

Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*

Advances in developing *Bacillus thuringiensis*-based insecticide formulations

Ninfa María Rosas-García¹

Resumen

El desarrollo de las formulaciones insecticidas elaboradas a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis* es una tecnología centenaria que ha recibido un fuerte impacto en décadas recientes. La mezcla de esporas y cristales, que es el principio activo de estas preparaciones, ha sido objeto de estudio constante y en ello se destaca la búsqueda de cepas cada vez más potentes o mejoradas. Así mismo, los materiales utilizados incluyen una amplia variedad de ingredientes completamente biodegradables como pueden ser partes de las plantas que el insecto consume, tales como hojas, tallos o frutos secos y molidos que pueden funcionar como estimulantes de la alimentación, además de melazas o azúcares. Algunas sustancias pegajosas como las gomas, que dan la capacidad de adherencia, o los almidones, que funcionan como agentes encapsulantes, sirven para evitar el arrastre por el viento y el lavado por la lluvia. Los colorantes y abrillantadores ópticos brindan al principio activo protección contra la luz UV, y otros agentes funcionan como potenciadores de la actividad tóxica. Todos ellos son amigables al ambiente y e inocuos para el hombre, otros vertebrados, plantas, e incluso para insectos benéficos, pero simultáneamente son capaces de ser ampliamente aceptados por los insectos plaga, con la intención de que la formulación sea ingerida y, finalmente, sea altamente efectiva. Esto ha traído como consecuencia la fabricación de una amplia variedad de productos comerciales cuya efectividad los ha posicionado en el mercado mundial, pero cuya investigación continúa para brindar formulaciones específicas hacia nuevas plagas o evitar la resistencia en aquellas ya conocidas.

Palabras clave: control biológico, entomopatógeno, actividad tóxica, fagoestimulantes, actividad residual.

Abstract

Developing *Bacillus thuringiensis*-based formulations is an old technology which has been revived during recent decades. The spore-crystal complex (being the main ingredient in these preparations) has been the main objective of this research, involving the search for new or improved strains. The type of materials used included a wide variety of completely biodegradable ingredients which could have been leaves, stems or fruit which when dried and ground could serve as feeding stimulants, as well as molasses and sugars. Sticky material such as gum providing adherence or starches working as encapsulating agents can both avoid dispersion by wind and wash-off by rain. Dyes and optical brighteners initially offer active protection against UV radiation and some other agents work as toxic activity enhancers. All of them

1 Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Tamd.. México. nrosas@idn.mx

are environmentally-friendly materials, completely harmless for human beings, other vertebrates, plants and even for beneficial insects so that the formulation is fully acceptable and ingested, thereby ensuring that it is highly effective. The foregoing has led to the manufacturing of a wide variety of commercial products whose effectiveness has positioned them in international markets; however, ongoing research provides specific solutions against new pests or is aimed at already-known ones avoiding resistance..

Key words: Biological control, entomopathogen, toxic activity, feeding stimulants, residual activity.

Recibido: abril 18 de 2008

Aprobado: abril 28 de 2008

Introducción

Desde su descubrimiento, los insecticidas químicos representaron la principal alternativa para el control de numerosos insectos plaga. Su uso fue incrementándose debido a la eficacia en el control que ejercían sobre dichas plagas sin tomar en cuenta el grave daño que estos productos ocasionaban al medioambiente y a los seres vivos. Desde principios del siglo pasado surgió una nueva forma de combate de plagas con la ventaja de ser eficaz y no causar daños al medioambiente, este fue el control biológico, que se basa en la utilización de enemigos naturales y sus productos para reducir las poblaciones de plagas. Dentro de esta estrategia de control, las aplicaciones de formulaciones bioinsecticidas que se componen de ingredientes naturales son las más utilizadas. Éstas se definen como una combinación correcta de materiales o ingredientes de tal manera que el ingrediente activo, junto con los otros componentes, formen un producto estable, seguro y fácil de aplicar (Sawicka y Couch, 2002).

Bacillus thuringiensis es el organismo más empleado como ingrediente activo en los diseños de estas formulaciones por su alta efectividad en los insectos plaga. Este agente microbiano es muy utilizado en la agricultura para el control de un gran número de plagas, principalmente pertenecientes al orden Lepidóptera, aunque también representa una estrategia de control de larvas de mosquitos.

Los productos de este microorganismo presentan algunas características importantes

que justifican su uso, como la ausencia de toxicidad en los seres humanos, en muchos de los enemigos naturales de diversas plagas, en otros vertebrados y en las plantas, así como un espectro de acción reducido, lo que indica que puede ser altamente específico para una plaga determinada. Por tanto, estos bioinsecticidas pueden ser particularmente dirigidos para combatir a una plaga de interés sin perjudicar ni dañar el medio circundante.

El éxito de estas formulaciones se ha visto reflejado en la gran variedad de productos comerciales que existen, sólo las preparaciones para aspersion comprenden aproximadamente el 2% del mercado global de los insecticidas, y aunque no ha sido fácil su introducción en el mundo de la agricultura, la aplicación de los cultivos con formulaciones tradicionales de *B. thuringiensis* está constituyendo la estrategia de elección de los agricultores orgánicos, ya que gracias a las numerosas pruebas de seguridad y del impacto sobre la salud humana y el ambiente, se utilizan con la mayor certeza de su inocuidad, para una producción agrícola más sana y de mayor calidad.

Análisis crítico

Formulaciones

La bacteria *Bacillus thuringiensis* fue descubierta por Shigetane Ishiwata en 1901 (Aizawa, 2001), y redescubierta por Berliner en 1911. Esta bacteria fue aislada de larvas enfermas de la palomilla de la flor del Mediterráneo *Anagras-*

ta kuehniella por ambos investigadores, de esta manera el estudio de éste y otros aislamientos obtenidos de larvas enfermas condujo al establecimiento de *B. thuringiensis* como insecticida microbiano.

El primer registro que se tiene del uso de *B. thuringiensis* para el control de insectos fue en Hungría a finales de 1920, y en Yugoslavia a principios de 1930 para el control del gusano europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* (Lord, 2005). Durante las dos décadas posteriores se realizaron pruebas de campo contra varios insectos lepidópteros tanto en Europa como en Estados Unidos (Cerón, 2001), y la eficacia y la especificidad que mostraron las toxinas de *B. thuringiensis* en el control de insectos plaga favoreció el desarrollo de formulaciones a base de este patógeno. En 1938, el laboratorio Libec de Francia produjo el Sporeine®, que fue el primer producto comercial disponible para el control del gusano barrenador de la harina (Aronson et ál., 1986). Infortunadamente, este producto se usó por un corto periodo debido a la Segunda Guerra Mundial (Nester et ál., 2002).

A pesar de diversas interrupciones, la investigación en este agente de biocontrol continuó dando lugar al desarrollo y la comercialización de productos. A partir de entonces, más de cien formulaciones se han colocado en el mercado mundial, representando actualmente más del 90% del comercio de los bioinsecticidas. El continente americano es responsable de la producción del 50% de este mercado, principalmente Estados Unidos y Canadá; América Latina, por su parte, tiene una producción aproximada del 8 al 10% del total, y la mayor aplicación de ellos se dirige al control forestal y agrícola de lepidópteros (Galán-Wong et ál., 2006; Zeigler, 1999; Rhodes, 1993) (tabla 1); sin embargo, gracias a la continua investigación, algunos productos de *B. thuringiensis* han sido especialmente diseñados para insectos de otros órdenes.

