

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DISEÑO Y EVALUACION DE FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* EN LABORATORIO Y CAMPO EN *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) Y *Aedes aegypti* (Linnaeus).

TESIS
QUE PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA

MARIA LUISA RODRIGUEZ TOVAR

Monterrey, Nuevo León.

Septiembre, 1994.

TM

Z532

FCB

1994

R6



1020091384

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DISEÑO Y EVALUACION DE FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* EN LABORATORIO Y CAMPO EN *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) Y *Aedes aegypti* (Linnaeus).

TESIS
QUE PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA

MARIA LUISA RODRIGUEZ TOVAR

Monterrey, Nuevo León.

Septiembre, 1994.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DISEÑO Y EVALUACION DE FORMULADOS *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EN LABORATORIO Y CAMPO EN *Culex pipiens quiquefasciatus* (Say) Y *Aedes aegypti* (Linnaeus).

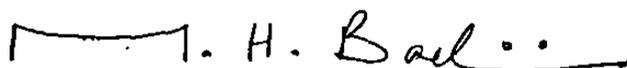
TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA
MARIA LUISA RODRIGUEZ TOVAR

COMISION DE TESIS



DR. LUIS J. GALAN WONG
PRESIDENTE



DR. MOHAMMAD H. BADI Z.
SECRETARIO



M. en C. HUMBERTO QUIROZ MARTINEZ
VOCAL

MONTERREY, NUEVO LEON

SEPTIEMBRE DE 1994.

DISEÑO Y EVALUACION DE FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EN LABORATORIO Y CAMPO EN *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) Y *Aedes aegypti* (Linnaeus).

DEDICATORIA

A Dios...

Dedico este trabajo muy especialmente a mis padres:

Sr. Raúl Rodríguez Santos
Sra. Margarita Tovar de Rodríguez

A mi hermana: Claudia María Rodríguez Tovar

Ellos son parte de mi equipo de trabajo; compañeros incansables en las colectas de campo, hoy comparten conmigo un marcado interés por los mosquitos Culícidos, grupo de insectos que aunque justificadamente tienen el título de plagas, su presencia es indispensable en los Ecosistemas Acuáticos.

A mis hermanos:

Rosa Elia, Martha Elva, Raúl, Oscar, Sanjuana,
Gerardo, Rosario Margarita, Alejandra y Claudia María.

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo del presente trabajo, brindaron su apoyo invaluable las siguientes personas a quien agradezco profundamente su gesto desinteresado:

El Dr. Luis J. Galán Wong; Dr. Mohammad H. Badii Z.; M. en C. Humberto Quiroz Martínez; asesores y miembros del Comité de Revisión de Tesis a quién agradezco su valiosa colaboración.

Los Maestros M. en C. Raúl Torres Zapata; M. en C. Roberto Mercado Hernández; brindaron su apoyo en los Análisis Estadísticos que se llevaron a cabo en el presente trabajo.

Agradezco a la Dirección General de Investigación y Superación Académica (DGISA-SEP) convenio 89-01-0255563-02, por el apoyo brindado para la realización de parte de este proyecto.

Agradezco a los directivos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por fomentar la preparación académica de los Maestros, brindando las facilidades para la realización de estudios de Postgrado.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología a cargo del Dr. Luis J. Galán Wong, por haber facilitado el Ingrediente Activo de *Bacillus thuringiensis israelensis*, con que se hicieron las pruebas.

La mecanografía de la tesis estuvo a cargo de la Srita. Isabel Capetillo a quien agradezco profundamente su esfuerzo y paciencia.

Deseo expresar mi gratitud a mis amigos y compañeros por su apoyo y más que nada por favorecerme con su amistad: Teresa E. Torres C.; Consuelo González de la Rosa; Cristina Rodríguez Padilla; Isabel Capetillo; Guadalupe Alanís; Salomón Martínez; Raúl Torres; Mohammad Badii; Humberto Quiroz; Gabino Rodríguez; Ma. de la Paz Tijerina; Antonio Guerra y Jorge Verduzco.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ae.	<i>Aedes</i>
AI/Aire	Ingrediente activo por aire
AI/ha	Ingrediente activo por hectarea
B.t.i.	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
B.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cm	Centímetro (s)
cm ²	Centímetros cuadrados
cm ³	Centímetros cúbicos
Cx.	<i>Culex</i>
et al	Colaborador (s)
EUA	Estados Unidos de América
g/l	Gramo (s) por litro
g	Gramo (s)
ha	Hectarea (s)
IPS-82	Estándar Internacional de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
Kda	Kilodaltons
kg	Kilogramo (s)
kg/ha	Kilogramo (s) por hectarea (s)
LC ₅₀	Concentración Letal cincuenta
LC ₉₀	Concentración Letal noventa
LC ₁₀₀	Concentración Letal cien
mg	Miligramo (s)
mg/l	Miligramo (s) por litro (s)
ml	Mililitros
m ²	Metro (s) cuadrado (s)
No.	Número (s)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
STD	Estandar
UTI/mg	Unidades Tóxicas Internacionales por miligramos
δ	Delta
μm	Micrómetro (s)
α	Alfa
β	Beta
h	hora (s)

INDICE

Página

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	5
ANTECEDENTES	6
1.- El papel del Control Microbiano dentro del Control Biológico de Plagas.	6
2.- Ventajas y Desventajas del Control Microbiano.	8
3.- Tipos de Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	10
4.- Modo de acción y toxicidad del cristal.	12
5.- Formulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .	16
6.- Control Microbiano de Mosquitos Culicidos en México.	36
7.- Futuras investigaciones en <i>B. thuringiensis</i> .	38
MATERIAL Y METODOS	39
A. Evaluación en Laboratorio - Ingrediente Activo <i>B.t.i.</i>	39
B. Formulación - Selección de componentes del -- formulado.	40
C. Evaluación de los formulados en campo.	45
D. Evaluación de formulados en <i>Aedes aegypti</i> en campo.	47
E. Evaluación de formulados en <i>Culex</i> -- <i>quinquefasciatus</i> en campo.	48
F. Evaluación de formulados en <i>Psorophora ciliata</i> .	50

	Página
RESULTADOS	51
A. Actividad del Ingrediente Activo de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> en larvas de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i> en condiciones de laboratorio.	51
B. Diseño y Evaluación de formulados en condiciones de laboratorio.	54
1.- Materia Inerte.	54
2.- Preparación y Evaluación de los formulados en laboratorio.	58
a) Materia Inerte 50% - Ingrediente -- Activo 50%	58
b) Materia Inerte 70% - Ingrediente -- Activo (B.t.i.) 30%	59
c) Materia Inerte 90% - Ingrediente -- Activo (B.t.i.) 10%	60
d) Materia Inerte 95% - Ingrediente -- Activo (B.t.i.) 5%	60
e) Materia Inerte 99% - Ingrediente -- Activo (B.t.i.) 1%	61
3.- Evaluación de los formulados de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> en campo.	65
a) Evaluación en <i>Aedes aegypti</i> .	65
b) Evaluación en <i>Culex quinquefasciatus</i> .	69
c) Evaluación en <i>Psorophora ciliata</i> .	71
CONCLUSIONES	75
LITERATURA CITADA	80
INDICE DE TABLAS	87

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1.- Actividad del Ingrediente Activo de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> en <i>Aedes aegypti</i> en condiciones de Laboratorio.....	87
TABLA 2.- Actividad del Estandar Internacional (IPS-82) - de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , en larvas de <i>Aedes aegypti</i> en condiciones de Laboratorio.....	87
TABLA 3.- Actividad del Ingrediente Activo de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> en <i>Culex quinquefasciatus</i> en condiciones de Laboratorio.....	88
TABLA 4.- Características fisicoquímicas determinadas a 3 candidatos de Materia Inerte (talco, caolín, tierra de diatomeas) para la formulación de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	88
TABLA 5.- Actividad del formulado preparado con 50% de Ingrediente Activo (<i>B.t.i.</i>) y 50% de Materia Inerte (Talco) en larvas de 3er. estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de insectario.....	89
TABLA 6.- Actividad del formulado preparado con 50% de Ingrediente Activo (<i>B.t.i.</i>) y 50% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) en larvas de 3er. estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de insectario.....	89
TABLA 7.- Actividad del formulado de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> preparado con 50% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 50% de Ingrediente Activo (<i>B.t.i.</i>) en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de insectario.....	90
TABLA 8.- Actividad del formulado preparado con 50% de Ingrediente Activo (<i>B.t.i.</i>) y 50% de Materia Inerte (Talco) en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de insectario.....	90
TABLA 9.- Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Talco) y 30% de Ingrediente Activo (<i>B.t.i.</i>) en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de insectario.....	91

TABLA 10.- Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de -- *Aedes aegypti* de insectario..... 91

TABLA 11.- Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Talco) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de insectario..... 92

TABLA 12.- Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de insectario.....92

TABLA 13.- Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Talco) y 10% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario..... 93

TABLA 14.- Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 10% Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario..... 93

TABLA 15.- Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 10% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario. 94

TABLA 16.- Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Talco) y 10% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario..... 94

TABLA 17.- Actividad del formulado preparado con 95% Materia Inerte (Talco) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.); en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario..... 95

TABLA 18.- Actividad del formulado preparado con 95% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario..... 95

TABLA 19.- Actividad del formulado preparado con 95% de Materia Inerte (Talco) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de insectario..... 96

TABLA 20.- Actividad del formulado preparado con 95% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i) en larvas de 3er. estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de insectario..	96
TABLA 21.- Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Talco) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de insectario.....	97
TABLA 22.- Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de insectario.....	97
TABLA 23.- Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Talco) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de insectario.....	98
TABLA 24.- Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de insectario..	98
TABLA 25.- Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de <i>Cx. quinquefasciatus</i> de insectario.....	99
TABLA 26.- Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de insectario.....	99
TABLA 27.- Actividad del formulado preparado con Talco, B.t.i. y Coadyuvante, (5:5:1) en larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> provenientes de campo.....	100
TABLA 28.- Actividad del formulado preparado con Tierra de Diatomeas, B.t.i. y Coadyuvante, (5:5:1) en larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> provenientes de campo.....	100
TABLA 29.- Actividad del formulado preparado con Tierra de Diatomeas, B.t.i. y Coadyuvante (5:5:1), en larvas de 3er. estadio de <i>Aedes aegypti</i> de campo.....	101

