1993, con la variedad *aizawai*, ya que en sus fermentaciones realizadas en reactores de 14 l encontró que con valores de agitación- aireación de 500 rpm-0.75 vol/vol min⁻¹ y 500-1 vol/vol min⁻¹, la actividad insecticida de los extractos producidos fue mayor sin diferencias significativas entre ambas combinaciones, sin embargo, difiere con nuestros resultados, en que cuando usó 300 rpm-1 vol/vol min⁻¹ obtuvo un extracto que produjo 41% de mortalidad menos, mientras que nosotros encontramos que los extractos producidos tanto a 500 rpm-0.6 vol/vol min⁻¹ como a 300 rpm-1 vol/vol min⁻¹ tenían actividad insecticida semejante.

Por otra parte, contrario a lo obtenido por Abdel-Hameed,(1991) quien realizó estudios de fermentación con Bti y encontró valores optimizados de 200 rpm de agitación y aireación en el rango de 0.37-0.62 vol/vol min⁻¹, nosotros pensamos que a valores de aireación menores a 0.6 vol/vol min⁻¹, la actividad insecticida disminuiría significativamente, lo mismo que con valores de agitación menores a 300 rpm, y que tendrían que combinarse valores de aireación altos por ejemplo, 1

vol/vol min^{-1} , con valores de agitación relativamente menores como 300 rpm, o bien, valores de aireación no muy altos (0.6 vol/vol min^{-1}) con valores de agitación altos (500 rpm) para poder obtener productos con alta toxicidad.

Sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado en optimizar la producción, con el uso de diferentes condiciones operacionales, en el reactor Bioflo III, la actividad insecticida de los extractos no fue mayor que la obtenida en matraz, por lo tanto se necesita investigar más a fondo la producción de la δ -endotoxina, ya que diversos trabajos realizados (Lopez y López *et al.* 2000) mencionan que las mejores condiciones para la producción de esporas fueron diferentes de aquellas para la producción del cristal, apoyando otros reportes de que las cuentas de esporas finales altas no son proporcionales a toxicidades altas (Avignone-Rossa y Mignone 1993), aunque algunos de los trabajos reportados no incluyen resultados de bioensayos contra la larva blanco, sino solamente de cuentas de esporas, o determinación de proteína cry mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

De acuerdo a los resultados relativos a la actividad insecticida del extracto de Bti producido en matraz, utilizado para bioensayos de actividad residual en laboratorio, la potencia obtenida fue de 5906 UTI/mg, basadas en este valor, las formulaciones preparadas con este extracto tuvieron una potencia arbitraria de 295.5 UTI/mg, este título fue similar al utilizado por Ali *et al.* (1994), de 200 ITU/mg, para formulaciones de Abbott, en su trabajo de semicampo contra larvas de *Ae. (Ochlerotatus) taeniorhynchus*, mientras que las formulaciones preparadas para pruebas de campo resultaron bajas en potencia, de aproximadamente 196.8 UTI/mg, debido a que el extracto utilizado, producido en fermentador Bioflo III, resultó de menor potencia que el producido en matraz.

En nuestros bioensayos de laboratorio para determinar el efecto del almacenamiento en la actividad insecticida del extracto, cuando se mezcló con los cuatro diferentes polímeros, como componentes de las formulaciones, nuestros resultados mostraron que las cuatro diferentes mezclas ingrediente activo-polímero, permanecieron estables, esto es, mantuvieron casi el 100% de actividad por más de 8 meses bajo condiciones de laboratorio (20-35° C y 50-80% H. R.)

cuando se probaron a la concentración de 0.9 mg/l; resultados semejantes obtuvieron Nayar *et al* (1999), cuando probaron tres diferentes formulaciones de Abbott, mantenidas bajo condiciones de laboratorio iguales a las nuestras, mientras que después de un año de almacenamiento, nuestros formulados con parafina mostraron disminución significativa de la actividad, de alrededor de un 19%, debida probablemente a la naturaleza química de la parafina.

En relación con el contenido de humedad de las formulaciones antes y después del almacenamiento por un año, el valor fue muy semejante, con variaciones en el rango de 0.4-2.4%.