La alta especificidad de *B. thuringiensis* exige una formulación idónea, en la cual se haga una selección pertinente de los ingredientes a

partir de una extensa variedad de soportes y componentes pues de ello dependerá el éxito del control.

Básicamente estos productos contienen una mezcla de cristales y esporas, y pueden clasificarse como productos de primera generación, cuando incluyen como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de una cepa nativa de *B. thuringiensis*. Éstos constituyen la mayor proporción de los productos comerciales. Se clasifican como de segunda generación cuando están constituidos por una mezcla de esporas y cristales provenientes de una cepa de *B. thuringiensis* a la cual se introdujeron, por conjugación o transformación, los genes que codifican para las δ -endotoxinas presentes en varias cepas nativas, ampliando así su espectro de actividad hacia otros insectos plaga. Y se consideran de tercera generación, cuando la formulación contiene bacterias recombinantes muertas consistentes en *Pseudomonas fluorescens* que han sido transformadas con genes que codifican δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Cerón, 2001).

Los cristales de *B. thuringiensis* han mostrado una alta especificidad hacia los insectos plaga e inocuidad para otros organismos, incluyendo vertebrados en los cuales la toxicidad es prácticamente nula (Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2001; Quintero, 1997), por lo que se ha considerado como uno de los insecticidas más seguros autorizándose su empleo para los más diversos cultivos, incluso sin imposición de plazo de seguridad. Esto ha conducido a la producción de insecticidas sujetos a continuos avances tanto por la inclusión de cepas cada vez más activas o con nuevas especificidades, como por el desarrollo de formulaciones asequibles.

Actividad tóxica de Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis tiene un espectro de acción reducido toda vez que cada cepa o aislado resulta bastante específico para un insecto en cuestión; sin embargo, su espectro resulta bastante amplio cuando se consideran diversas

Tabla 1. Plagas agrícolas y forestales tratadas con formulaciones a base de *B. thuringiensis*.

<i>Acrobasis vaccinil</i>	<i>Heliothis virescens</i>
<i>Anthonomus grandis</i>	<i>Heliothis zea</i>
<i>Agrotis segetum</i>	<i>Hyphantria cunea</i>
<i>Anarsia lineatella</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>Artogeia rapae</i>	<i>Lymantria dispar</i>
<i>Agrotis segetum</i>	<i>Mamestra brassicae</i>
<i>Autographa californica</i>	<i>Malacosoma americanum</i>
<i>Bombix mori</i>	<i>Manduca sexta</i>
<i>Choristoneura fumiferana</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>
<i>Choristoneura rosaceana</i>	<i>Pieris brassicae</i>
<i>Chilo supresalis</i>	<i>Plutella xylostella</i>
<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	<i>Pseudoplusia includens</i>
<i>Colias eurytheme</i>	<i>Popillia japonica</i>
<i>Chrysomela scripta</i>	<i>Rhopobota naevana</i>
<i>Ephestia kuehniella</i>	<i>Scirpophaga incertulas</i>
<i>Epicauta spp.</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>Eranis tiliaria</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>Estigmene acrea</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Thyridopteryx ephemeraeformis</i>
<i>Helicoverpa zea</i>	<i>Trichoplusia ni</i>

especies de *B. thuringiensis* que en su conjunto han demostrado capacidad para matar a una gran variedad de invertebrados. Como en el desarrollo de formulaciones la elección de la cepa es un punto clave, continuamente se buscan nuevas cepas con nuevas actividades tóxicas o se buscan alternativas para incrementar la toxicidad de éstas.

Actualmente, la diversidad de *B. thuringiensis* se refleja en los casi 70 serotipos y en las 96 subespecies reportadas a la fecha, que se presentan en la tabla 2 (NCBI, 2006), de las cuales las más utilizadas para la elaboración de formulaciones

comerciales son *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que es capaz de matar a una amplia variedad de palomillas importantes como plagas agrícolas o forestales; *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, que se utiliza principalmente para el control de larvas de mosquito y mosca negra, y *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* que tiene actividad tóxica contra escarabajos (Galán-Wong et ál., 2006; Nester et ál., 2002; Hernández-Velázquez, 2001).

La mayor parte de la actividad insecticida de *B. thuringiensis* se debe a las proteínas cristalinas, que se producen durante el proceso de esporulación. Estas proteínas o cristales paras-

Tabla 2. Serovariedades de *Bacillus thuringiensis*

<i>aizawai</i>	<i>entomocidus/subtoxicus</i>	<i>konkukian str. 97-27</i>	<i>ostrinae</i>	<i>tenebrionis</i>
<i>aizawai/pacificus</i>	<i>finitimus</i>	<i>kumamotoensis</i>	<i>oswaldocruzi</i>	<i>thompsoni</i>
<i>alesti</i>	<i>fukuokaensis</i>	<i>kumamotoensis</i>	<i>pakistani</i>	<i>thuringiensis</i>
<i>amagiensis</i>	<i>galechiae</i>	<i>kunthalanags3</i>	<i>palmanyolensis</i>	<i>tochigiensis</i>
<i>andalousiensis</i>	<i>galleriae</i>	<i>kunthalaRX24</i>	<i>pingluensis</i>	<i>toguchini</i>
<i>argentiniensis</i>	<i>graciosensis</i>	<i>kunthalaRX27</i>	<i>poloniensis</i>	<i>tohokuensis</i>
<i>asturiensis</i>	<i>guiyangiensis</i>	<i>kunthalaRX28</i>	<i>pondicheriensis</i>	<i>tolworthi</i>
<i>azorensis</i>	<i>higo</i>	<i>kurstaki</i>	<i>pulsiensis</i>	<i>toumanoffi</i>
<i>balearica</i>	<i>huazhongensis</i>	<i>kyushuensis</i>	<i>rongseni</i>	<i>vazensis</i>
<i>berliner</i>	<i>iberica</i>	<i>leesis</i>	<i>roskildiensis</i>	<i>wratislaviensis</i>
<i>brasiliensis</i>	<i>indiana</i>	<i>londrina</i>	<i>san diego</i>	<i>wuhanensis</i>
<i>cameroun</i>	<i>israelensis</i>	<i>malayensis</i>	<i>seoulensis</i>	<i>xiaguangiensis</i>
<i>canadensis</i>	<i>israelensis</i>	<i>medellin</i>	<i>shandongiensis</i>	<i>yosoo</i>
<i>chanpaisis</i>	<i>israelensis/tochigiensis</i>	<i>mexicanensis</i>	<i>silo</i>	<i>yunnanensis</i>
<i>colmeri</i>	<i>japonensis</i>	<i>monterrey</i>	<i>sooncheon</i>	<i>zhaodongensis</i>
<i>coreanensis</i>	<i>jegathesan</i>	<i>morrisoni</i>	<i>sotto</i>	<i>Al Hakam</i>
<i>dakota</i>	<i>jinhongiensis</i>	<i>navarrensensis</i>	<i>sotto/dendrolimus</i>	
<i>darmstadiensis</i>	<i>kenyae</i>	<i>neoleonensis</i>	<i>subtoxicus</i>	
<i>dendrolimus</i>	<i>kim</i>	<i>nigeriensis</i>	<i>sumiyoshiensis</i>	
<i>entomocidus</i>	<i>konkukian</i>	<i>novosibirsk</i>	<i>sylvestriensis</i>	

porales están formados por una o más proteínas que son codificadas por los denominados genes *cry*, los cuales son muy diversos. En la tabla 3 se muestra la clasificación de las proteínas Cry. A la fecha hay más de 30 tipos de proteínas Cry descritas, y se han clonado y secuenciado alrededor de 166 genes (Galán-Wong et ál., 2006).