TABLA 30.- Actividad del formulado preparado Talco, *B.t.i.* y Coadyuvante (5:5:1), en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de campo..... 101

TABLA 31.- Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de campo..... 102

TABLA 32.- Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de campo..... 102

TABLA 33.- Compañías Formuladoras de *Bacillus thuringiensis israelensis*..... 103

TABLA 34.- Potencia en UTI/mg. obtenida en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* con los formulados preparados con 5 proporciones de Talco como Materia Inerte y el Ingrediente activo de *B.t.i.*..... 104

TABLA 35.- Potencia en UTI/mg. obtenida en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* con los formulados preparados con 5 proporciones de Tierra de Diatomeas y el Ingrediente Activo de *B.t.i.*..... 104

TABLA 36.- Evaluación en campo de 2 formulados: Diseño local (Tierra de Diatomeas, *B.t.i.* y Coadyuvante proporción 5:5:1) y el Bactimos formulado comercial; en larvas de *Aedes aegypti* en el Panteón Jardín Español, Guadalupe, N.L. Junio 1992..... 105

TABLA 37.- Evaluación en campo de 2 formulados: Diseño local (Tierra de Diatomeas, *B.t.i.* y Coadyuvante proporción 5:5:1) y el Bactimos formulado comercial en larvas de *Cx. quinquefasciatus*, Río Pesquería, Pesquería, N.L. Septiembre de 1992..... 106

TABLA 38.- Evaluación del formulado de Diseño local (Talco-*B.t.i.*-Tritón) en la proporción 5:5:1, en larvas de *Psorophora ciliata* provenientes de campo..... 106

TABLA 39.- Evaluación en campo de un formulado de Diseño local preparado con Talco-*B.t.i.*-Tritón (5:5:1) en larvas de *Psorophora ciliata* en Salinas Victoria, N.L. Septiembre de 1992..... 107

RESUMEN

Se diseñaron y evaluaron en laboratorio y campo formulados a partir del ingrediente activo *Bacillus thuringiensis israelensis* producido localmente. Las especies de prueba fueron *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens quinquefasciatus* en ensayo de laboratorio. En campo los formulados se evaluaron en *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens quinquefasciatus* y *Psorophora ciliata*.

Los formulados se prepararon con: *B.t.i.*, Materia Inerte (Talco y Tierra de Diatomeas) en cinco diferentes proporciones respectivamente. El mejor resultado de los formulados diseñados fué la proporción de 1:1 de *B.t.i.* y Materia Inerte (Talco y T. Diatomeas). La potencia del formulado de *B.t.i.* con talco en *Ae. aegypti* fué de 2,483 UTI/mg; la potencia del formulado con la misma proporción pero con T. Diatomeas fué de 5,093 UTI/mg. En *Cx. quinquefasciatus* expuesto al formulado con Talco se observó la potencia de 4,054 UTI/mg; con T. Diatomeas como Materia Inerte fué de 2,941 UTI/mg. Con el método estadístico de Wilcoxon se determinó que la potencia obtenida a los formulados con Talco y T. Diatomeas fué igual para *Ae. aegypti*. Con el mismo método aplicado para *Cx. quinquefasciatus* no se observó diferencia en la potencia obtenida para los formulados evaluados. Por el método de Mann Whithney se determinó que la potencia obtenida para *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* en forma independiente fué igual.

Los formulados evaluados en campo (Tierra de Diatomeas, *B.t.i.* y Triton X-114) en *Ae. aegypti* en floreros de cementerios, resultó efectivo a las dosis de 0.036; 0.272; 0.408 mg/l, con una reducción larvaria de 90.9%; 100% y 100% respectivamente. El Bactimos[®] evaluado en *Ae. aegypti* a las dosis de 0.086; 0.172 y 0.258 mg/l; la reducción larvaria fué del 100%.

Los formulados evaluados con *Cx. quinquefasciatus* en campo, en charcas de 1m²: el formulado de diseño local (T. Diatomeas, *B.t.i.* y Triton X-114) a las dosis: 0.11; 0.22 y 0.33 mg/l; presentaron una reducción larvaria de 76%, 80% y 82% respectivamente. El Bactimos evaluado en la misma especie a las dosis: 0.12; 0.24 y 0.36 mg/l mostró una reducción larvaria de 93.7%, 95.5% y 100% respectivamente.

Psorophora ciliata se evaluó en charcas temporales, el formulado de diseño local conteniendo Talco, *B.t.i.* y Triton X-114; con las dosis: 0.12; 0.24 y 0.36 mg/l. La reducción larvaria fué de: 79.16%; 94.11% y 90.54% respectivamente a las dosis aplicadas.

INTRODUCCION

El Control Biológico constituye una alternativa disponible para contrarrestar la resistencia que los insectos desarrollan a los insecticidas químicos. Una de las principales ventajas del Control Biológico es que actúa directamente sobre los organismos blanco sin tener acción sobre otros y afectar al ambiente. Esta seguridad deriva de su especificidad. Muchos agentes biológicos están disponibles para el control de insectos vectores de enfermedades de importancia médica, De Barjac (1989).

Actualmente se dispone de una amplia variedad de microorganismos entomopatógenos entre estos: virus, bacterias, parásitos como protozoarios y nemátodos. Cada grupo de organismos tiene un potencial diferente en el Control Microbiano, Burges (1971). Un ejemplo de este potencial es *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.) De Barjac (1978), bacteria formadora de endospora y cristal, en este último radica su efecto tóxico para larvas de Culicidos, Simulidos y Chironomidos.

Desde su descubrimiento en 1977 en Israel, Golberg y Margalit (1977); esta bacteria fué considerada como altamente promisoría para el control de larvas de especies de Culicidos vectores de Filariasis, Fiebre Amarilla, Malaria y de mosquitos negros vectores de la Oncocercosis.

México, tiene áreas endémicas de algunos de estas enfermedades que son transmitidos por vectores; para Paludismo

se citan 100,000 casos por año, para las zonas palúdicas que se encuentran distribuídas principalmente en las planicies costeras y las estibaciones en la Sierra Madre Occidental; en los litorales del Pacífico y del Golfo de México, Rodríguez y Loyola (1989).

El Dengue; es otra enfermedad trasmitida por mosquitos culicidos vectores y en nuestro país se ha venido presentando desde 1978. En donde se inicia su aparición en la frontera con Guatemala. Es considerada como endémica en 29 de 33 estados del país. El número total de casos reportados hasta 1990 fué de 227,229. La trasmisión de este padecimiento solo es atribuible al mosquito de hábitos domésticos *Aedes aegypti*, Gómez (1991). Las medidas de Control que comunmente se aplican para Culicidos Vectores, en el país, por las Instituciones Oficiales de Salud, son a base de Insecticidas Químicos como larvicidas y adulticidas.

Desafortunadamente el uso constante e inadecuado de este tipo de control ha causado serios problemas como: contaminación del ambiente, acción sobre otros organismos a los cuales no se dirige el control, resistencia de los insectos a los productos químicos usados. Por lo anterior se fundamenta la búsqueda intensiva que se estableció desde hace varios años, a nivel mundial, de alternativas de combate para mosquitos. El Control Microbiano constituye una efectiva alternativa puesta en práctica a nivel de campo desde principios de los 80's.

Una de las limitaciones para integrar *B.t.i.* en el Control

de Plagas, es su alto costo de importación; formulaciones de *B.t.i* son producidas principalmente en Estados Unidos, Europa y otros países; además el escaso conocimiento que se tiene sobre su forma de acción y de aplicación a nivel de campo en zonas locales.

Se propone ensayar como método alternativo de Control de Culicidos Vectores; *B.t.i.* que es altamente tóxico y selectivo para este grupo de insectos; así como establecer la metodología básica para la evaluación y diseño de formulados, tanto a nivel de Laboratorio como de campo, dirigidos al control de especies de Culicidos Vectores en el Noreste de México.

HIPOTESIS

Suponemos que los extractos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* debidamente formulados aumentarán y mantendrán su eficiencia en el control microbiano de especies de culícidos vectores.

OBJETIVOS

- 1.- Diseñar y Evaluar formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio.
- 2.- Evaluar en campo las formulaciones de *B. thuringiensis* var. *israelensis* en larvas de mosquitos culícidos.

ANTECEDENTES

1.- EL PAPEL DEL CONTROL MICROBIANO DENTRO DEL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS.

El Control Biológico como método para la supresión de plagas fue demostrado en 1889, cuando se combatió la escama algodonosa de los cítricos *Icerya purchasi* usando la vedalia *Rodalia cardinalis*, en California, E.U.A., De Bach (1985).

El mantenimiento en la naturaleza de poblaciones de organismos, dentro de ciertos límites inferiores se le atribuyen a la acción de factores de tipo biótico. Dentro de estos son considerados, depredadores, parásitos y la acción de patógenos; el efecto conjunto y/o por separado constituye el Control Biológico (De Bach, 1985).

Mulla (1990), define los agentes de Control Biológico como aquellos agentes o sus productos que pueden ser usados solos o en combinación con otras estrategias para la regulación de insectos vectores de enfermedades.

Aún cuando el conocimiento de las enfermedades de insectos por microorganismos, data de fines de siglo pasado; Pasteur realizó estudios con el gusano de seda, (*B. mori*) De Bach, (1985).

Posteriormente se inició el desarrollo de técnicas para el uso de *Bacillus popilliae* y *Bacillus leontimorbus*, causante de las enfermedades lechosas en el escarabajo japonés *Popilia japonica*; *Bacillus thuringiensis*, es una bacteria formadora de espora, cristalífera, fué observada por primera vez en la

palomilla de la harina del Mediterráneo, *Anagasta kuhniella* en Europa en 1911; desde entonces ha estado sujeta a pruebas repetidamente para demostrar su potencialidad como patógeno microbiano. Steinhaus, en E.U.A publicó la importancia de ese patógeno en 1957 y desde entonces esta bacteria empezó a tomar gran auge. Fué la primera bacteria seleccionada para ser ampliamente explotada como un agente de control biológico. Hoy en día se conocen más de 40 serovariedades de *Bacillus thuringiensis* con potencial entomopatígeno para lepidópteros, dípteros y coleópteros más recientemente, Cooksey et al (1971); Guillet et al (1979).