La fotoinactivación por luz ultravioleta del sol es uno de los principales factores ambientales que afectan la estabilidad de las toxinas de *B. thuringiensis* (Leong *et al* 1980; Molloy *et al* 1981; Pozsgay *et al* 1987). En los experimentos llevados a cabo para observar el efecto de la luz ultravioleta de 254 nm λ sobre la actividad insecticida del extracto de Bti y mezclas ingrediente activo-polímero, encontramos que hubo una reducción significativa del 40-46% en la actividad insecticida del extracto de Bti sin formular, después de 72 h de exposición a la luz uv, cuando el extracto fue irradiado en forma de polvo seco; sin embargo tuvimos que usar diferentes concentraciones del ingrediente activo para poder observar el efecto sobre la larva blanco, mientras que cuando se expusieron soluciones acuosas del bioinsecticida, se encontraron reducciones más drásticas, como en el caso del trabajo realizado por Liu *et al* (1993) quien encontró que la toxina de Bti perdió toda actividad después de la exposición a 1.34×10^3 Julios/m²

Las mezclas de ingrediente activo-polímero-fotoprotector después de la irradiación con luz ultravioleta por 72 h, mostraron algunas diferencias en la actividad sobre *Ae. aegypti* con respecto a las mezclas no irradiadas, de tal forma que las preparaciones irradiadas conteniendo gelatina y goma acacia mostraron bajas variaciones, demostrando con esto que tanto el fotoprotector añadido, además de la propia naturaleza química del polímero usado, protegieron la actividad de la toxina de Bti contra el efecto de la luz ultravioleta, mientras que las mezclas irradiadas conteniendo alginato de sodio y parafina mostraron reducciones

mayores en la toxicidad sobre *Aedes aegypti* que las mezclas no irradiadas, aunque estas reducciones fueron significativas solo para las mezclas con parafina.

Este resultado nosotros creemos que se debe a la naturaleza química del polímero usado, para dar más o menos protección contra el efecto de la radiación ultravioleta, además de lo que pueda proporcionarle el fotoprotector usado, ya que en pruebas adicionales realizadas a mezclas ingrediente activo-polímero sin fotoprotector, probadas en las mismas condiciones que las mezclas conteniendo fotoprotector, los resultados mostraron una mayor reducción en los porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* presentes en las mezclas que no contenían fotoprotector (en un rango de 28-64%), comparada con la reducción de la mortalidad presentada por las mezclas conteniendo fotoprotector (4-54%).

De esta manera, se confirma que la adición de sustancias para proteger la actividad de la toxina de Bti de la radiación ultravioleta, podría extender la actividad residual de las formulaciones en el campo, de acuerdo a trabajos realizados con anterioridad a este, en formulaciones preparadas contra lepidópteros (Shapiro, 1989; Morales Ramos *et al*, 1998; Tamez-Guerra *et al*, 2000).

En los estudios para evaluar la persistencia tóxica de nuestros formulados en laboratorio, los cuatro polímeros usados mostraron diferentes características de liberación, debidos en parte a su propia naturaleza química. Así, tenemos que los formulados conteniendo gelatina y goma acacia mantuvieron niveles de mortalidad entre 60-80% sobre *Ae. aegypti* hasta por 14 días, mientras que para los formulados con alginato y parafina sus patrones de liberación fueron diferentes, para alginato, las toxicidades mostradas fueron muy bajas, (menos del 30%), que tal vez se debió a la baja solubilidad del polímero, ya que formó mezclas muy compactadas, difíciles para liberar el ingrediente activo, en tanto, los resultados obtenidos con formulaciones incluyendo parafina mostraron toxicidades bajas al inicio del experimento, mientras que más tarde la actividad larvícida fue mayor, con niveles entre el 60-80% de mortalidad hasta por 21 días, aún a los 35 días postratamiento, la más tóxica de las formulaciones con parafina (5%) presentó

más del 50% de mortalidad, en comparación con un formulado comercial, (Bactimos Briquetas), quien mostró solo 1% de mortalidad, mientras que el extracto de Bti sin formular perdió toda actividad entre 14-21 días después de la aplicación.

En las pruebas de campo, realizadas en contenedores plásticos de 200 l colonizados por los géneros de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex* sp, observamos que las tres formulaciones probadas, F1, F2 y F3, con gelatina 10%, goma acacia 10% y parafina 5% respectivamente, fueron igualmente efectivas después de 4 y 7 días de tratamiento, para reducir larvas totales (de todos los estadios), pupas y adultos de las dos especies encontradas. Sin embargo, después del día 11, todos los tratamientos perdieron su eficacia, excepto para la formulación F3, quien mostró alguna diferencia parcial con el control para el día 14 después de la aplicación.