En la búsqueda de cepas más potentes o mejoradas que puedan ser utilizadas en formulaciones de alto impacto Lee et ál. (2001) encontraron una cepa de *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* con actividad dual contra *S. exigua* y *Culex pipiens* cuya toxicidad era debida a su contenido de genes *cry1C* y *cry1D*. Por otra parte, es importante mencionar el hallazgo referente a una cepa mutante de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* resistente a UV que produce melanina, ya que ésta demostró una mayor actividad larvi-

cida contra *Helicoverpa armigera* que su cepa parental, el uso de esta mutante puede contribuir al desarrollo de formulaciones estables para la aplicación en campo, ya que la melanina es un producto natural, fácilmente biodegradable y que no causa ninguna amenaza al ambiente (Saxena et ál., 2002). Otra contribución interesante es la de Manasherob et ál. (2002), en la cual los genes de la δ -endotoxina de una cepa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* son expresados en la cianobacteria filamentosa fijadora de nitrógeno *Anabaena*, ésta sirve como una fuente de alimento a las larvas de los mosquitos y resuelve las limitaciones impuestas por el ambiente en cuanto a la actividad tóxica de esta cepa, ya que protege a la toxina del daño causado por la luz UV. En este tipo de construcciones también se han incluido otros genes de interés como los de las quitinasas ya que la

construcción de plásmidos recombinantes que contienen genes codificantes de quitinasas de *B. circulans*, introducidos en cepas de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* incrementó la toxicidad frente a larvas de *L. dispar* de manera sustancial, en comparación con la cepa parental (Lertcanawanichakul et ál., 2004); en otro estudio un gen de quitinasa de *Nicotiana tabacum*, y el gen *cry1Ac* de *B. thuringiensis* fueron clonados y fusionados. Dicha construcción fue introducida en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* cuya actividad insecticida contra *H. armigera* fue 18 veces más alta que las cepas parentales (Ding et ál., 2008).

También los virus han brindado alguna utilidad en el incremento de la acción tóxica de *B. thuringiensis* porque la proteína viral del granulovirus de *T. ni*, denominada enhancina, que destruye la integridad estructural de la membrana peritrófica de las larvas de lepidópteros, fue añadida a algunas formulaciones comerciales de *B. thuringiensis*, en las cuales incrementó hasta 6 veces la toxicidad contra varias especies de nóctuidos, e incluso aumentó la eficacia de *B. thuringiensis* hacia lepidópteros que normalmente son menos susceptibles como *H. zea* y *S. exigua* (Granados et ál., 2001).

Soportes o matrices acarreadoras

Debido a que el principio activo debe ser acarreado por un soporte o una matriz inerte, muchos compuestos se han probado y utilizado para este fin. Uno de los polímeros que se ha utilizado con más éxito para el desarrollo de las formulaciones es el almidón de maíz (Rosas-García y De Luna-Santillana, 2006; Tamez-Guerra et ál., 1996; McGuire et ál., 1996; Gillespie et ál., 1994; McGuire y Shasha, 1992; McGuire et ál., 1990; McGuire y Shasha, 1990; Bartelt et ál., 1990; Dunkle y Shasha, 1988), ya que éste presenta versatilidad debido a las ventajas de protección y adherencia que proporciona al principio activo; el almidón de tapioca también se utilizó en una formulación de *B. thuringiensis* que fue desarrollada contra larvas de *S. exigua* mostrando buenos resul-

tados (Teera-Arunsiri et ál., 2003). Otros soportes utilizados, como las partículas de maíz quebrado, la arcilla o el salvado de trigo no han arrojado resultados tan exitosos, debido a que éstos no se adhieren a las superficie de las hojas, y su uso está restringido a ciertas partes de las plantas, como por ejemplo en el cogollo del maíz o en la superficie del suelo para el control de plagas de esta área (Gillespie et ál., 1994) lo que reduce sensiblemente su uso. Otro producto que ha sido utilizado como soporte de formulación es la harina de maíz (McGuire et ál., 1996; Ridgway et ál., 1996; Tamez-Guerra et ál., 1996), pero cuando sufre un proceso de nixtamalización ha demostrado una alta efectividad reteniendo la actividad tóxica de *B. thuringiensis* hasta por dos años, lo que implica una posible comercialización del producto (Tamez-Guerra et ál., 1998). Este producto ha sido utilizado en el desarrollo de formulaciones contra lepidópteros, pero más recientemente se utilizó con éxito en una formulación dirigida contra *Aedes aegypti* (Ramírez-Suero et ál., 2005), este trabajo resulta interesante, ya que como su medio de reproducción es un ambiente acuático, las formulaciones utilizadas normalmente son diferentes a las de los lepidópteros. En este sentido, una formulación bastante llamativa fue la propuesta por Becker en el 2003, para el control de larvas de *Aedes vexans*, en la que la liberación de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* se realiza por medio de gránulos de hielo, preparados en una máquina de hielo especial; esta formulación tiene la ventaja de que los gránulos se derriten en la superficie del agua donde liberan los cristales, el agente de control permanece en los pellets durante la aplicación, y ésta resulta muy económica.

Otros compuestos poliméricos como la quitina y el alginato también se han utilizado como soportes, en particular en formulaciones contra *T. ni*, y aunque han dado buenos resultados para este fin, no han sido del todo aceptados por las larvas de este insecto (Morales-Ramos et ál., 1998), lo que reduce la ingestión y, consecuentemente, la capacidad tóxica del bioinsecticida.