De esta manera las bacterias y otros organismos, como hongos, protozoarios y virus han pasado a formar parte de programas del control integrado de plagas. En la actualidad el uso de microorganismos entomopatógenos para el combate biológico de plagas es conocido como Control Microbiano, término que fué aplicado por vez primera por Smith, citado en De Bach, (1985), este autor lo define como una parte del Control Natural, donde la acción de parásitos, depredadores y patógenos actúan para mantener la densidad de población de otro organismo a un nivel más bajo que el que existiría en su ausencia. Para Burgues y Hussey (1971), el Control Biológico se define como la influencia de insectos depredadores, parásitos y patógenos; los cuales pueden ser introducidos y aplicados por el hombre; así mismo, hacen una clasificación de Control Macrobiano para definir la actividad de artrópodos como

depredadores ó parásitos y Control Microbiano para la acción de microorganismos. Para Steinhaus (1963), el control microbiano o uso de microorganismos para la supresión de insectos plaga es una aplicación de amplia importancia de la Patología de Insectos, Barjac y Arcad (1978); Cooksey et al (1971).

2.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CONTROL MICROBIANO

Los organismos entomopatógenos con viabilidad para su aplicación en el control de insectos, son: virus, bacterias, protozoarios y helmintos, de estos solamente algunos son producidos comercialmente; dentro de ellos estan bacterias, virus y hongos.

Al implantar el método de Control Microbiano para combate de insectos plaga deben de considerarse las siguientes ventajas.

- 1.- La naturaleza inocua y ausencia de toxicidad de los patógenos de insectos para otras formas de vida y la consecuente ausencia de residuos tóxicos.
- 2.- Especificidad en alto grado para la mayoría de los patógenos, los cuales tienden a proteger a los insectos benéficos.
- 3.- Compatibilidad de los patógenos con muchos insecticidas químicos, de manera que puedan ser usados en forma conjunta y en algunos casos como sinergistas, ya que los insectos se hacen más susceptibles al envenenamiento con los productos químicos.

- 4.- La versatilidad de diferentes métodos de aplicación.
- 5.- Facilidad, bajo costo de algunos patógenos para ser producidos masivamente.
- 6.- Lentitud aparente con que el huésped susceptible desarrolla resistencia a un patógeno microbiano.
- 7.- Dosis bajas que se requieren para lograr el control. Un análisis sobre los atributos que presentan los agentes de control biológico, fué realizado por Burgues y Hussey (1971), señalando que estos mismos los presentan los agentes de control microbiano, que deben ser considerados para su uso en programas de control integral.

- a).- rapidez de dispersión
- b).- poder de búsqueda del hospedero
- c).- persistencia
- d).- seguridad
- e).- control a niveles subeconómico
- f).- control predecible
- g).- virulencia
- h).- fácil aplicación, producción y almacenamiento

Como cualquier método de control implementado, el uso de entomopatógenos también presenta desventajas, Barjac y Arcad (1978); Cooksey *et al* (1971).

- A).- La necesidad de una aplicación cuidadosa y a tiempo del patógeno con respecto al período de incubación de la enfermedad

- B).- La especificidad marcada de la mayoría de los patógenos.
- C).- La necesidad de mantener el patógeno en condiciones viables, de alta virulencia y en estado durable o resistente hasta que se ponga en contacto con el insecto.
- D).- La dificultad de producir algunos patógenos en grandes cantidades a bajo costo.
- E).- Requerimientos específicos de condiciones climáticas.

3.- TIPOS DE TOXINAS DE *B.thuringiensis*.

Es una bacteria aeróbica, formadora de esporas que produce uno ó mas cristales de proteína tóxica (δ -endotoxina), con cada spora este cristal es liberado en el medio por la lisis del esporangio, al final de la esporulación, Molloy et al (1984).

Los cristales son insolubles en agua, sus esporas y cristales constituyen un insecticida particular, la acción es comparada como un veneno estomacal, que solo es efectivo cuando es ingerido por un insecto y carece de acción por contacto, Dulmage (1975).

Las proteínas insecticidas son sintetizadas durante la esporulación de muchas subespecies de *B. thuringiensis*. Las proteínas con acción tóxica se acumulan intracelularmente como cristales parasporales, Dulmage (1975).

La δ -endotoxina, se forma primero en la fase de esporulación, esta cristalizada entre el esporangio y generalmente en la mayoría de los casos tiene forma piramidal,

el peso del cristal es un tercio del peso total de la célula. Cuando se completa la esporulación el esporangio se lisa, la espora y el cristal se separan.

La α exotoxina es una proteína que se excreta durante la fase logarítmica de crecimiento de algunas cepas de *B.t.* y *B. cereus*, pero solo bajo ciertas condiciones de cultivo. La toxicidad es inespecífica y su modo de acción se desconoce.

La β exotoxina es un nucleótido excretado al medio ambiente durante el crecimiento vegetativo. La mitad de las variedades de *B. thuringiensis* producen β exotoxina. La actividad tóxica es para insectos y otros organismos, Ali et al (1987). Este compuesto es soluble en agua y termoestable. A dosis altas esta toxina también causa otros efectos en organismos no blancos (aves y mamíferos). En Norte América y Oeste de Europa, las formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* son exclusivamente a base de cepas libres de β exotoxina, Steinhaus, citado por De Bach (1985).

La morfología del cristal también difiere en su forma en los diferentes serotipos de *B. thuringiensis*, la mayoría es de forma bipiramidal y en otros casos es irregular.

La proteína del cristal es desnaturalizada por el calor, sin embargo es más estable que la toxina solubilizada. El cristal de *B. thuringiensis* var. *sotto* fué sometido a 65°C y a 80°C por una hora, los cristales se mantienen intactos, pero las proteínas amorfas se inactivaron, Burges y Hussey (1971).

El cuerpo paraesporal de *B. thuringiensis israelensis*

consiste de al menos cuatro proteínas de 27, 65 Kilodaltones (KDa) y una doble de 130 KDa, todas presenta actividad larvicida. Se ha demostrado que la proteína de 65 KDa tiene la mayor actividad mosquitocida. El cuerpo paraesporal de *B.t.i.* solubilizado con alcalis se reporta que es citolítica a insectos y células de mamíferos, con acción hemolítica y neurotoxica cuando se inyecta a ratones. La proteína citolítica mayor es la de 25 KDa la cual deriva de la proteólisis de la proteína 27 KDa., Chilcott et al (1990).

4.- MODO DE ACCION Y TOXICIDAD DEL CRISTAL

El efecto del cristal en lepidópteros fué estudiado por Angus y Heimpel (1960). Ellos observaron que después de la ingestión las larvas de *Bombix mori* presentan parálisis bucal y del tubo digestivo entre la primera y séptima hora, después de la ingestión de los cristales, ocurren cambios en el epitelio del tubo digestivo. Las primeras observaciones sobre el efecto del cristal en el epitelio del tubo digestivo envuelven la disolución de la substancia de cemento de la célula por una substancia parecida a la hialuronidasa presente en el cristal. Fast y Angus (1965), alimentaron con el cristal larvas de *B. mori*. Entre la primera y séptima hora después de la ingestión del cristal el pH del gusano de la seda *Bombix mori* aumentó, lo que provocó la parálisis de la larva por el incremento en pH de la hemolinfa. Los niveles de Potasio se

aumentan en la hemolinfa como respuesta de parálisis, Angus y Luthy (1971).

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* fué aislado en 1977 de una muestra de suelo de un estanque seco, que actuaba como criadero de mosquitos en Negev, Israel, por Golberg y Margalit, como resultado de una extensiva búsqueda de agentes de control de vectores de enfermedades, estas investigaciones fueron hechas con apoyo de la Organización Mundial de la Salud. En el lapso de 1975-1976 se muestrearon 310 criaderos de mosquitos, se colectaron y se examinaron mas de 120,000 larvas de 27 especies de mosquitos para demostrar presencia de patógenos. La bacteria aislada por Margalit resultó ser una nueva variedad de *B. thuringiensis* para la cual se demostró una alta actividad larvicida, Margalit (1990).

Fué clasificada por su antígeno flagelar como serotipo H-14 por de Barjac 1978, en ese mismo año se le denominó como *B. thuringiensis* var. *israelensis*, Garduño et al (1988); Steinhaus (1985).

Se han propuesto algunas teorías para explicar la forma de acción de *B. thuringiensis israelensis*. Una propuesta es que tiene una actividad parecida a un detergente que provoca neurotoxicidad y causa lisis Coloide-Osmótica. Con respecto a la neurotoxicidad esta se basa en que la tóxina 27 KDa causa lisis en todas las células que contienen receptores de Fosfolípidos; en células de mosquitos usadas para fundamentar esta teoría se tiene evidencia de que hay un receptor de

membrana posiblemente un glicoconjugado. La acción primaria de la toxina es que se inserta en la membrana y genera pequeños poros; la presencia de estos poros causa la lisis Coloide-Osmótica, hay una afluencia de iones que acompaña por influjo de agua, hinchazón de las células y eventualmente lisis, Chilcott *et al* (1990).

Esta serovariedad de *B.t.* se diferencia de otras por su especificidad para larvas de mosquitos y simúlidos. Numerosas pruebas de laboratorio y campo, ha demostrado su actividad para un gran número de especies de cuando menos 7 géneros de mosquitos Culícidos reportado resistentes a insecticidas convencionales. Además es efectivo contra diferentes especies de mosquitos negros en variados tipos de hábitat, usando actualmente en igual magnitud que los insecticidas químicos. Se aplica para control de mosquitos Culícidos y Simúlidos encontrándose que carece de efecto para organismos acuáticos.