Ali *et al* (1994) obtuvieron resultados similares en otro estudio, cuando probaron formulaciones de maíz y Bti (corncob), quienes observaron más del 75% de mortalidad larval en *Ochlerotatus (Aedes) taeniorhynchus* a los 9 días de postratamiento, en un bioensayo de semicampo. De igual manera, Su y Mulla (1999), quienes usaron las recientemente desarrolladas formulaciones granulares dispersibles en agua (WDG) de Bti and *B. sphaericus* contra algunas especies de *Culex* obtuvieron control de mosquitos por más de 7-12 días, aunque estas formulaciones tenían mucha mayor potencia (cerca de 4,000 UTI/mg) que las nuestras (196.8 UTI/mg), sin embargo estas últimas mantuvieron su persistencia tóxica por casi el mismo tiempo.

Además de esto, otro factor que influyó en nuestros resultados, fue el que en los contenedores que sirvieron como controles se encontraron alrededor de 14 larvas de *Toxorhynchites* sp, conocido por ser un depredador activo de larvas de *Aedes* y *Culex*, quienes pudieron haber contribuido a reducir el número de estos en los controles, por lo tanto las diferencias ya no fueron significativas.

En relación con el agua de los contenedores, en algunos de ellos, (F1, repetición 1 con la mayor densidad de población) apareció muy contaminada, con

una gran cantidad de materia orgánica en descomposición; pensamos que este hecho podría haber causado que la toxina de Bti perdiera su actividad tóxica, debido a que se conoce que en agua contaminada, la toxina de Bti se degrada fácilmente (Thiéry *et al* 1999).

El incremento en la densidad larval registrado para el día 11 postratamiento podría haber sido causado por un aumento en la temperatura ambiente y también por la lluvia que ocurrió en esos días, quien propició la atracción de la oviposición de los mosquitos; sin embargo, aunque el número total de larvas que eclosionaron en ese día aumentó, es posible que estas no llegaran a desarrollarse a pupas o adultos, debido a que en los siguientes días de muestreo (14 y 18 postratamiento) no se registraron pupas y solamente 2 adultos, en el contenedor con la mayor densidad de población.

También pudimos observar que el número promedio de adultos que se encontraron en las paredes de los contenedores tratados, fueron significativamente más bajos que el del control, hasta el día 18 postratamiento, esto reflejó algún nivel de control en los tratamientos aplicados.

Además, aun cuando nuestras formulaciones perdieron su eficacia después de 7-10 días de aplicado el tratamiento, en una prueba de actividad residual, realizada en los días 21 y 33 postratamiento contra larvas de *Ae. aegypti* criadas en laboratorio, pudimos observar que en las muestras de agua y sedimentos, obtenidas de contenedores tratados, hubo toxicidad residual que indujo entre 59-85% de mortalidad larval (corregida contra controles) en el día 21 y 54-69% para el día 33 postratamiento.

Esto fue significativo, debido a que Boisvert y Boisvert (1999), en su reporte de persistencia de la actividad larvívica de la toxina de Bti aplicada en una cámara de difusión dentro de un estanque, permeable solo al agua, aunque sin larvas de mosquito, que pudieran ingerir parte de la toxina, encontraron actividad residual de cerca del 50% de la inicial, después de un mes en el estanque. En el mismo reporte, ellos observaron que, cuando la toxina de Bti se colocó en el substrato perifiton (con material vegetal), aproximadamente un 30% de la toxicidad inicial

permaneció en la fracción líquida, después de un mes, mientras que en el sustrato con muestras vegetales hubo todavía 54% de la actividad tóxica original puesta en las cámaras, asociada con las muestras de vegetación después de 5 meses, demostrando que la actividad tóxica de Bti en condiciones de clima frío es mucho más larga de la que previamente se había reportado.