Tabla 3. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

Cry1Aa1	Cry1Ac15	Cry1Ea6	Cry2Aa7	Cry4Aa1	Cry9Ea1	Cry31Aa4	Cry42Aa1
Cry1Aa2	Cry1Ac16	Cry1Ea7	Cry2Aa8	Cry4Aa2	Cry9Ea2	Cry31Aa5	Bt A1462
Cry1Aa3	Cry1Ac17	Cry1Ea8	Cry2Aa9	Cry4Aa3	Cry9Ea3	Cry31Ab1	Cry43Aa1
Cry1Aa4	Cry1Ac18	Cry1Eb1	Cry2Aa10	Cry4A~	Cry9Eb1	Cry31Ab2	Cyt1Aa2
Cry1Aa5	Cry1Ac19	Cry1Fa1	Cry2Aa11	Cry4Ba1	Cry9Ec1	Cry31Ac1	Cyt1Aa3
Cry1Aa6	Cry1Ac20	Cry1Fa2	Cry2Aa12	Cry4Ba2	Cry9Ed1	Cry32Aa1	Cyt1Aa4
Cry1Aa7	Cry1Ac21	Cry1Fb1	Cry2Ab1	Cry4Ba3	Cry9 ~	Cry32Ba1	Cyt1Aa5
Cry1Aa8	Cry1Ad1	Cry1Fb2	Cry2Ab2	Cry4Ba4	Cry10Aa1	Cry32Ca1	Cyt1Aa6
Cry1Aa9	Cry1Ad2	Cry1Fb3	Cry2Ab3	Cry4Ba5	Cry10Aa2	Cry32Da1	Cyt1Aa~
Cry1Aa10	Cry1Ae1	Cry1Fb4	Cry2Ab4	Cry4Ba~	Cry10Aa3	Cry33Aa1	Cyt1Ab1
Cry1Aa11	Cry1Af1	Cry1Fb5	Cry2Ab5	Cry5Aa1	Cry10A~	Cry34Aa1	Cyt1Ba1
Cry1Aa12	Cry1Ag1	Cry1Ga1	Cry2Ab6	Cry5Ab1	Cry11Aa1	Cry34Aa2	Cyt1Ca1
Cry1Aa13	Cry1Ah1	Cry1Ga2	Cry2Ab7	Cry5Ac1	Cry11Aa2	Cry34Aa3	Cyt2Aa1
Cry1Aa14	Cry1Ah2	Cry1Gb1	Cry2Ab8	Cry5Ad1	Cry11Aa3	Cry34Aa4	Cyt2Aa2
Cry1Aa15	Cry1Ai1	Cry1Gb2	Cry2Ab9	Cry5Ba1	Cry11Aa~	Cry34Ab1	Cyt2Ba1
Cry1Ab1	Cry1A~	Cry1Gc	Cry2Ab10	Cry5Ba2	Cry11Ba1	Cry34Ac1	Cyt2Ba2
Cry1Ab2	Cry1Ba1	Cry1Ha1	Cry2Ab11	Cry6Aa1	Cry11Bb1	Cry34Ac2	Cyt2Ba3
Cry1Ab3	Cry1Ba2	Cry1Hb1	Cry2Ab12	Cry6Aa2	Cry12Aa1	Cry34Ac3	Cyt2Ba4
Cry1Ab4	Cry1Ba3	Cry1H~	Cry2Ac1	Cry6Aa3	Cry13Aa1	Cry34Ba1	Cyt2Ba5
Cry1Ab5	Cry1Ba4	Cry1Ia1	Cry2Ac2	Cry6Ba1	Cry14Aa1	Cry34Ba2	Cyt2Ba6
Cry1Ab6	Cry1Ba5	Cry1Ia2	Cry2Ac3	Cry7Aa1	Cry15Aa1	Cry34Ba3	Cyt2Ba7
Cry1Ab7	Cry1Ba6	Cry1Ia3	Cry2Ac4	Cry7Ab1	Cry16Aa1	Cry35Aa1	Cyt2Ba8
Cry1Ab8	Cry1Bb1	Cry1Ia4	Cry2Ac5	Cry7Ab2	Cry17Aa1	Cry35Aa2	Cyt2Ba9
Cry1Ab9	Cry1Bc1	Cry1Ia5	Cry2Ac6	Cry7Ab3	Cry18Aa1	Cry35Aa3	Cyt2Ba~
Cry1Ab10	Cry1Bd1	Cry1Ia6	Cry2Ac7	Cry7Ba1	Cry18Ba1	Cry35Aa4	Cyt2Bb1
Cry1Ab11	Cry1Bd2	Cry1Ia7	Cry2Ac8	Cry7Ca1	Cry18Ca1	Cry35Ab1	Cyt2Bc1
Cry1Ab12	Cry1Be1	Cry1Ia8	Cry2Ac9	Cry8Aa1	Cry19Aa1	Cry35Ab2	Cyt2B~
Cry1Ab13	Cry1Be2	Cry1Ia9	Cry2Ac10	Cry8Ab1	Cry19Ba1	Cry35Ab3	Cyt2Ca1
Cry1Ab14	Cry1Bf1	Cry1Ia10	Cry2Ac11	Cry8Ba1	Cry20Aa1	Cry35Ac1	
Cry1Ab15	Cry1Bf2	Cry1Ia11	Cry2Ac12	Cry8Bb1	Cry21Aa1	Cry35Ba1	
Cry1Ab16	Cry1Bg1	Cry1Ia12	Cry2Ad1	Cry8Bc1	Cry21Aa2	Cry35Ba2	

Cry1Ab17	Cry1Ca1	Cry1Ia13	Cry2Ad2	Cry8Ca1	Cry21Ba1	Cry35Ba3	
Cry1Ab18	Cry1Ca2	Cry1Ib1	Cry2Ad3	Cry8Ca2	Cry22Aa1	Cry36Aa1	
Cry1Ab19	Cry1Ca3	Cry1Ib2	Cry2Ad4	Cry8Da1	Cry22Aa2	Cry37Aa1	
Cry1Ab20	Cry1Ca4	Cry1Ic1	Cry2Ad5	Cry8Da2	Cry22Ab1	Cry38Aa1	
Cry1Ab21	Cry1Ca5	Cry1Ic2	Cry2Ae1	Cry8Da3	Cry22Ab2	Cry39Aa1	
Cry1Ab22	Cry1Ca6	Cry1Id1	Cry2Af1	Cry8Db1	Cry22Ba1	Cry40Aa1	
Cry1Ab~	Cry1Ca7	Cry1Ie1	Cry3Aa1	Cry8Ea1	Cry23Aa1	Cry40Ba1	
Cry1Ab~	Cry1Ca8	Cry1If1	Cry3Aa2	Cry8Ea2	Cry24Aa1	Cry40Ca1	
Cry1Ab~	Cry1Ca9	Cry1I~	Cry3Aa3	Cry8Fa1	Cry24Ba1	Cry41Aa1	
Cry1Ab~	Cry1Ca10	Cry1I~	Cry3Aa4	Cry8Ga1	Cry24Ca1	Cry41Ab1	
Cry1Ac1	Cry1Ca11	Cry1Ja1	Cry3Aa5	Cry8Ga2	Cry25Aa1	Cry42Aa1	
Cry1Ac2	Cry1Cb1	Cry1Jb1	Cry3Aa6	Cry8Ha1	Cry26Aa1	Bt A1462	
Cry1Ac3	Cry1Cb2	Cry1Jc1	Cry3Aa7	Cry8Ia1	Cry27Aa1	Cry43Aa1	
Cry1Ac4	Cry1Cb~	Cry1Jc2	Cry3Aa8	Cry8 ~	Cry28Aa1	Cry35Ba2	
Cry1Ac5	Cry1Da1	Cry1Jd1	Cry3Aa9	Cry9Aa1	Cry28Aa2	Cry35Ba3	
Cry1Ac6	Cry1Da2	Cry1Ka1	Cry3Aa10	Cry9Aa2	Cry29Aa1	Cry36Aa1	
Cry1Ac7	Cry1Db1	Cry1La1	Cry3Aa11	Cry9Aa~	Cry30Aa1	Cry37Aa1	
Cry1Ac8	Cry1Db2	Cry1~	Cry3Aa12	Cry9Ba1	Cry30Ba1	Cry38Aa1	
Cry1Ac9	Cry1Dc1	Cry2Aa1	Cry3Ba1	Cry9Bb1	Cry30Ca1	Cry39Aa1	
Cry1Ac10	Cry1Ea1	Cry2Aa2	Cry3Ba2	Cry9Ca1	Cry30Da1	Cry40Aa1	
Cry1Ac11	Cry1Ea2	Cry2Aa3	Cry3Bb1	Cry9Ca2	Cry30Ea1	Cry40Ba1	
Cry1Ac12	Cry1Ea3	Cry2Aa4	Cry3Bb2	Cry9Da1	Cry31Aa1	Cry40Ca1	
Cry1Ac13	Cry1Ea4	Cry2Aa5	Cry3Bb3	Cry9Da2	Cry31Aa2	Cry41Aa1	
Cry1Ac14	Cry1Ea5	Cry2Aa6	Cry3Ca1	Cry9Db1	Cry31Aa3	Cry41Ab1	