La toxicidad se asocia con la proteína δ -endotoxina que se produce en el cuerpo parasporal de forma esférica y que contiene cuatro tipos de inclusiones, tres proteínas de 28 KDa, después de unirse a la de 25 KDa, se reportó que es la toxina principal larvicida. Garduño *et al* (1988), citaron que el cristal tóxico de *B.t.i.* está compuesto de 4 diferentes proteínas principales con tamaño de 135, 70, 38 y 28 KDa; las proteínas 135, 70 y 28 KDa, son inmunológicamente distintas. La especie 38 KDa, es derivada de 70 KDa por proteólisis. De manera que aprarentan ser tres genes separados que constituyen

la masa del cristal, Dulmage (1975).

La acción de δ -endotoxina es extremadamente rápida, larvas de *Aedes aegypti* expuestas a la acción de la toxina de *B.t. israelensis* IPS-82 a una dosis de 0.1 mg/l. murieron en 30 minutos. Después de la ingestión se observaron severos daños de las células del epitelio digestivo, la muerte ocurre debido a incapacidad de regulación iónica en el intestino medio y subsecuente paso del tóxico y de iones al hemocele, Steinhaus citado en De Bach (1985).

Habiéndose reiteradamente demostrado la actividad de *B.t.i.* en diversas partes del mundo, donde productos a base de esta bacteria fueron agregados a las campañas antivectoras para el control de Culicidos y Simulidos; China, Japón, Africa, Antigua República Soviética (URSS) y Estados Unidos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), dentro del programa de investigaciones de enfermedades tropicales donde se incluyen Paludismo y Filariasis, como dos de las principales enfermedades de un mayor interés en el mundo; hace la recomendación a todos los países con áreas endémicas de éstas enfermedades, que se realicen investigaciones tendientes al desarrollo Biotecnológico, para producción de *B.t.i.* a base de medios de cultivo con subproductos locales de bajo costo provenientes de industrias de alimentos y productos agrícolas como: Líquido de Remojo de Maíz, Melaza, Harina de soya; subproductos en origen animal como harina de pescado y sangre, Van Essen et al (1982).

5.- FORMULACION DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Un insecticida químico es simplemente un componente que elimina insectos. Estos pueden ser sustancias desarrolladas para tales fines: ácidos minerales y compuestos corrosivos de origen orgánico e inorgánico.

Los insecticidas microbianos pueden ser divididos en dos grupos: aquellos que incluyen organismos vivos como nemátodos, virus, hongos y los que incluyen solamente toxinas como *Bacillus thuringiensis*, De Barjac y Arcad (1978).

En ambos casos el exponer el compuesto, insecticida químico ó toxina de organismos, a su acción sobre el insecto blanco puede hacerse en forma de ingrediente activo, que es el responsable de la actividad ó como formulado; de esta última manera el producto es debidamente acondicionado en un adecuado vehículo que le imparte otras condiciones necesarias para conseguir su acción más efectiva. Los agentes de control microbiano que estan en el mercado son producidos através de procesos de fermentación. El producto es el Ingrediente Activo, que se recupera al final del proceso de fermentación, que es cuidadosamente evaluado en sus propiedades físicas, químicas y biológicas antes de su preparación como formulado comercial. En el proceso de formulación del agente microbiano se considera los mismos factores para el resto de los constituyentes del formulado como materia inerte, surfactantes, adyuvantes y la mezcla del entomopatógeno, Sawicka y Couch (1990).

La actividad (viabilidad y virulencia), del patógeno es mantenida a través del proceso de la formulación. Como consecuencia la actividad es monitoreada por ensayos biológicos en varios estados del desarrollo de la formulación, para determinar el efecto individual y combinado de agentes fisicoquímicos que formarán parte del formulado final y que juegan un papel muy importante para optimizan su potencial, Barbera (1976); Barjac y Arcads (1978); Steinhaus (1985).

En toda formulación independientemente al uso que se destine cabe distinguir tres tipos principales de componentes:

A) MATERIA O PRINCIPIO ACTIVO: Que es el responsable de la actividad toxica.

B) DISOLVENTES O PORTADORES: Actúan como vehículo de la materia activa, éstos pueden ser sólidos o líquidos que permiten usar el formulado diluyéndolo posteriormente en el otro vehículo de aplicación que comunmente es agua.

C) COADYUVANTES: Ayudan a mejorar la eficacia del principio activo en el cumplimiento de su cometido o mejorar su acción.

BASICAMENTE LAS FORMULACIONES SE CLASIFICAN COMO:

a) Formulaciones sólidas: donde se incluyen los polvos espolvoreables, humectables, solubles y los granulados.

b) Formulaciones líquidas: donde se encuentran las formulaciones solubles en agua y en emulsiones de *B. thuringiensis*.

Por razones económicas y técnicas, los insecticidas microbiales se elaboran con las mismas líneas de investigación que los insecticidas químicos. Sin embargo, existen algunas diferencias marcadas con respecto a su producción y formulación; debido a que los organismos tienen requerimientos de medios artificiales para ser producidos "in vitro" ó en hospederos invertebrados, Vandekar y Dulmage (1982).

El problema del mantenimiento y formulación de las cepas es común en ambos casos porque son organismos vivos ó sus toxinas y son afectados por factores que no actúan sobre los insecticidas químicos, como luz ultravioleta, temperatura y otros, de manera que al realizar un formulado de insecticida microbiano, debe de considerarse que los ingredientes que forman parte del mismo sean adecuados para optimizar su acción, así como, para predecir su protección de agentes del medio ambiente, Barjac y Arcads (1978).

La decisión de la forma de presentación de una formulación microbiano depende básicamente: del habitat del insecto blanco, clima y del patógeno en particular.

Los primeros insecticidas microbiales fueron formulados en seco y usados como polvos espolvoreables o polvos humectables, los portadores usados más comunmente son del tipo Atapulgita, Tierra de Fuller, Pirofilita, Talco, Arcillas, Kaolin, Bentonita, Carbonato de Calcio y otros. El talco es ampliamente usado como portador, también se ha reportado que aumenta la susceptibilidad de algunos insectos a infecciones por hongos

Angus y Luthy (1971); Barbera (1976).

Es necesario considerar algunos factores en la selección de la materia inerte o soporte adecuado para la formulación:

a) pH de la sustancia inerte debe ser determinado inmediato en la preparación de la formulación y después de corto tiempo.

b) Capacidad de absorción de agua sin perder sus cualidades de polvo fino, fluidez y facilidad de dispersión o espolvoreación de la materia inerte. Algunas sustancias como Kaolín, Atapulgita, Septionita, tienen gran capacidad de absorción de agua, Barbera (1976).

Las formulaciones en polvo son recomendables para virus y *Bacillus thuringiensis*: en el caso de virus, éstos son producidos dadas sus características en tejidos vivos del hospedero en particular. En la producción comercial el hospedero moribundo es macerado y diluido con un portador que es una sustancia inerte sólida. Si al macerado se agrega a un portador líquido se corre el riesgo de putrefacción por los restos de tejido, Angus y Luthy (1971).

El proceso de obtención de *B. thuringiensis* es un medio semisólido y se prefiere formular en polvo humectable que separa esporas y cristales del medio sólido. Las formulaciones obtenidas como polvos humectables son esporas y cristales secos incluidos en un portador, un agente humectable y un dispersante básicamente y se diluyen con agua para su uso práctico, Angus y Luthy (1971); Barbera (1976).

El agua es el diluyente generalmente usado por formulación

en líquido; bajo ciertas características de pH, cantidad de iones y componentes orgánicos, que son factores importantes en la retención de virulencia para ciertas clases de patógenos, Angus y Luthy (1971); Barbera (1976).

El agua también se recomienda como diluyente para virus y ciertas especies de *Bacillus*, las esporas de ciertos protozoarios germinan si el pH es apropiado y ciertos iones están presentes, Angus y Luthy (1971).

Algunas compañías formuladoras de insecticidas microbianos preparan en presentación tipo emulsión, el patógeno es suspendido en una emulsión que al momento de aplicarse debe diluirse en agua, deben considerarse varios factores para la selección de éstos además de la clase de patógeno, el tipo de emulsificante y una sal como aditivo para alcanzar toxicidad, un agente humectable y un adherente. Este tipo de formulaciones son muy estables por largo tiempo, si se provee de refrigeración, Angus y Luthy (1971); Barbera (1976).

Dentro de los agentes que participan en la formulación y que van a preparar una función específica de acuerdo al tipo de la misma, se encuentran los agentes tensoactivos, su función básicamente es disminuir la tensión superficial del agua que se usa como diluyente, de manera que el producto aumente la humectabilidad del polvo. De igual manera se usan tensoactivos para formulados en líquido solo que su función es formar una emulsión más o menos estable, Angus y Luthy (1971); Barbera (1976).

Generalmente se usan como agentes de fluidez, silicatos aluminicos sólidos. Los agentes de suspensión es otro de los ingredientes indispensables en un producto formulado como polvo humectable, su función es la de elevar ligeramente la viscosidad del agua que sirve de vehículo retardando la caída de la partícula, ejemplo de éste tipo de agentes se cita la goma, caseinatos, albúmina y algunos productos sintéticos Angus y Luthy (1971); Barbera (1976).

Los ingredientes de una formulación pueden ser tan variados como lo requiere el patógeno en cuestión y desde luego el habitat donde se va a realizar la aplicación; de manera que existe una lista de coadyuvantes que proporcionen al patógeno las condiciones más adecuadas para su acción en el insecto blanco.

En el mercado extranjero: Europa, Antigua República Soviética (URSS), República Popular de China y en Estados Unidos, se producen formulados de *B.t.i.* en diferentes presentaciones; como formulados en polvo humectable, polvo dispersable y granulado.

Compañías en Estados Unidos que producen *B.t.i.* en diferentes presentaciones. Biochem Products Montchnin, de USA, producen un polvo humectable Bactimos con una actividad de 3,500 Unidades Tóxicas Internacionales/mg (UTI/mg); Abbott Laboratories, Chicago E.U.A., produce Vectobac con una actividad de 2,000 Unidades Tóxicas Internacionales/mg (UTI/mg) la misma compañía produce un granulado de *B.t.i.* (ABG - 6138G)

con 200 Unidades Tóxicas Internacionales/mg (UTI/mg). Sandoz, San Diego, Ca. E.U.A. Manufactura Teknar que es concentrado dispersable con una actividad de 1,500 Unidades Tóxicas Internacionales/mg (UTI/mg). Estos productos han sido ampliamente evaluados en laboratorio y campo contra larvas de Culicidos y Simulidos en diferentes partes del mundo con una gran variedad de hábitats acuáticos, Golberg y Margalit (1977); Lebrum y Vlagen (1981); Levy et al (1984); Rodcharoen (1988); Merritt et al (1989).