CONCLUSIONES

- ❖ Los extractos insecticidas más tóxicos de Bti 225 obtenidos a nivel de fermentador Bioflo III se produjeron cuando se emplearon condiciones de agitación-aireación de 300 rpm-1 vol/vol min⁻¹ y 500 rpm-0.6 vol/vol min⁻¹, sin diferencias significativas en toxicidad, aunque para la primera de las combinaciones se presentaron variaciones mayores en la concentración letal media de los extractos obtenidos que para la segunda combinación.
- ❖ Las mezclas Bti-polímeros, presentaron porcentajes de humedad entre 5.3 a 6.7%, recién preparadas, mientras que después de un año de almacenamiento a 20-35°C, mostraron porcentajes de humedad en el rango de 4.3-6, con diferencias en el rango de 0.4-2.4%.
- ❖ Las formulaciones Bti-polímeros, probadas a concentración de 0.9 mg/l contra *Aedes aegypti* mantuvieron su actividad tóxica durante 8 meses sin pérdida significativa, almacenadas a temperatura de 20-35 °C y 50-80% H. R., mientras que después de un año, únicamente las formulaciones preparadas con parafina mostraron una reducción significativa de la actividad de aproximadamente 19%.
- ❖ El extracto insecticida de Bti 225, después de 72 h de irradiación con luz UV de 254 nm λ , presentó reducción de la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* de 40-46%.
- ❖ Las formulaciones Bti-polímeros irradiadas presentaron reducciones variables en la mortalidad de las larvas de prueba en comparación con formulaciones no irradiadas, de tal forma que las preparaciones con gelatina y goma acacia mostraron reducciones bajas en la mortalidad (9.1 y 4% respectivamente),

- mientras que para las formulaciones con alginato de sodio y parafina, las reducciones en la mortalidad de *Ae. aegypti* fueron mayores, de 33.6 Y 54.6% respectivamente.
- ❖ La formulación del extracto de Bti con polímeros tales como gelatina, goma acacia y parafina en concentración del 5-10% permitió mantener niveles de toxicidad residual sobre *Aedes aegypti* entre 60-80% hasta por 2-3 semanas postaplicación, en laboratorio, mientras que las preparaciones con alginato de sodio mostraron bajos niveles de toxicidad menores al 30% durante el tiempo de evaluación.
 - ❖ En comparación con nuestros formulados preparados, el extracto insecticida de Bti sin formular perdió toda actividad residual contra *Ae. aegypti* entre los 14-21 días postaplicación en laboratorio, mientras que un formulado comercial (Bactimos Briquetas), presentó 37% de mortalidad después de 14 días.
 - ❖ En pruebas de campo realizadas con formulaciones Bti-polímeros, preparados con una potencia arbitraria de 196.8 UTI/mg, contra larvas de mosquitos de todos los estadios de *Ae. aegypti* y *Culex sp*, las formulaciones Bti-polímeros preparadas con gelatina y goma acacia al 10% P/P y parafina al 5% fueron igualmente efectivas en los días 4 y 7 postratamiento.
 - ❖ Los números de pupas encontradas en los contenedores tratados fueron significativamente más bajos que en el control, en los días 4 y 7 postratamiento, mientras que después del día 11 no se detectaron diferencias.
 - ❖ Adicionalmente se observó también que el número de adultos en los contenedores tratados con formulaciones Bti-gelatina y Bti-goma acacia se

mantuvieron significativamente más bajos que el control hasta el día 18 postratamiento.

- ❖ En pruebas de actividad residual, realizadas a los 21 y 33 días postratamiento, con muestras de agua obtenidas de contenedores tratados con las tres formulaciones Bti-polímeros (gelatina 10%, goma acacia 10% y parafina 5%), se encontró toxicidad que indujo entre 59-85% y 54-69% de mortalidad respectivamente, en *Aedes aegypti* criadas en laboratorio, sin diferencias significativas entre ellas.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Hameed, A., G. Carlberg, and O. M. El-Tayeb. 1991. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt. IV. Characterization of fermentation conditions for δ -endotoxin production. W. J. Microbiol. and Biotechnol:231-236.
- Ali, A., Xue, R., Lobinske R. Y. N. Carandang. 1994. Evaluation of granular corn cob formulations of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* against mosquito larvae using a semi-field bioassay method. J. Am. Mosq. Control. Assoc.10: 492-495.
- Aly, C., M.S. Mulla, W. Schnetter, and B. Z. Xu. 1987. Floating bait formulations increase effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, against *Anopheles* larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3:583-588.
- Avignone-Rossa C., and C. Mignone 1993. Delta endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol Lett. 15:295-300.
- Becker. N. and F. Rettich. 1994. Protocol for the introduction of New *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10:527-533.
- Becker N., P. Schädler, V. Storch. and H. W. Ludwig. 1996. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against mosquitoes with special emphasis on the ecological impact. Second En Gedi Conference on Bacterial control of agricultural insect pests and vectors of human diseases. Shores, Israel.
- Bellini R.1996. Factors influencing the role of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in mosquito control in Italy. Second En Gedi Conference on bacterial control of agricultural insect pests and vectors of human diseases. Shores, Israel.
- Bohm H.A. and D. R. Friend 1988. Microcapsules containing insecticidal pathogen stabilized against UV light comprising acrylate-type encapsulating agent

which retains sunscreen, e.g. malachite green. Lim Technical Laboratories. Patent N.WO8904170.