Tomado de: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html

Fagoestimulantes

No obstante el uso de soportes adecuados, las formulaciones han tenido que ser mejoradas debido a que el comportamiento de los insectos es un fenómeno complejo. Muchos insectos lepidópteros dejan de alimentarse después de la primera ingestión de *B. thuringiensis*, evitando así consumir una dosis letal de este

patógeno (Gillespie et ál., 1994; Yendol et ál., 1975; Heimpel, 1967). De acuerdo con Harris et ál. (1997), esta conducta hace que el insecto ingiera dosis subletales del patógeno obteniéndose bajos porcentajes de mortalidad. Posiblemente esto es causado porque las δ -endotoxinas no estimulan los receptores que se encuentran en el aparato bucal de la larva y, por tanto, sólo son detectadas después de que el alimento ha

entrado en el tracto digestivo (Avé, 1995). Por este motivo, el desarrollo de una formulación adecuada de *B. thuringiensis* se convierte en un fin primordial teniendo como objetivo básico poner las δ -endotoxinas en contacto con las células epiteliales del intestino medio de los insectos, ya que éstas actúan exclusivamente por ingestión.

Se han hecho muchos esfuerzos para aumentar la efectividad en campo de los insecticidas microbianos, y estos avances tienden a enfatizar el uso de ingredientes específicos o métodos para alcanzar este efecto particular deseado. Las sustancias que estimulan el gusto o fagoestimulantes, son precisamente el tipo de sustancias utilizadas (Ignoffo et ál., 1976) para este fin.

Desde hace varias décadas se ha demostrado la utilidad de los fagoestimulantes en las formulaciones, debido a que la palatabilidad es un factor muy importante cuando el entomopatógeno tiene que ser ingerido para ser efectivo (Guillespie et ál., 1994). Anteriormente, algunos extractos obtenidos de la planta de algodón mostraron potencial como fagoestimulantes en *A. grandis* (Maxwell et ál., 1963; Keller et ál., 1962). Guerra y Shaver (1968) demostraron que el extracto acuoso de los granos de maíz estimulaba más eficientemente la alimentación en las larvas de *H. virescens*, que los extractos acuosos de algodón, los pétalos de sus flores o bien los pelos de maíz. El extracto de maíz dulce demostró su efectividad fagoestimulante cuando se añadió a un insecticida químico (McMillian et ál., 1968). Sin embargo, no sólo los extractos de plantas demostraron esta capacidad, en los años siguientes otros componentes fueron estudiados con esta finalidad, así, en las larvas de *L. dispar* se observó una preferencia por el follaje de las plantas cuando éste era tratado con melaza (Yendol et ál., 1975); una mezcla de harina y aceite de semilla de algodón, azúcar y Tween 80 constituyó un fagoestimulante con resultados muy exitosos (Bell y Romine, 1980), que a la fecha está comercialmente disponible con el nombre de Coax®; sin embargo no es útil para todos los insectos ya que en el caso de *Diatraea saccharalis*, fue el menos aceptado de tres fagoestimulantes evaluados, en este caso la

caña de azúcar en polvo fue el mejor fagoestimulante seguido de la sacarosa (Rosas-García et ál., 2004; Rosas-García et ál., 2003).

Otros estudios se han encaminado al establecimiento de metodologías con el fin de seleccionar fagoestimulantes adecuados (Bartelt et ál., 1990; Guerra y Shaver, 1968). En un estudio realizado por Gillespie et ál. (1994) se demostró claramente que las larvas de *O. nubilalis* aceptaban ampliamente las hojas de algodón y el Coax®, en este mismo estudio se observó que estas larvas mostraban una palatabilidad intermedia hacia la melaza y rechazaban totalmente aquellas formulaciones que contenían CaCl₂. Este tipo de estudios permite seleccionar el fagoestimulante más adecuado para preparar una formulación que sea ampliamente aceptada e ingerida por el insecto.

Existe una gran variedad de compuestos que se han utilizado como fagoestimulantes tales como: aceite vegetal (Tamez-Guerra et ál., 1999), aceite de maíz (Bartelt et ál., 1990) o azúcar pulverizado, follaje de maíz deshidratado, germen de trigo, caseína, mezclas de sales, suplementos vitamínicos, hexano y etanol (Bartelt et ál., 1999). Además del Coax® existen algunos otros de tipo comercial como Pheat®, Gusto®, Entice® y Mo-Bait®, que han sido comparados en el comportamiento alimenticio que causan a varias especies de lepidópteros, provocando una elevada respuesta aquellos que contienen altos porcentajes de proteína en lugar de aquellos que contienen mayores cantidades de azúcares (Farrar y Ridgway, 1994), pero esta respuesta puede variar de un insecto a otro.

Recientemente se determinó que el glutamato monosódico, que es un potenciador de sabor utilizado en la industria alimenticia, causa efectos fagoestimulantes en *C. rosaceana* que es una plaga importante de las manzanas. El glutamato monosódico incrementó el potencial tóxico de formulaciones comerciales; aunque requiere un estudio extenso para ser aplicado en campo, es un producto que resulta muy económico y que puede añadirse a diversas formulaciones (Pszczolkowski et ál., 2004).

Protectores de luz solar

Existen además otros factores que influyen en la efectividad de un bioinsecticida; la radiación ultravioleta es indudablemente uno de los factores más importantes que afectan la estabilidad de *B. thuringiensis*. La vida media de esta especie expuesta a la luz solar es menor a 3 días (Ignoffo y García, 1978).

Algunos estudios al respecto realizados hace algunas décadas, sugirieron que la presencia del peróxido de hidrógeno, resultante de la fotooxidación de uno o más aminoácidos causada por la radiación del ultravioleta cercano, reducía la viabilidad y la patogenicidad de este agente biológico (Ignoffo y García, 1978; Ignoffo et ál., 1977), siendo el intervalo de la longitud de onda entre 290-400 nm el factor más destructivo (Haddad et ál., 2005; Ignoffo et ál., 1997). Pero además de este factor, la temperatura de la hoja y la deficiencia en la presión de vapor afectan la viabilidad y patogenicidad de la espora, incluso la luz reflejada en el envés de las hojas es suficiente para causar su mortalidad (Leong et ál., 1980).

Estos hechos han conducido al uso de diferentes químicos orgánicos e inorgánicos que protejan contra la luz solar. En este sentido se han probado colorantes, aceites, celulosa, carbón vegetal, polvo y óxido de aluminio (Ignoffo y Batzer, 1971), dióxido de titanio y el negro carbón (Bull et ál., 1976). Un colorante que ha dado magníficos resultados es el rojo congo ya que tiene una absorbancia excelente en un rango de 280-400 nm (Shapiro, 1989), este colorante demostró su efectividad en formulaciones granulares hechas a base de gelatina, pectina o almidón (Morales-Ramos et ál., 2000). Otros aditivos como los abrillantadores ópticos también se han utilizado como protectores contra la radiación ultravioleta.