Durante el desarrollo de las formulaciones de B.t.i. en diferentes partes del mundo, se establecieron formulaciones de referencia, usando Simulidos y Culicidos como insectos blanco; el Centro Internacional de Referencia que se encuentra en el Instituto Pasteur París, Francia; De Barjac elaboró un estandar de IPS-82 con una actividad de 15,000 Unidades Tóxicas Internacionales (UTI), determinada en larvas de *Aedes aegypti* de la cepa Bora-Bora. Se implantó un bioensayo de referencia para polvo primario y formulaciones contra mosquitas negras, De Barjac (1990).

Las primeras formulaciones experimentales fueron hechas a base de polvos primarios la mínima concentración usada fué de 0.1 mg/l contra *Aedes detritus* y 0.4 mg/l respectivamente, este producto fué elaborado por los Laboratorios Roger Bellom (R - 153. 78). La efectividad de estos formulados fué menor que la del polvo primario, Dejoux (1979).

Las campañas de lucha contra la Oncocercosis en Africa

Occidental se llevan a cabo mediante el uso de larvicidas como Temephos; posterior al descubrimiento de *B.t.i.* se iniciaron los ensayos para medir su actividad en Símulidos vectores; usando el polvo primario R-153.78 (Roger Bellum Biochem) formulado y con una actividad de 3,500 UTI/mg fué probado en el complejo de *Simulium damnosum*. La LC_{50} estuvo entre 0.125 y 0.2 mg/l, Guillet y Escaffre (1979).

A partir de 1979, se mostró un gran interés en el desarrollo de formulaciones comerciales de *B.t.i.*, para su evaluación en Laboratorio y Campo, Hall y Arakawa en 1980, de la Universidad de Riversaide, Ca.; sugirieron un método de Bioensayo estandarizado para probar la potencia de los formulados a nivel de Laboratorio, se inició con un trabajo de colaboración con investigadores de Texas (USDA), Florida y Louisiana. Su programa incluyó el uso del Estandar (STD). Internacional IPS-78, una formulación de *B.t.i.* preparada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) de reconocida potencia, el mosquito blanco seleccionado fué *Aedes aegypti* se hizo la recomendación de los ensayos que se estandarizarán con la cepa Bora-Bora, que se encontró colonizada en Europa y en algunos laboratorios de EUA, otros de los datos a considerar en la estandarización fué la temperatura del agua, las pruebas deben ser conducidas en oscuridad, el número de diluciones y el rango sería el mismo, De Barjac (1987); Hall et al (1980).

Durante 1980, en California se llevaron a cabo una serie

de investigaciones encaminadas a evaluar la actividad de productos comerciales, en aplicaciones terrestres y aéreas, sobre una gran variedad de hábitats y especies de mosquitos Culicidos; se determinó el impacto de los factores intrínsecos y extrínsecos del hábitat en la efectividad del producto sobre la especie blanco, García et al (1980); Schaefer et al (1980).

Los formulados comerciales probados fueron: Bactimos[®] (Biochem Products) Sandoz 402[®] (Sandoz Co.) y ABG-6108-D[®] (Labs. Abbott). Las pruebas de laboratorio fueron hechas con la especie blanco y con metodología estandarizada. Las aplicaciones de campo terrestres se hicieron a razón de 1 kg/ha. Para las aplicaciones aéreas se usó el doble del producto que el requerido vía terrestre. Se evaluó la efectividad para *Culex tarsalis*, que fué un 90% de reducción larvaria, tanto en aplicación terrestre como aérea, Schaefer et al (1980).

Se determinó la efectividad de productos en criaderos de *Culex quinquefasciatus*, los que se caracterizaron por la presencia de alta contaminación, en éste caso se usó hasta tres veces la cantidad de productos formulados que para otro tipo de hábitats sin estas características, para poder lograr un control efectivo.

Anopheles franciscanus fué controlado eficazmente, la población se redujo en un 100%, aún cuando en el hábitat había gran cantidad de algas filamentosas.

Se demostró que *B.t.i.* no presenta efecto sobre especies de organismos acuáticos no blanco, su acción tóxica se reduce a especies de Dípteros Nematoceros de la familia Culicidae, Simulidae y Chironomidae, Lebrum y Vlayen (1981).

La presencia de plantas como lentejilla (*Lemna*) y una planta acuática (*Potamogeton*) no tienen ninguna influencia sobre la actividad de *B.t.i.*, García et al (1980).

La edad de las larvas tiene influencia en la actividad de *B.t.i.*, *Aedes nigromaculis*, *Culex tarsalis* y *Psorophora columbiae* fueron expuestas a la acción de varios formulados para observar la susceptibilidad por estadio, las larvas del segundo estadio fueron más susceptibles que el tercero y el cuarto. Esto se debe a que los estadios larvales de mayor edad consumen menos cantidad de alimento y la acción de *B.t.i.* como veneno estomacal que requiere ser ingerido, Van Essen et al (1982); Van Essen y Hembree (1980).

El control de larvas se dificultó en algunos casos donde el hábitat presentaba vegetación densa, fué menos efectivo, fué evidente en la serie de pruebas realizadas en los diferentes hábitats y para el control de las diferentes especies de Culícidos que la edad de la larva, la vegetación, la ausencia de contaminación, temperatura del agua, juegan un papel importante en la eficacia del *B.t.i.*, Hall et al (1977).

Sinegré et al (1981), investigaron la influencia de la temperatura, pH, cloro libre, profundidad y la forma del criadero, sobre la susceptibilidad de la larva a la δ -endotoxina

de *B.t.i.*, se usó el polvo primario R-153.78, larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*. Concluyeron que el rango de temperatura de 19°C y 33°C, sin influencia, la presencia de cloro libre inhibe la δ -endotoxina, por lo que sugiere que en los bioensayos se use agua de la llave, Sinegré et al (1981).

La forma del criadero y la profundidad del agua dentro de ciertos límites de superficie de 28-227 cm² y 0.5 - 7 cm de profundidad sin efecto en la toxicidad. Esto en condiciones experimentales puede ser aplicado considerando el área de aplicación y no el volumen del agua, Rodcharoen (1988).

La temperatura del agua tiene una influencia moderada en la efectividad de la δ -endotoxina de *B.t.i.* porque es mayor el metabolismo y actividad de alimentación de las larvas de mosquitos. El rango de temperatura óptima para la acción de la δ -endotoxina está entre los 19 y 33°C. La salinidad se considera que no tiene mayor efecto en la toxicidad de la δ -endotoxina, cloro libre inhibe a ésta, se considera que existe una correlación positiva del pH en la efectividad de la δ -endotoxina, esto se atribuye principalmente cuando el pH es alcalino. La forma, profundidad del criadero no tiene influencia en la efectividad de la toxina porque los formulados a base de *B.t.i.* se aplican con respecto a unidad de área, WHO (1982).

Se han estudiado el efecto de los constituyentes del suelo en la actividad residual de formulaciones de *B.t.i.*, Van Essen

(1982), demostró que la presencia de constituyentes del suelo, se asocia con la pérdida de actividad larvicida residual, posiblemente ésto se deba:

- a) deterioro químico de la toxina
- b) adherencia física de la toxina a partículas de suelo,
- c) interferencia con la conducta alimenticia de las larvas. Van Essen et al (1982).

Habiéndose demostrado repetidamente que la actividad de formulaciones de *B.t.i.*, son menos efectivas para larvas de cuarto estadio de mosquitos y para pupas; se realizó una investigación usando formulaciones comerciales con el Arosurf (un film mononuclear de superficie). Este producto es efectivo para controlar estadios inmaduros de mosquitos y pupas, el cual está registrado en Estados Unidos recomendado para su uso en todas las clases de agua por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA). Su forma de acción es la modificación fisicoquímica de la interfase del agua del hábitat de los mosquitos. Este producto fué evaluado en Laboratorio y campo en *Anopheles albimanus* aplicándose la mezcla del formulado de *B.t.i.* y Arosurf^R. La efectividad de la acción de cada uno de los componentes (Tóxico-Físico), resultó ser bueno como larvicida y pupicida. Se observó así mismo que existen compatibilidad para mezclar Arosurf^R con Teknar^R, Vectobac^R y Bactimos^R, usando agua como base de las formulaciones, Levy et al (1984); Perich et al (1987).

Se determinó la eficacia de un formulado de B.t.i. (Teknar HP-0) (3,000 UTI/mg. en *Aedes aegypti*) para el control de mosquita negra en Río Betsie en Michigan. En este trabajo se estudió el acarreo del formulado y el efecto sobre organismos No blanco (invertebrados y peces). La mortalidad fué alta (100%) hasta 2,200m. abajo del sitio de aplicación y disminuyó a un 30% a 3,200m., fué nula a 4,500m. del sitio de aplicación, sin observar efecto en los organismos no blanco, Merritt *et al* (1989).

Dos formulaciones experimentales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en forma de líquido; SAN 402 SC 98 (Sandoz) y el ABG-6188 (Lote 87-038) (Abbott); ambas formulaciones fueron probadas en laboratorio en larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* y tercer estadio de *Aedes vexans*. En campo se evaluaron en 4 lotes de prueba de 40-50 m² con 10-20 cm. de profundidad, con larvas de tercero y cuarto estadio de *Aedes vexans*. En laboratorio se observó que la formulación de Sandoz, fué más efectiva que la de Abbott. En las pruebas de campo, la formulación SAN 402 SC 98 (Sandoz) a 0.25 litros/ha. y el ABG 6188 a 1.00 litro/ha dieron un control del 97% en larvas de *Ae. vexans* después de 48 hs. no se observó efecto en organismos no blanco como Anfípodos y 4 especies de escarabajos del agua, Gharib y Hilsenhof (1988).