- Boisvert, M. and J. Boisvert. 1999. Persistence of toxic activity and recycling of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cold water: field experiments using diffusion chambers in a pond. *Biocontrol Science and Technology*. 9:507-522.
- Castro-Franco R. 1994. Desarrollo de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* y extracto de *Agave lechuguilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith). Tesis inédita Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L.
- Connick W. J. 1988. Formulation of living biological control agents with alginate. In: Pesticide formulations: Innovations and developments. Cross B. and Scher H. B. Eds. American Chemical Society. Washington. D. C.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, B. Lambert, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean (1995) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Cry genes. *Microbiol. Rev.* En prensa.
- CRC, 1978. British Patent 1,501 563.:
- Darsie, R. E. G. and R. A. Ward. 1981. Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, North of Mexico. *Mosq. Syst. Suppl* 1:1-313.
- de Barjac, H. 1985. Standardized test for the determination of the susceptibility of mosquito larvae to bacterial toxins. WHO Report VBC/ECV/EC/85.25. Geneva, Switzerland.
- De Barjac, H. 1979. Note sur la préparation d' une formulation de référence, IPS-78, pour le titrage biologique des formulations expérimentales et industrielles du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. Mimeographed document WHO/VBC/79.741:1-6

- De Barjac, H. 1978(a). Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* tres toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. israelensis serotype 14. C.r. hebdomadaire Seanc. Acad. Sci. Paris, serie D
- De Barjac, H. 1978 (b). Etude cytologique de l' action de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves de moustiques. C.r. hebdomadaire Seanc. Acad. Sci. Paris serie D 286: 1629-1632.
- Delecluse, A., M. L. Rosso y A. Ragni (1995) No publicado. En GeneBank (GenomeNet WWW server, 8 de noviembre de 1995)
- Donovan, W. P., C. C. Dankocsik, M. P. Gilbert, M. C. Gawron-Burke, R. G. Groat y B. C. Carlton 1988a. Amino acid sequence and entomocidal activity on the P2 crystal protein: an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. 263:561-567.
- Donovan, W. P., C. Dankocsik and M. P. Gilbert 1988c. Molecular Characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 170:4732-4738.
- Drake, B. B & C.V. Smythe, 1963. U.S. Patent. 3,087 865.
- Dulmage, H. T. 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*. Serotype 3, in 3 fermentation media J. Invertebr Pathol. 18: 353-358.
- Dulmage, H. T. 1981. Production of bacteria for biological control of insects. En: Biological control of crop production, G.C. Papavizas (Ed.) Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun and Co. Totowa, N. J.
- Dulmage, H.T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis*. Perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 84-:113-122.
- Dulmage, H.T., J. A. Correa, and A. J. Martínez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **15**: 15-20

- Dunkle, R. L. and B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.* 17:120-126.
- Eritja, R. and C. Aranda 1995. Efficacy of ground ultra-low volume larvicidal treatments using temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Culex pipiens* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11: 491-494.
- Feitelson, J. S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*, insects and beyond. *Bio/technol.* 10:271-275
- Foo, A., and H. H. Yap. 1982. Comparative bioassays of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations against four species of mosquitoes in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med.* Pub 206-210
- Galán-Wong, L. J. 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hübner) *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidóptera: Noctuidae) Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. Monterrey, N. L. México.
- García R, and B. Desrochers, 1979. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to some California mosquitoes under different conditions. *Mosquito News.* 39: 541-544.
- García, R., B. Desrochers, W. Tozer and J. Mcnamara. 1983. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) var. *israelensis* for mosquito control. *Proceedings and Papers of the fifty first Ann. Conf. of Calif. Mosq. and Vec. Cont. Assoc.* pp 25-29.
- Goldberg, L. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News.* 10,
- Guillet, P., et H. Escaffre,. 1979 Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. I. Resultats des premiers essais raliss sur le terrain. Mimeographed document WHO/VBC/79.730.1-7.