Actividad residual

La persistencia de *B. thuringiensis* en campo depende del tipo de formulación y de cómo ésta puede resolver los problemas ocasionados

por las condiciones medioambientales, ya que su empleo se ha visto limitado por la rápida disminución de su eficacia en aplicaciones, principalmente foliares, a causa de la inactivación por los rayos UV y otros factores como la lluvia, el viento y la degradación microbiana (Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2001).

Algunas formulaciones comerciales, no obstante su alta potencia, tienen una actividad residual menor a dos días, lo que indica que una alta concentración de ingredientes activos no es suficiente para permanecer en el ambiente (Van Frankenhuyzen y Nystrom, 1989). Benoit et ál. (1990) propusieron que al eliminar los plásmidos crípticos que provocan en la célula sensibilidad a los rayos UV, y mover los genes de las protoxinas al cromosoma, se podría aumentar la supervivencia de las células y esporas sin perder su capacidad para producir la toxina, sin embargo, esta alternativa puede resultar complicada o poco factible.

La mayoría de los estudios están enfocados al aumento de la residualidad como consecuencia del mejoramiento de la formulación. Según estudios realizados por Behle et ál. (1996), las formulaciones para aspersion con caseína que fueron aplicadas en hojas de algodón, resistieron el lavado de la lluvia simulada, y retuvieron más del 60% de la actividad insecticida original, comparado con menos del 20% de la actividad original en preparaciones de *B. thuringiensis* no formuladas o formuladas comercialmente. Se ha visto que las formulaciones de *B. thuringiensis* encapsuladas en almidón tienen una actividad residual mayor, aún en temporada de lluvias, esto puede ser muy útil cuando se trata de formulaciones que vayan a ser aplicadas directamente a campo (McGuire et al., 1994). El almidón de maíz mantuvo una persistencia del 83% en una formulación de una cepa nativa de *B. thuringiensis*, y causó mayor mortalidad en larvas de *H. armigera* comparada con el 47% de la persistencia del formulado comercial (Singh et ál., 2007). La harina de maíz pregelatinizada con lignina se ha usado también para mejorar la actividad residual y evitar el lavado por la lluvia, mostrando incluso una actividad residual

mayor que el Dipel 2X® (Tamez-Guerra et ál., 2000 a y b). Los complejos de toxina-arcilla en los cuales las toxinas de *B. thuringiensis* son fuertemente adsorbidas en partículas minerales de arcilla llamadas montmorillonita y caolinita han prolongado la residualidad hasta 45 días, esta estrategia reduce su susceptibilidad a la biodegradación y permite un control prolongado frente a dípteros en ambientes acuáticos (Lee et ál., 2003).

El ácido tánico ha sido aplicado como un aditivo barato que incrementa la eficacia de las concentraciones subletales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, este ácido simula los constituyentes activos contenidos en el extracto acuoso rico en taninos de la corteza de *Taxus baccata*, que retarda el desarrollo de las larvas de *H. virescens* (Gibson et ál., 1995); sin embargo, hay discrepancia entre autores, Lord y Undeen (1990) afirmaron que los taninos tienen la habilidad de unirse a proteínas como las δ -endotoxinas y las enzimas, lo que causa pérdida de la eficacia. La presencia de taninos en ciertos ambientes disminuye la toxicidad de *B. thuringiensis* haciendo que se requieran aplicaciones más potentes.

La persistencia en campo no sólo depende del tipo de ingredientes utilizados, sino también de la tecnología de formulación, la cual puede aumentar la actividad de los productos, por ejemplo, las formulaciones granulares dispersables en agua a base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* son prometedoras para el control de vectores ya que han dado mejor resultados que las formulaciones en polvo (Fillinger et ál., 2003). Las formulaciones en polvo, por otra parte, son altamente efectivas en el control de barrenadores de la caña de azúcar, siendo ineficaces las de forma granular, aunque su composición sea idéntica, esto es debido a que los gránulos no se adhieren a las hojas, que es la parte de la planta donde las larvas se alimentan, antes de barrenar los tallos (Rosas-García, 2006; Morales-Ramos et ál., 2005).

Una formulación para aspersión elaborada a base de almidón de maíz pregelatinizado y azúcar pulverizada dio buenos resultados de

protección para *B. thuringiensis* (McGuire et ál., 1996). La mezcla de harina de maíz nixtamalizada, aceite vegetal, azúcar pulverizada, 2-propanol, verde de malaquita y formaldehído, secada por aspersión, demostró en bioensayos con plantas de algodón brindar una mejor protección para *B. thuringiensis* contra la radiación solar comparada con las mismas mezclas que no fueron secadas por aspersión (Tamez-Guerra et ál., 1999). En algunas suspensiones para aspersión, la cafeína al 0,1% es un útil adyuvante para la protección de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, ya que incrementa la toxicidad del organismo hacia las larvas de *Mamestra configurata*, en plantas de canola de un modo seguro y a un bajo costo (Morris et ál., 1994).

Por otro lado, la técnica de encapsulación en matrices de arcilla-alginato ha sido empleada para la liberación de agentes de control biológico dando buenos resultados (Fravel et ál., 1985).

Una tecnología novedosa que permite liberar las toxinas de *B. thuringiensis* de una forma amigable al ambiente es el uso de gránulos de polihidroxialcanoato (PHA), dentro de los cuales se ha inmovilizado un derivado de la toxina Cry1Ab, esto representa una nueva herramienta para el control de plagas, esta nueva formulación de proteínas insecticidas en un soporte biodegradable tiene ventajas ya que pueden modificarse algunos parámetros específicos de la formulación plástica como por ejemplo el tamaño del gránulo, o incrementar el contenido de toxina por gránulo (Moldes et ál., 2006).

Estas técnicas, junto con los componentes empleados, traen como consecuencia nuevas características que influyen grandemente en la estabilidad del producto, lo que trae consigo el aumento de la persistencia en campo y un incremento en la mortalidad de los insectos (Polanczyk, 2004). Lo anterior genera un producto de alta competencia con los de origen sintético (Leme-Ferreira et ál., 2003), que por su naturaleza biológica minimiza los riesgos de contaminación ambiental (Polanczyk, 2004).

El manejo adecuado de la biotecnología ayudará a diseñar estrategias para resolver la posible emergencia de la resistencia en poblaciones de insectos blanco, y en el manejo de la eficacia de larga residualidad de los bioplaguicidas basados en *B. thuringiensis* (Candas et ál., 2003).

Conclusiones

Las formulaciones de *B. thuringiensis* han tenido un desarrollo sustancial desde sus inicios; sin embargo, es bastante notorio que el auge de estas investigaciones fue en las décadas de 1980 y 1990 de acuerdo con la gran cantidad de estudios reportados en este periodo de tiempo, y su impacto ha dado como resultado una gran variedad de productos comerciales, que en buena medida se han visto desplazados por la generación de las plantas transgénicas. De ahí posiblemente surge la explicación de que en años más recientes, la investigación en esta área biotecnológica haya disminuido. No obstante que los cultivos transgénicos han ganado terreno, la tecnología de formulación continúa vigente y ha tenido un repunte con el manejo de los cultivos orgánicos y la cultura ambiental.