En el Este de Italia se llevaron a cabo evaluaciones de Laboratorio y campo para probar formulaciones industriales de *B. thuringiensis israelensis* contra algunas especies de

mosquitos. Se usaron 2 formulados en forma de polvos humectables (Bactimos y Vectobac) y un concentrado líquido (TEKNAR) en condiciones de laboratorio se probaron en larvas de *Cx. pipiens*, *Aedes caspius* y *A. dentritus*; se observó que la susceptibilidad de las tres especies fué casi similar; la LC₅₀ estuvo en un rango de 0.042 - 0.37 ppm. La susceptibilidad fué mayor para *Cx. pipiens*. En condiciones de campo se agregó 0.5 kg/ha en canales de irrigación y se logró el 98% de control para *Cx. pipiens*. Teknar a 1.25 l/ha dió un control de 86-100%. Probadas contra *Aedes caspius* se observó que Bactimos a 0.5 kg/ha y Teknar a 2.5 l/ha dieron un control completo. Rangos más bajos de Bactimos y Vectobac dieron control que varió de 82 - 94% y de 67- 91% respectivamente. Se demostró que el uso de formulaciones de *B. thuringiensis israelensis* es efectivo y económico para el control de las especies probadas, Ali (1984).

Lacey et al (1984) realizaron un experimento para determinar el efecto de "descarga sostenida" de formulados de *B. thuringiensis israelensis* y *B. sphaericus* contra larvas de *Cx. quinquefasciatus* en 2 tamaños de depósitos (tanques de 8 y 18.9 lts.) formulados de *B. thuringiensis*: Polvo humectable (Bactimos); Bactimos-Briquets. El formulado de *B. sphaericus* fué una suspensión acuosa del aislado 1593. Para ambas bacterias se prepararon un formulado en forma de pelotitas "pellets"; mezclando el polvo primario de cada bacteria con azúcar pulverizada y polipropilero en polvo en una proporción de 1:1:1.3 respectivamente.

La actividad tóxica para el formulado de *B.t.i.* se observó que el formulado en briquetas brindó mejor efecto residual por 3 semanas después del tratamiento; el formulado preparado en forma de pelotitas solo fué activo por 3 días después del tratamiento, se observó colonización por algas y hongos, Lacey *et al* (1984).

El efecto de *B. sphaericus* en sus presentaciones fué casi igual de efectivo, esto se atribuye al efecto residual del bacilo en cadáveres de larvas y su posterior resuspensión en el medio.

Dentro de los factores más importantes en la toxicidad de un formulado es la "densidad de las partículas". Existe una correlación negativa en la densidad de las partículas suspendidas y el nivel de la actividad larvicida. Razón que justifica que el control fué mas efectivo para el formulado en Briquetas pues el polvo primario de *B.t.i.* estuvo más tiempo disponible para las larvas pues la descarga fué lenta, Lacey *et al* (1984).

Por su actividad tóxica contra larvas de mosquitos y mosquitas negras *B.t.i.* ha alcanzado un desarrollo comercial que puede ser usado en programas de Control Integrado. El objetivo del siguiente experimento fué ensayar la mortalidad inicial causado por la aplicación de Duplex un regulador de crecimiento a base de Metopreno y del Vectobac, un formulado de *B.t.i.* aplicado en forma aérea en un rango de 1.32oz AI/aire (39 ml AI/ha). Otro de los objetivos fué determinar la

capacidad residual, estas pruebas fueron dirigidas contra larvas de *Psorophora columbia* y *Anopheles quadrimaculatus* en cultivos de arroz en Arkansas, Bassi et al (1989).

Las poblaciones de *P. columbia* tratadas por separado con Duplex y Vectobac se redujeron inicialmente, pero fué más efectivo Vectobac que Duplex. con *An. quadrimaculatus* la reducción de la población fué inicialmente igual pero después se incremento con Duplex. Estos resultados en el rango de 78 ml AI/ha.

El efecto residual para el Duplex en *P. columbia* se observó por el estudio de emergencia de larvas obtenidas de la áreas de exposición. Comparando el efecto de mortalidad del Vectobac y el efecto residual del Duplex se pudo concluir que ambos productos tuvieron igual efecto de reducción para la población de *P. columbia*, Bassi et al (1989).

Las formulaciones de *B.t.i.* presentes en el mercado son menos efectivas contra larvas de *Anopheles* spp. debido al comportamiento alimenticio de estos mosquitos, las larvas filtran partículas de la superficie del agua con un tamaño de 10 a 20 veces más pequeñas que las larvas de *Aedes* y *Culex*.

Ali et al (1987) hicieron pruebas en Laboratorio para desarrollar una formulación de superficie con un atrayente alimenticio, para el control de larvas de *Anopheles*.

Se probaron como agentes de dispersión y con características para flotar en la superficie mezclados con harina de trigo: aceite de maíz, lecitina de soya, Arosurf y

Liparol. Estos materiales se disolvieron en Tetracloruro de carbono y se mezclaron con harina de trigo en concentraciones de 1, 5, y 25% en peso. Se evaporó el solvente con flujo de aire. Cada mezcla se determinó la dispersión en la superficie del agua (con un tensiómetro), aplicando 10mg a una superficie de 43 cm².

A cada mezcla se determinó la acción fagoestimulante exponiendo larvas de *A. albimanus* a cada mezcla. La actividad del polvo primario se determinó mezclando cantidades de 0.01-0.2 de Ingrediente Activo con 0.5% de aceite de maíz, a través de bioensayo. Esto se hizo con dos sistemas 100 l y 175 l, Ali et al (1987).

Los resultados reflejaron que la mayor reducción en la tensión superficial (36%) lo causó el Arosurf cuando se mezcló en un 5%, sin ser un buen fagoestimulante. El aceite de maíz resultó ser un buen fagoestimulante e induce una reducción satisfactoria de la tensión superficial. Se concluyó que la acción fagoestimulante incrementa la ingestión del formulado aún cuando haya poca cantidad del Ingrediente Activo que sea suficiente para matar las larvas, Ali et al (1987).

El uso de efectivos coayuvantes que brinden acción dispersante y fagoestimulante puede ser una forma de resolver la ineficiencia de algunos formulados de *B.t.i.* a larvas de Anofelinos.

B.t.i., como agente promisorio de control de mosquitos es reconocido, sin embargo 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. La bacteria no se reproduce en los cuerpos de agua en forma natural: el efecto tóxico desaparece de los criaderos de mosquitos en 24-48 h de su aplicación. Se ha intentado a través de formulaciones aumentar la persistencia en el campo, el resultado ha sido deficiente. Se ha propuesto otra solución posible que es la de clonar el gene que codifica las propiedades tóxicas de *B.t.i.* en organismos que en condiciones de campo sean capaces de reproducir y conceder persistencia por varios días, WHO (1982); Weiser (1991).

El aprovechar los hábitos alimenticios de las especies es otra alternativa. Se ha observado que algunas especies de mosquitos Culicidos son filtradores de partículas de ciertos micrómetros y que además pueden ingerir cadáveres de larvas de su misma especie o de otra. Tal es el caso de *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* y *Culiseta longioneolata*, WHO (1982); Weiser (1981).

El trabajo fué dirigido a observar el desarrollo de toxicidad en cadáveres de *Aedes aegypti* muertas por efecto de *B.t.i.*, se desarrolló toda una metodología para determinar el tiempo para que un cadáver pudiera servir para el desarrollo de esporas de *B.t.i.* con acción tóxica, así como la cantidad mínima de esporas para producir la muerte en la larva que ingiera el cadáver tres días después, debido a que las células vegetativas se multiplican y forman esporas. Se requiere más de

mil esporas para eliminar una larva de *Aedes aegypti* del tercer estadio, al final del ciclo varios días después, en el cadáver se desarrollan 3-4 (106) esporas, WHO (1982); Weiser (1991).

Estos resultados pueden ser aprovechados al planear la aplicación simultanea de polvos de *B.t.i.*, en larvas muertas por *B.t.i.*, el polvo actúa durante los primeros días y los cadáveres los siguientes. Desde luego para ésto es necesario conocer los hábitos de alimentación de la especie blanco, la dimensión del hábitat, profundidad y recursos alimenticios que puedan presentar competencia, WHO (1982); Weiser (1991).

Se concluye que la selección de una formulación en particular de *B.t.i.* para control de especies de Culícidos en el campo, debe estar dada por la relación de la especie en particular, el hábito alimenticio con respecto a la profundidad, Weiser (1991).

Lacey y Lacey (1990) realizaron una revisión de la importancia médica de los mosquitos que se crían en cultivos de arroz y de las alternativas de control. Ellos señalan que los mosquitos que viven en los campos inundados de cultivos de arroz en el mundo constituyen más de 135 especies de Culicinos y Anofelinos; de gran interés pues actúan como vectores de enfermedades como Malaria y Encefalitis Japonesa; dentro de las más importantes, actuando además como vectores de Arbovirus y filariasis linfática. Los agentes de Control Biológico que han sido usados en campos de arroz se incluyen especies de peces larvarias; un nemátodo mermítido parásito (*Romanomermis*

culicivora) el hongo (*Lagenidium giganteum*) bacterias (*Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*) se han observado que estos agentes de Control Biológico no presentan efecto a los organismos no blanco.