- Guillet, P., H. Escaffre, y J.M. Prud, Hom. 1982. L'utilisation d'une formulation a base de *Bacillus thuringiensis* H-14 dans la lutte contre l' Onchocercose en Afrique de Ouest Efficacit et modalits d' application. Cach. O.R.S. TOM Ser. Ent. Med. et Parasitol.
- Hall, I.M., K. Y. Arakawa, H. T. Dulmage, and J. A. Correa, 1977. The pathogenecity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and to *Culex* mosquitoes. Mosquito News 37: 246-251.
- Hall, I., and K. Arakawa 1980. Development of a standard bioassay method for determining potency of commercial *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* University of California, Mosquito Control Research, Ann Report: 63-65.
- Howard, Ronald A. 1988. Diseño de experimentos de simulación por computadora, en: Simulación de Sistemas: Diseño, Desarrollo e implantación. Robert E. Shannon. Ed. Trillas 1a edición. 165 – 202.
- Ignoffo,C.M., T. L. Couch, C. García, y M. J. Kroha. 1981. Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* and *Heliothis virescens*. J. Econ. Entomol. 74: 218-221
- Insell, J. P. 1983. Studies on the structure and origin of the parasporal inclusion of sporulating Bacilli. Ph.D. Thesis, University of Western Ontario, London, Ontario Canada.
- Jarai, M. 1972. Oxigen transfer in the fermentations of primary and secondary metabolites. Proc .IV IFS: Ferment. Technol. Today.97-103.
- Karow, E.O., W.H. Bartholomew, and M.R. Sfat. 1953. Oxigen transfer and agitation in submerged fermentation. J. Agric. Food Chem. 1: 302-306
- Kawalek, M.D., S. Benjamin, H. L. Lee, and S.S. Gill, 1995 Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2965-2969
- Klowden, M. L., G. A. Held and L. A. Bulla. 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to adults of *Aedes aegypti* mosquitoes. App. Environ Microbiol 46:112-115.

- Knepper, R. G., S. A. Wagner, E. Abel and E. D. Walker. 1994 Fixed-wing, aerial application of liquid *Bacillus thuringiensis* H-14 (Acrobe™) for control of spring *Aedes* mosquitoes in Michigan. J. Am. Mosq. Control Assoc.10:42-44.
- Kumar, A., V. P. Sharma,, D. Thavaselvam, y P.K. Sumodan. Control of *Anopheles stephensi* breeding in construction sites and abandoned overhead tanks with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Am. Mosq. Control Assoc.11: 86-89.
- Lacey, L. A., H. Escaffre, B. Philippon, A. Sketeh and R. Guillet. 1982. Large River treatment with *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the Onchocerciasis Control Programme. Tropen Med Parasit 33: 97-101.
- Lacey, L. A., M. J. Urbina and C.M. Heitzman.1984. Sustained release formulations of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) for control of container breeding *Culex quinquefasciatus*. Mosquito News. 44: 26-32.
- Lecadet M. M., E. Frachon, V. Cosmao Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent, I. Thiery. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 86:660-672.
- Leong, K. L., R. J. Cano and A. M. Kubinsky 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. Environ. Entomol. 9:593-599.
- Levy, R., C.M. Powel, B.C. Hertlein, and T.W. Miller J.R.. 1984. Efficacy of Arosurf MSF (Monomolecular surface film) base formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mixed populations of mosquito larvae and pupae: Bioassay and preliminar evaluations. Mosquito News 44: 537-543.
- Linek, V., P. Bernes, and V. Vacer . 1988. Measurement of the aereation capacity of fermenters. Chem. Eng. Techol.
- Liu, Y. T., M. J Sui, D. D Ji,, I. H. Wu, C. C. Chou,, and C. C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Invertebr Pathol. 62:131- 136.