La tecnología de formulación ha hecho uso de las nuevas herramientas de la biotecnología, ya que son diversos los obstáculos que se presentan cuando es necesario poner en contacto la δ -endotoxina con las células epiteliales del intestino medio del insecto. Conocer los hábitos alimenticios del insecto y su conducta, el cultivo afectado y la cepa que se va a utilizar sustentan la complejidad de una formulación, pero la creatividad del investigador va más allá de lo convencional al ofrecer estrategias de solución a problemas agrícolas, forestales y de salud humana. La combinación de tecnologías de producción novedosas, el uso de materiales comunes e insospechados, y el uso de una bacteria noble, han producido uno de los mejores recursos de que ha dispuesto el hombre para el control de los insectos plaga, en armonía con la preservación del medioambiente.

Referencias bibliográficas

- Aizawa, K. (2001) Shigetane Ishiwata: His discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan. Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis*. Kurume, Japan. pp. 1-14.
- Aronson, A.; Beckman, W.; Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- Avé, D. A. 1995. Stimulation of feeding: insect control agents. Regulatory mechanisms of insect feeding. New York. p. 389.
- Bartelt, R. J.; McGuire, M. R.; Black, D. A. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* 19: 182-189.
- Becker, N. 2003. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae- a new application technique. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 19: 63-66.
- Bell, M. R.; Romine, C. L. 1980. Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. *J. Econ. Entomol.* 73: 427-430.
- Behle, R. W.; McGuire, M. R.; Shasha, B. S. 1996. Extending the residual toxicity of *Bacillus thuringiensis* with casein-based formulations. *J. Econ. Entomol.* 89: 1399-1405.
- Benoit, T. G.; Wilson, G. R.; Bull, D. L.; Aronson, A. I. 1990. Plasmid-associated sensitivity of *Bacillus thuringiensis* to UV light. *App. Environ. Microbiol.* 56: 2282-2286.
- Bull, D. L.; Ridgway, R. L.; House, V. S.; Pryor, N. W. 1976. Improved formulations of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 69: 731-736.
- Candas, M.; Loseva, O.; Oppert, B.; Kosaraju, P.; Bulla, Jr., L. A. 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Molecular and Cellular Proteomics* 2.1. Disponible en: <http://www.mcponline.org>. p. 19-29.
- Cerón, J. A. 2001. Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis* (pp. 153-168). En: Caballero, P. y Ferré, J. (eds.). *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas*. España: M. V. Phytoma-S. L.
- Ding, X.; Luo, Z.; Xia, O.; Gao, B.; Sun, Y.; Zhang, Y. 2008. Improving the insecticidal activity by an expression of

- a recombinant *cry1Ac* gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 56: 442-446.
- Dunkle, R. L.; Shasha, B. S. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.* 17: 120-126.
- Farrar, R. R.; Ridgway, R. L. 1994. Comparative studies of the effects of nutrient-based phagostimulants on six lepidopterous insect pests. *J. Econ. Entomol.* 87: 44-52.
- Fravel, D. R.; Marois, J. J.; Lumsden, R. D.; Connick, Jr. W. J. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate clay-matrix. *Phytopathology* 75: 774-777.
- Fillinger, U.; Knols, B. G. J.; Becker, N. 2003. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine and International Health* 8: 37-47.
- Galán-Wong, J. L.; Perey-Alfárez, B.; Luna-Olvera, H. A. 2006. Bacterias Entomopatógenas. En: García-Gutiérrez, C.; Medrano-Roldán. biotecnología financiera aplicada a bioplaguicidas. México. p. 43-63.
- Granados, R. R.; Fu, Y.; Corsaro, B.; Hughes, P. R. 2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancing from *Trichoplusia ni* granulovirus. *Biological Control* 20: 153-159.
- Gibson, D. M.; Gallo, L. G.; Krasnoff, S. B.; Ketchum, R. E. B. 1995. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. *J. Econ. Entomol.* 8: 270-277.
- Gillespie, R. L.; McGuire, M. R.; Shasha, B. S. 1994. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 452-457.
- Guerra, A.A.; Shaver, T.N. 1968. A bioassay technique for screening feeding stimulants for larvae of tobacco budworm. *J. Econ Entomol.* 61: 1398-1399.
- Haddad, M. L.; Polanczyk, R. A.; Alves, S. B.; Garcia, M. O. 2005. Field persistence of *Bacillus thuringiensis* on maize leaves (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 309-314.
- Harris, M. O.; Mafle'O, F.; Dhana, S. 1997. Behavioral responses of lightbrown apple moth neonate larvae on diets containing *Bacillus thuringiensis* formulations or endotoxins. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 84: 207-219.
- Heimpel, A. M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology* 12: 287-322.
- Hernández-Velázquez. 2001. Agentes de Control Microbial de Plagas Agrícolas. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. DGSV-SAGAR. p. 58-61.
- Ignoffo, C. M.; Hostetter, D. L.; Sikorowski, P. P.; Sutter, G.; Brooks, W. M. 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. *Environ. Entomol.* 6: 411-415.
- Ignoffo, C. M.; Hostetter, D. L.; Smith, D. B. 1976. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: Three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. *J. Econ. Entomol.* 69: 207-210.
- Ignoffo, C. M.; García, C. 1978. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. *Environ. Entomol.* 7: 270-272.
- Ignoffo, C. M.; Batzer O. F. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *J. Econ. Entomol.* 64: 850-853.
- Keller, J. C.; Maxwell, F. G.; Jenkins, J. N. 1962. Cotton extracts as arrestants and feeding stimulants for the boll weevil. *J. Econ. Entomol.* 55: 800-801.
- Lee, I. H.; Je, Y. H.; Chang, J. H.; Roh, J. H.; OH, H. W.; Lee, S. G. et al., 2001. Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. *Current Microbiol.* 43: 284-287.
- Lee, L.; Saxena, D. M.; Stotzky, G. 2003. Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4111-4115.
- Leme-Ferreira, L. H. P.; Tanaka Suzuki, M.; Nakagawa-Itano, E.; Ono, M. A.; Nagy Arante, O. M. 2003. Ecological Aspects of *Bacillus thuringiensis* in an Oxisol. *Scientia Agricola.* 60: 19-22.
- Lertcanawanichakul, M.; Wiwat, C.; Bhumiratana, A.; Dean, D. H. 2004. Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar*. *Curr. Microbiol.* 48: 175-181.
- Lord, J. C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *J. Invertebr. Pathol.* 89: 19-29. Lord, J. C.; Undeen, A. H. 1990. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