En Madagascar, fueron usadas formulaciones comerciales de *B.t.i.* y de *B. sphaericus* (Cepa 2362) en pruebas de campo para control de larvas de *Anopheles arabiensis* especie importantes en Highlands-Madagascar pues trasmite Malaria. Este mosquito se le localiza en criaderos principalmente en cultivos de arroz; las formulaciones probadas de *B.t.i.* fué Vectobac-GR con 200 UTI/mg de Abbott; un concentrado Vectobac-C 12 AS con 1,200 UTI/mg. Las formulaciones de *B. sphaericus* fueron un granulado ABG-6185 (Cepa 2362) de Abbott. Las evaluaciones se llevaron a cabo en 5 tipos de habitats larvarios: charcas naturales con agua ligeramente sucia y expuesta al sol en este habitat se uso Vectobac GR y *B. sphaericus* ABG-6185. El rango de aplicación fué de 2-8 kg/ha. El otro habitat fueron fosas para hacer ladrillos con agua de lluvia, materia orgánica y vegetación; se usó Vectobac-GR en un rango de 3-10 kg/ha y en otras fosas ABG-6185 en un rango de 5-18 kg/ha. El otro habitat fueron parcelas de arroz con plantas jóvenes y con agua limpia; se trataron con Vectobac-12 AS en rango 0.6-1 lt/ha Vectobac-GR en un rango de 5-10 kg/ha otras parcelas con ABG-6185 con un rango de 5 - 10 kg/ha. Las dos formulaciones de *B.t.i.* proporcionaron un efectivo control siendo más completo con la formulación granular sobre todo cuando se aplicó a parcelas de arroz en un

rango de 3 kg/ha. La presencia de vegetación causó efecto adverso en el caso del concentrado, el granulado tuvo mayor penetración. Vectobac-GR resultó más eficiente que la formulación granular de *B. sphaericus* cuando fué usada al mismo rango de aplicación, Romi et al (1993).

Existen un gran interés en el uso de estrategias de Control Integrado (IPM) para el Control de Mosquitos (IVC); principalmente incluye; manejo del medio ambiente; control químico, biológico y mecánico.

6.- CONTROL MICROBIANO DE MOSQUITOS CULICIDOS EN MEXICO.

El uso de productos microbianos para el control de mosquitos culícidos, en el país, esta limitada a Instituciones de Enseñanza e Investigación; en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León a partir de 1983 se inició un programa multidisciplinario de Biotecnología de Producción de Insecticidas Microbiales; donde se abarca desde el aislamiento de cepas nativas con actividad insecticida su identificación y producción a nivel de planta piloto, Galán (1993); Rodríguez Padilla (1993).

Se cuenta a la fecha con más de 150 cepas nativas aisladas de *B. thuringiensis*; de la cuales las denominadas como GM-7 y GM-10 ambas son variedades de *aizawai* de *B. thuringiensis*; estas cepas probadas en gusano cogollero de maíz (*Spodoptera frugiperda*) mostraron una actividad 20 veces mayor que la

variedad *Kurstaki* (HD-1). Como resultado de este programa es la sección de aislamiento e identificación de cepas se han aportado 2 nuevas cepas de *B. thuringiensis* la variedad *Neolonensis* serotipo H-24; y la variedad *mexicanensis* serotipo H-27, Rodríguez (1993).

En la parte de Bioensayo se cuenta con 2 grupos de insectos para determinar la acción tóxica de las cepas nativas; Lepidopteras con *Trichoplusia ni* y *Spodoptera frugiperda* y Dipteros con *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. Estos mismos insectos son a su vez usados para hacer ensayos con productos comerciales, Rodríguez T. (1993).

La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Michoacán se ha realizado pruebas para evaluar la toxicidad en condiciones de laboratorio, un formulado de *Bacillus sphaericus* (Cepa 2362) ABG-6185, en larvas de *Culex quinquefasciatus*, Lozano y López (1992).

Instituciones oficiales de Salud la Secretaría de Salud a través del Centro de Investigación de Paludismo (CIP) llevó a cabo unas pruebas en campo para determinar la efectividad de cepas de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus* y *Cx. coronator* en Sureste de México.

En este trabajo probaron 2 formulados de la cepa 2362 de *B. sphaericus*, una presentación en líquido y otra en forma de gránulos. Las dosis de evaluación se logró el control larvario de las especies probadas hasta por 4 meses, Arredondo Jiménez et al (1990).

7.- FUTURAS INVESTIGACIONES EN *Bacillus thuringiensis israelensis*.

La ausencia de persistencia de *B.t.i.* es un problema que puede ser resuelto mediante Ingeniería Genética al usar cepas persistentes parecidas a *B. sphaericus* y clonar la actividad larvicida de *B.t.i.*, De Barjac (1990).

A la fecha la factibilidad de uso de *B. thuringiensis* para el control de insectos se ha visto incrementado por la tecnología de recombinación de DNA. La tecnología ha facilitado la clonación de genes de toxina, su expresión en plantas, semillas y en bacterias, Gill et al (1992).

Aun cuando *B. thuringiensis* constituye una alternativa a los insecticidas químicos, sería un error, sustituir el uso de productos químicos por *B. thuringiensis*, lo ideal es contar en el arsenal químico con una combinación de ambos, Gill et al (1992).

MATERIAL Y METODOS

A. EVALUACION EN LABORATORIO - INGREDIENTE ACTIVO *B.t.i.*

1.- Determinación de la actividad del ingrediente activo.

El ingrediente activo *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ó materia prima fué proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, "Dr. H.T. Dulmage" del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Este Material fué recuperado del estándar Internacional de referencia IPS-82 del Instituto Pasteur París, Francia proporcionado por De Barjac. Su producción en matraz de 500 ml se hizo en un medio de cultivo a base de Melaza y líquido de remojo de maíz. A partir de este producto se hizo una producción en fermentadores de 14 l de capacidad total, en el Instituto Tecnológico de Durango, Durango.

La muestra proporcionada fué un polvo fino, conteniendo esporas y cristales de la bacteria. Este producto se conservó en frascos de vidrio color ambar y una temperatura no mayor de 20°C en la oscuridad.

El Protocolo de Bioensayo fué el recomendado por De Barjac (1986); para *Bacillus thuringiensis israelensis*, usando larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* provenientes de colonias del Insectario del Laboratorio de Entomología.

El Bioensayo incluyó preparar una solución "Stock" de 50 mg/l y a partir de la cual se prepararon una serie de 6 dosis.

Para cada una se incluyeron 4 repeticiones en vasos de plástico desechables con capacidad de 150 ml; se colocó 100 ml de agua y 20 larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

La mortalidad se registró a las 24 y 48 horas después de la exposición. Se realizaron 3 bioensayos en días diferentes. De igual manera se efectuó bioensayo con el estandar Internacional de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS-82 siguiendo el mismo protocolo y el rango de dosis fué de 0.005 mg/l y 0.04 mg/l como mínima y máxima respectivamente.

Con los datos de mortalidad a las 24 horas se determinó la Concentración Letal Media (LC₅₀) por el método de Log-Probit, Finney (1971). Con los datos de LC₅₀ de la muestra y el estandar se procedió a determinar la Potencia de la muestra en términos de unidades tóxicas Internacionales (UTI); usando la fórmula, Dulmage (1990):

$$UTI/mg = \frac{LC_{50} \text{ STD} \times UTI \text{ STD}}{LC_{50} \text{ STD}}$$

B. FORMULACION - SELECCION DE COMPONENTES DEL FORMULADO

1.- SELECCION DE LA MATERIA INERTE

La presentación del formulado seleccionado fué en forma de Polvo Humectable; para la cuál se procedió a seleccionar los componentes del mismo: Materia Inerte. Los candidatos preseleccionados para formar la materia inerte fueron: Silicato

de Magnesio hidratado (talco); silicato aluminico hidratado (Caolin) y Tierra de Diatomeas.

A las tres sustancias se le hicieron las pruebas fisicoquímicas de pH, Suspensibilidad, Tamaño de Partículas y Capacidad de Absorción de Líquidos, Barberá (1976).

SUSPENSIBILIDAD.- Se determinó la suspensibilidad de cada materia inerte por separado para lo cual se usó el método descrito por Barberá, 1976. La técnica consistió en preparar una suspensión al 10% de cada sustancia inerte. Cada suspensión se pasó a una probeta de 100 ml, la cuál se dejó en reposo por 30 minutos.

Después de este tiempo se separó 90% del decantado dejando solamente 10% de la suspensión inicial; la que se resuspendió con agua y se pasó a una cápsula de porcelana previamente pesada; posteriormente se colocó en la mufla a 100°C por 24 h. Transcurrido este tiempo se pesó a peso seco.

La Suspensibilidad se expresó con la siguiente fórmula.

$$S = \frac{10000 \times d}{C.V.} - 10$$

S = Suspensibilidad, porcentaje depositado al cabo de tiempo (t) y el valor remanente hasta 100 (100-S), es el porcentaje del producto que queda aún en suspensión al cabo de tiempo (t).

d = Peso del depósito formado.

c = Concentración original en %.

v = Volumen de la probeta en cm³

El tiempo definido para determinar la suspensibilidad fué de 30 minutos.

TAMAÑO DE PARTICULAS.- La técnica que permitió determinar el tamaño de partículas fué la descrita por Barberá (1976), consistió en colocar 3 gramos de cada sustancia inerte (caolin, tierra de diatomeas y talco); en un tamiz húmedo de 325 mallas equivalente a una apertura de 44 μ m. El contenido del tamiz se expuso a un flujo continuo de agua por 3 minutos. Posteriormente se dejó secar el residuo compuesto de partículas finas que quedaron retenidas en la malla del tamiz por el tamaño. Se recogió el residuo y se determinó el peso. El tamaño de partículas se expresó como porcentaje de rechazo que se determinó por la diferencia del peso inicial de 3 gramos de cada muestra y el peso del residuo.

CAPACIDAD DE ABSORCION DE LIQUIDOS.- Esta característica se determinó mediante un método empírico recomendado por Barberá (1976), que consistió en tomar 1 g de cada muestra; se colocó en un mortero y se le incorporó 2 volúmenes diferentes de aceite mineral; 2 ml y 5 ml. Con el primer volumen de aceite que fué de 2 ml para 1 g de muestra se observó el rechazo y la muestra se pasó por un tamiz del número 325 para pesar la cantidad de rechazo. El segundo volumen de aceite fué de 5 ml para 1 g de cada muestra realizando la misma operación para determinar la cantidad de rechazo y expresando un porcentaje. Se procedió con la misma técnica para observar la capacidad de

absorción de la Materia Inerte al agua.

FORMULACION, MATERIA INERTE E INGREDIENTE ACTIVO (B.t.i.).

Después de realizar las pruebas fisicoquímicas se determinó hacer 2 formulados utilizando 2 substancias como materia inerte: Tierra de diatomeas y talco para ser probada con las especies de mosquitos; *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

Las proporciones de materia inerte que se probaron fueron de 50%, 70%, 90% y 99% de Talco y Tierra de Diatomeas y de 50%, 30%, 10%, 5% y 1% del Ingrediente activo (B.t.i.) respectivamente.