- López-y López E., N. Chavarría-Hernández, P. Fernández-Sumano and M. de la Torre. 2000. Fermentation processes for bioinsecticide production. An overview. Recent Res. Devel. Biotech & Bioeng. 3:1-20
- Lorence-Quiñones A. y Quintero-Ramírez R. 1996. Mecanismo molecular de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En: Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Galán-Wong, L. J. Rodríguez-Padilla C. y Luna-Olvera H. A.(Eds) Grafo Print Editores, S. A. 63-113.
- Lüthy, P., J. L. Cordier, and H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* a bacterial insecticide Basic considerations and application. En: Microbial and Viral pesticides, E. Kurstak (Ed), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 35.
- Lüthy, P. 1996. the use of Bti in Switzerland: application technology and cost effectiveness. Second En Gedi Conference on Bacterial control of agricultural insect pests and vectors of human diseases. Shores, Israel.
- Majori, G. and A. Ali. 1984. Laboratory and field evaluations of industrial formulations of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against some mosquito species of central Italy. J. Invertebr. Pathol. 43: 316-323.
- Maldonado-Blanco. M. G. 1994. Desarrollo de un medio de cultivo a base de subproductos agroindustriales para la producción de δ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14. Tesis inédita. Fac. de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. Monterrey, N. L. México.
- Maldonado Blanco, M. G., L. J. Galán-Wong, K. Arévalo-Niño, H. Medrano-Roldán, R. Tamez Guerra and C. Rodríguez Padilla. 1998. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 based on agroindustrial byproducts in Northeastern Mexico. Israel J. of Entomol. XXXII, 37-44.
- Margalit J., A. Markus and Z. Pelah 1984. Effect of encapsulation on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotype H-14. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:382-383.
- Megna J.C. 1963.U.S. Patent 3,073,749.

- Molloy D., R. Gaugler and H. Jamnback. 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of blackfly larvae. *J. Econ. Entomol.* 74:61-64.
- Morales-Ramos, 1996. Formulación de Bioinsecticidas. En : Galán-Wong, L. J., Rodríguez-Padilla, C. y Luna-Olvera, H. A. (Eds). Avances recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L. pp 161.
- Morales-Ramos, L. H., M. R. McGuire, and L. J. Galán-Wong. 1998. Utilization of several biopolymers for granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 91:1109-1113.
- Mulla, M. S., B. A. Federici and H. A. Darwaseh. 1982. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against flood water mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1288-1293.
- Murat Elcin Y. 1995. *Bacillus sphaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 587-591.
- Mulla, M. S., B.A. Federici, y H.A. Darwaseh. 1982. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against flood water mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1288-1293.
- Narva K. E., J. Payne and J. S. Feilteson, 1994. Novel *Bacillus thuringiensis* toxins active against coleopteran larvae. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0 October 94).
- Nayar, J. K., J. W. Knight, A. Ali, D. B. Carlson y P. D. O'Bryan. 1999. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15:32-42.
- Neri-Barbosa, J. E., H. Quiroz- Martínez, M. L. Rodríguez-Tovar, L. O. Tejada y M. H. Badii. 1997. Use of Bactimos® Briquets (Bti formulation) combined with the backswimmer *Notonecta irrorata* (Hemiptera: Notonectidae) for control of mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 87-89.

- Obeta, J. A. N. y N. Okafor, 1984. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol.
- Ohba, M. and K. Aizawa. 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. J. Invertebr Pathol. 33:387-388.
- Olivares-Sáenz, Emilio. 1994. Paquete de Diseños Experimentales. FAUANL, versión 2.5 Facultad de Agronomía U. A. N. L., Marín, N. L.
- Orduz, S., R. William, M. M. Correa, A. E. Montoya, and H. de Barjac. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 59: 99-103.
- Padua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1980. The isolates of *Bacillus turingiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 36: 180-186.
- Padua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol.44: 12-17
- Pearson, D. and O. P. Ward. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnol. Lett. 10: 451-456
- Perich, M. J., J.T. Rogers and L.R. Boobar. 1987. Efficacy of Arosurf MSF and formulations of *B. thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles albimanus*. Laboratory bioassay. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3: 485-488.
- Pozsgay, M. P. Fast, H. Kaplan, and P. R. Carey 1987. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: A Raman spectroscopy study. J. Invertebr. Pathol. 50: 620-622.
- Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard and P. R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochem. J. 273: 43-47.