- sis toxin by dissolved tannins. *Environ. Entomol.* 19: 1547-1551.
- Leong, K. L.; Cano, H.; R. J.; Kubisnki, A. M. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. *Environ. Entomol.* 9: 593-599.
- Manasherob, R.; Ben-Dov, E.; Xiaoqiang, W.; Boussiba, S.; Zaritsky, A. 2002. Protection from UV-B damage of mosquito larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* expressed in *Anabaena* PCC 7120. *Curr. Microbiol.* 45: 217-220.
- Maxwell, F. G.; Jenkins, J. N.; Keller, J. C.; Parrot, W. L. 1963. An arrestant and feeding stimulant for the boll weevil in water extracts of cotton-plant parts. *J. Econ. Entomol.* 56: 449-454.
- McGuire, M. R.; Shasha, B. S. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 83: 1813-1817.
- McGuire, M. R.; Shasha, B. S. 1992. Adherent starch granules for encapsulation of insect control agents. *J. Econ. Entomol.* 85: 1425-1433.
- McGuire, M. R.; Shasha, B. S.; Eastman, C. E.; Oloumi-Sadeghi, H. 1996. Starch- and flour-based sprayable formulations: Effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 863-869.
- McGuire, M. R.; Shasha, B. S.; Lewis, L. C.; Bartelt, R. J.; Kinney, K. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 2207-2210.
- McGuire, M. R.; Shasha, B. S.; Lewis, L. C.; Nelsen, T. C. 1994. Residual activity of granular starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 87: 631-637.
- McMillian, W. W.; Young, J. R.; Wiseman, B. R.; Sparks, A. N. 1968. Arrestant-feeding stimulant as an additive to shell SD-8447 for control of corn earworm larvae in sweet corn. *J. Econ. Entomol.* 61: 642-644.
- Moldes, C.; Farinós, G. P.; de Eugenio, L. I.; García, P.; García, J. L.; Ortego, F.; Hernández-Crespo, P.; Castañera, P.; Prieto, M. A. 2006. New tool for spreading proteins to the environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 88-93.
- Morales Ramos, L. H.; McGuire, M. R.; Galán Wong, L. J. 1998. Utilization of several biopolymers of granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 91: 1109-1113.
- Morales-Ramos, L. H.; McGuire, M. R.; Galán-Wong, L. J.; Castro-Franco, R. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist.* 25: 59-67.
- Morales Ramos, L. H.; Rosas García, N. M.; Pérez Domínguez, J. F.; Galán Wong, L. J. 2005. Evaluación en campo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Diatraea* sp. *Ciencia UANL.* 1: 74-79.
- Morris, O. N.; Trotter, M.; McLaughlin, N. B.; Converse, V. 1994. Interaction of caffeine and related compounds with *Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki* in bertha armyworm (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 610-617.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2006. Rockville Pike. Bethesda, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>.
- Nester, E. W.; Thomashow, L. S.; Metz, M.; Gordon, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. *American Academy of Microbiology.* p. 18.
- Polanczyk, R. A. 2004. Estados de *Bacillus thuringiensis* Berlinervisando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Tesis doctoral. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidad de São Paulo. Estado de São Paulo, Brasil.
- Pszczolkowski, M. A.; Brunner, J. F.; Doerr, M. D.; Brown, J. J. 2004. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* with monosodium glutamate against larvae of obliquebanded leafroller (Lep.:Tortricidae). *J. Appl. Entomol.* 128: 474-477.
- Quintero Ramírez, R. 1997. Análisis técnico-económico sobre la producción de *Bacillus thuringiensis*. CamBio-Tec. P. 27-82.
- Ramírez-Suero, M.; Robles-Olvera, V.; Ramírez-Lepe, M. 2005. Spray-dried *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. *J. Econ. Entomol.* 98: 1494-1498.
- Ridgway, R. L.; Illum, V. L.; Farrar, Jr. R. R.; Calvin, D. D.; Fleischer, S. J.; Inscoc, M. N. 1996. Granular matrix formulation of *Bacillus thuringiensis* for control of the European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 1088-1094.
- Rhodes, D. 1993. Formulation of biological control agents. En: D. G. Jones (ed.). *Exploitation of Microorganisms*. London: Chapman and Hall.
- Rosas-García, N. M.; Arévalo-Niño, K.; Galán-Wong, L. J.; Morales-Ramos, L. H. 2004. Evaluation of feeding stimulants combined with polymers to develop formulations against *Diatraea saccharalis* (F). *Southwestern Entomologist* (29): 153-158.

- Rosas-García, N. M. 2006. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. *Pest Management Science* (62): 855-861.
- Rosas-García, N. M.; De Luna-Santillana, E. J. 2006. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22 (3): 135-142.
- Rosas García, N. M.; Arévalo Niño, K.; Pereyra Alférez, B.; Medrano Roldán, H.; Galán Wong, L.; Pérez Domínguez, J. F.; Morales Ramos, L. H. 2003. Elaboración de un bioinsecticida contra el gusano barrenador de la caña de azúcar. *Ciencia UANL* 4: 491-496.
- Rosas-García, N. M.; Medrano-Roldán, H.; Arévalo-Niño, K.; Galán-Wong, L. J.; Luna-Olvera, H. A.; Morales-Ramos, L. H. 2001. Spray-dried encapsulated *Beauveria bassiana* formulations using biodegradable polymers. *Southwestern Entomologist* 3: 259-267.
- Santiago-Álvarez, C.; Quesada-Moraga, E. 2001. Empleo de *Bacillus thuringiensis* en los sistemas agrícolas. En: Caballero P.; Ferré, J. M. V. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. España: Phytoma. p. 189-215.
- Shapiro, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 82: 548-550.
- Singh, A.; Boora, K. S.; Chaudhary, K. 2007. Effect of different additives on the persistence and insecticidal activity of native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Indian Journal of Microbiology* 47: 42-45.
- Sawicka, E. M; Couch, T. L. 2002. Formulations of entomopathogens. Pesticides Formulations and Application System. Philadelphia. *American Society for Testing and Materials*. p. 5-11.
- Saxena, D.; Ben-Dov, E.; Manasherob, Z. B.; Boussiba, S.; Zaritsky, A. 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kwstaki* producing melanin. *Current Microbiol.* 44: 25-30.
- Tamez-Guerra, P.; Castro-Franco, R.; Medrano-Roldán, H.; McGuire, M. R.; Galán-Wong, L. J.; Luna-Olvera, H. A. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera). *J. Econ. Entomol.* 91: 86-93.
- Tamez-Guerra, P.; García-Gutiérrez, C.; Medrano-Roldán, H.; Galán-Wong, L. J.; Sandoval-Coronado, C. F. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist*. 24: 37-48.
- Tamez-Guerra, P.; McGuire, M. R.; Behle, R. W.; Hamm, J. J.; Sumner, H. R.; Shasha, B. S. 2000a. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 210-218.
- Tamez-Guerra, P.; McGuire, M. R.; Behle, R. W.; Shasha, B. S.; Galán-Wong, L. J. 2000b. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 219-225.
- Tamez-Guerra, P.; McGuire, M. R.; Medrano-Roldán, H.; Galán-Wong, L. J.; Shasha, B. S.; Vega, F. E. 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 1424-1430.
- Teera-Arunsiri, A.; Suphantharika, M.; Ketunuti, U. 2003. Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *J. Econ. Entomol.* 96: 292-299.
- Van Frankenhuyzen; K.; Nystrom, C. 1989. Residual toxicity of a high-potency formulation of *Bacillus thuringiensis* to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 868-872.
- Yendol, W. G.; Hamlen, R. A.; Rosario, S. B. 1975. Feeding behavior of gypsy moth larvae on *Bacillus thuringiensis*-treated foliage. *J. Econ. Entomol.* 68: 25-27.
- Ziegler, D. R. 1999. *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, 7 Edition. Part 2: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. USA.