- Reyes-Villanueva F. 1990. El Dengue, Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciencia* **41**: 45- 55.
- Schaefer, C. F. Mulligan, and W. Wilder. 1980. Operational evaluations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin. University of California, Mosquito Control Research, Ann Report 1980:53-54.
- Shapiro, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* **82**:548-550.
- Siegel, J. P., A. R. Smith y R. J. Novak 1995. Cellular fatty acid analysis of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (ONR-60A) J. Am. Mosq. Control Assoc. **11**:176-185.
- Sikdar, D.P., M.K. Majumdar and S.K. Majumdar. 1991. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnol. Lett.* **13**: 511-514
- Sinegre, G., B. Gaven, G. Vigo, 1981. Contribution a la normalisation des preuves de laboratoire concernant des formulations experimentales et commerciales du serotype H-14 du *Bacillus thuringiensis*. II- Influence de la temperature, du chlore residuel du pH et de la profondeur de l'eau sur l'activite biologique d' une poudre primaire. *Cach Orstom. ser Ent. Med. et Parasitol.***19**: 155-159.
- Skovmand, O., D. Hoegh, H. S. Pedersen y T. Rasmussen. 1997. Parameters influencing potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products. *J. Econ. Entomol.* **90**:361-369.
- Skovmand, O., I. Thiery, G. L. Benzon, G. Sinégre, N. Monteny, and N. Becker, 1998. Potency of products based on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: interlaboratory variations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **14**:298-304.
- Smith, R.A. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* **28**: 1089-1092.

- Su, T. and M. S. Mulla 1999. Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquitoes in microcosms. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15:356-365.
- Tamez-Guerra, P. M. R. McGuire, R. W. Behle, B. S. Shasha and L. J. Galán-Wong, 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol 93:219-225.
- Thiery, I. C. Back, P. Barbazan and G. Sinégre 1996. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* dans la demoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. Ann. Inst. Pasteur 7:247-260.
- Thiéry, I. and S. Hamon. 1998. Bacterial control of mosquito larvae: Investigation of stability of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* standard powers. J. Am. Mosq. Control Assoc. 14: 472-476.
- Thiéry, I., F. Fouque, B. Gaven y C. Lagneau, 1999. Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medellin* and *jegathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 371-379.
- Tietze, N. S., P. G. Hester, K. R. Shaffer, S. J. Prescott y E. T. Schreiber 1994. Integrated management of waste tire mosquitoes utilizing *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopidae), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus sphaericus* and methoprene. J. Am. Mosq. Control Assoc.10:363-373
- Tyrell, D. J., L. L. Davidson, L. A. Bulla, and W.A. Ramoska. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol. 38: 656-658.
- United States Applied and Environmental Health. Pest Management Program 1989. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland.
- Vandekar, M. and H. T. Dulmage. 1983. Guidelines for production of *B. thuringiensis* H-14. UNDP/World Bank/ W.H.O. Geneva, Switzerland.

- Van Essen, F.W. and S. C. Hembree.1980. Laboratory bioassay of *Bacillus thuringiensis israelensis* against all instars of *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorynchus* larvae. Mosquito News. 40: 424-431.
- Van Essen, F.W. and S. C. Hembree. 1982. Simulated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, against mosquitoes. Mosquito News. 42: 66-72.
- Walker, E. D.1995. Effect of low temperature on feeding rate of *Aedes stimulans* larvae and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) J. Am. Mosq. Control Assoc.11: 107-110.
- Weiser J. 1991. Testing of activity of isolates. Chapter 13 En: Biological Control of vectors. J. Weiser (Ed). John Wiley & Sons: 89.
- Vicenteño, A. L., G. Calderón, R. Farrera y M. de la Torre. 2001. Recuperación de cepas de *Bacillus thuringiensis* por reislamamiento. Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 10-14 septiembre, Veracruz, Ver.
- WHO. 1979. Data sheet on the biological control agent *B. thuringiensis* serotype 14 De Barjac,1978. Information document produced by the WHO Division of Vector Biology and Control WHO/VBC/79.750 . Ginebra, Suiza: 1-12.
- WHO. 1982. Information document produced by the WHO Division of Vector Biology and Control.The following is the first revision of the data sheet which appeared as WHO/VBC/79.750 and VBC/BCDS/79.01. Ginebra, Suiza: 1-44.
- Yousten, A.A., F.J. Genthner, and E.F. Benfield. 1992. Fate of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* in the aquatic environment. J. Am. Mosq. Control Assoc 8:143-148.
- Yu, Y. M., M. Ohba, and S. S. Gill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. 57:1075-1081.
- Zamola, B., P. Valles, G. Meli, P. Miccoli, and F. Kajfez.1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol. Bioeng. 23:1079-1086.

Zgomba M. 1996. Why is *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* a relevant microbial mosquito control agent in Yugoslavia. Second En Gedi Conference on Bacterial control of agricultural insect pests and vectors of human diseases. Shores, Israel.



CONATIVE