Se hicieron Bioensayos con cada formulado conteniendo la proporción de Materias Inertes e Ingrediente activo con las 2 especies de mosquitos: *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* con material de insectario. La metodología de bioensayo que se llevó a cabo fué la descrita anteriormente. La Mortalidad obtenida en cada Bioensayo hecho con cada proporción de cada Materia Inerte (talco y tierra de diatomeas) y el Ingrediente activo; se analizó por Análisis Probit para obtener LC_{50} y LC_{90} y con este dato se hizo el cálculo de la potencia, Dulmage (1975).

Con los resultados obtenidos y analizados en función de su LC_{50} y potencia obtenida en cada formulado, se seleccionó el que dió menor concentración letal 50 y por consecuencia mayor potencia. Esto se hizo para *Cx. quinquefasciatus* y *A. aegypti*

con las proporciones de Tierra de diatomeas y talco, Ali (1981).

ADICION DEL COADYUVANTE AL FORMULADO.

El siguiente paso de la formulación fué la de adicionar el coadyuvante, que previamente se había elegido, el Tritón X - 114 (Sigma).

La elección del coadyuvante se hizo considerando la referencia de, Angus y Luthy (1971) que lo recomienda como un agente humectante y dispersante que se ha usado para formulaciones de *Bacillus thuringiensis* de tipo polvo humectable.

Como se indicó anteriormente se tenía ya seleccionada la proporción de Materia Inerte (Talco y Tierra de Diatomeas) y el Ingrediente Activo (B.t.i.); para las dos especies de mosquitos. La adicción del coadyuvante se llevó a cabo, en la proporción del 1% del total del formulado.

De manera que el formulado con la proporción 1:1 con Talco y B.t.i. se añadió el 1% de Tritón X-114 y se ensayó con *Cx. quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*. De igual forma se procedió con el formulado compuesto con Tierra de Diatomeas y B.t.i. se añadió Tritón X-114 y se hicieron Bioensayos con *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

Las larvas usadas procedieron de Insectario. La mortalidad en los Bioensayos se tomó a las 24 horas. Se procesaron los datos con Análisis Probit, obteniéndose la LC_{50} y la Potencia respectiva de cada formulado.

En esta parte de la evaluación de los formulados se procedió a usar un formulado comercial como referencia que fué el Polvo Humectable Bactimos de Abbott (E.U.A.) y con una Potencia de 3,500 UTI/determinada en *Aedes aegypti*.

Se hicieron Bioensayos con este formulado al mismo tiempo que los diseñados localmente y con las mismas especie de mosquitos provenientes de Insectario.

Se aplicó dos métodos de estadística no paramétrica: el modelo de Wilcoxon, Zar (1974), para ver la igualdad entre la potencia obtenida con los dos tipos de Materia Inerte y en las diferentes proporciones probadas en las dos especies de mosquitos (*Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*).

El segundo método fué el de Mann Whitney, Zar (1974), para comparar la respuesta en forma independiente a los formulados en las dos especies de mosquitos.

C. EVALUACION DE LOS FORMULADOS EN CAMPO.

La Metodología que se siguió de la Evaluación de los formulados a nivel de Campo fué la de Mulla *et al* (1982). Esta Metodología incluyó primeramente la selección del área de evaluación en el campo y se colectaron larvas para hacer Bioensayo con el formulado en Laboratorio.

Se evaluaron dos formulados con larvas de las siguientes especies de mosquitos. *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, y *Psorophora ciliata*; proveniente de criaderos naturales en Campo.

Los formulados fueron probados por Bioensayos con 6 dosis y 4 repeticiones por cada dosis dando un total de 80 larvas por dosis y 480 larvas por Bioensayo; más los testigos que incluyó uno por dosis, se agregó 20 larvas en 100 ml de agua.

La mortalidad se registró a las 24 horas y con este dato se obtuvo la LC_{50} ; valor que fué utilizado para calcular la Concentración Letal 100; que constituyó la base para las dosis que se usarían en el campo. La metodología sugiere que se realicen las evaluaciones de cada formulado con 3 dosis; las cuales fueron la LC_{100} ; 2 veces la LC_{100} y 3 veces la LC_{100} y un testigo por cada dosis.

CRITERIOS CONSIDERADOS PARA LA EVALUACION DE LOS FORMULADOS EN CAMPO:

- 1.- Tipo de criadero; permanente, semipermanente, temporal ó contenedores.
- 2.- Tipo de fondo de los criaderos: lodoso, rocoso, mixto y otros.
- 3.- Medida y Profundidad del criadero.
- 4.- Presencia de Vegetación; tipo y ubicación en el criadero; emergente ó circundante.
- 5.- Otras características como exposición directa a la radiación solar o sombreado.

La profundidad en promedio fué de 20 cm para todos los casos excepto en el de la Evaluación de los formulados en *Aedes aegypti*. A partir de la Evaluación de los formulados con material de campo en laboratorio y posteriormente en el campo

se utilizó un formulado comercial como referencia.

Las especies de mosquitos más comunes presentes en la zona Metropolitana de Monterrey, son *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. Estas especies se crían en contenedores en el área peridoméstica; como ocurre con *Aedes aegypti*. Además *Cx. quinquefasciatus* ocupa otros tipos de habitats como arroyos y charcas con contaminación de origen doméstico e Industrial.

D. EVALUACION DE FORMULADOS EN *Aedes aegypti* EN CAMPO.

La primera parte de la evaluación en campo de los formulados; fué la de seleccionar los criaderos que pudieran servir para las pruebas y se escogió a *Aedes aegypti* por la facilidad de encontrarse en depósitos regulares como ocurrió en el Panteón Jardín Español ubicado en Guadalupe, Nuevo León. Este Panteón reunió las características deseadas para la Evaluación; areas sombreadas, floreros con agua y larvas de *Aedes aegypti*. Estas cualidades fueron las fundamentales para la selección.

La primera fase de la Evaluación fué la de muestrear larvas de los floreros del 3er. y 4to. estadio para llevar a cabo Bioensayos en el Laboratorio con los formulados.

Se seleccionaron 12 floreros de medidas regulares, para cada formulado se determinó el volumen de agua y aquellas que no tenían igual volumen se les añadió agua de un depósito presente en el mismo panteón. Se hizo la aplicación de 3 dosis con 3 repeticiones y un testigo por dosis. La aplicación de los

formulados se hizo considerando la LC_{100} determinanda para las larvas de los criaderos evaluados en condiciones de Laboratorio. Previo a la aplicación se tomó la Densidad larvaria pretratamiento; para la cual se usó un cucharón y se hicieron tres inmersiones por florero. Las larvas se contaron y se determinó el promedio de la densidad, en cada dosis.

La aplicación se hizo en forma manual; usando una suspensión de cada dosis del formulado en agua de los mismos floreros.

La Densidad larvaria postratamiento se determinó 24 horas después de la aplicación, usando la misma técnica descrita para determinar la densidad pretratamiento.

Para determinar la densidad pre y postratamiento de los testigos se procedió de la misma manera. La diferencia entre la densidad larvaria pretratamiento y postratamiento fué el parámetro que se consideró para determinar la efectividad de las dosis aplicadas del formulado.

Para la evaluación de los formulados en los floreros se tomaron en cuenta otros parámetros:

- a) Tipo de fondo del florero, con materia orgánica, tierra.
- b) Iluminación, soleado, sombreado.
- c) Apariencia del agua.

E. EVALUACION DE FORMULADOS EN *Cx. quinquefasciatus* EN CAMPO.

Para la Evaluación en campo de los formulados en larvas de

Cx. quinquefasciatus; se seleccionó un área ubicada a 20 m del Río Pesquería a la altura de la Colonia Pesquería en la localidad de mismo nombre. Se colectaron larvas de *Culex quinquefasciatus* para evaluar en el laboratorio y determinar la LC_{100} .

Se procedió a acondicionar 7 charcas para cada formulado. 2 charcas se usaron para cada dosis y 1 charca como testigo. Las charcas tenían una medida aproximada de $1m^2$ y una profundidad promedio de 20 cm. Se agregó agua y larvas del río. Se dejó reposar el agua de las charcas por 24 horas.

La densidad pretratamiento se tomó inmediato antes de la aplicación del formulado; se usó un cucharón estandar con capacidad para 400 ml de agua. Se tomaron 5 caladas con el cucharón por charca. El promedio de la densidad se obtuvo para cada dosis. De igual manera se procedió con la charca que actuó como testigo. La aplicación de las dosis se hizo en forma manual usando una suspensión de cada dosis en agua de las mismas charcas.

La densidad postratamiento se determinó a las 24 horas después de la aplicación, procediendo de la misma forma que antes del tratamiento. La diferencia entre la densidad larvaria antes y después del tratamiento permitió determinar la efectividad de cada dosis del formulado.

Se consideraron las siguientes características.

- a) Fondo de la charca.
- b) Iluminación: sombreada, soleada.

c) Apariencia del agua.

F. EVALUACION DE FORMULADOS EN *Psorophora ciliata*.

Psorophora ciliata es una especie de aparición temporal; su presencia esta asociada a la precipitación pluvial en los meses de Mayo y Septiembre, Rodríguez et al (1988).

Se detectaron charcas temporales en la zona suburbana de Salinas Victoria con *P. ciliata* y de inmediato se procedió a coleccionar larvas para evaluar los formulados en condiciones de laboratorio. Una vez que se obtuvo la LC_{100} en Laboratorio se acondicionaron 4 charcas para probar los formulados en campo. El número de charcas fué menor debido a que esta especie alcanza la fase de pupa en aproximadamente 5 días.

Se usó solo una charca por cada dosis de formulado y una charca como testigo.

Se tomó la densidad larvaria antes del tratamiento y después de 24 h de la aplicación del formulado. La efectividad del formulado se determinó por la reducción larvaria que fué la diferencia entre la Densidad pre y postratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

A.- ACTIVIDAD DEL INGREDIENTE ACTIVO DE *Bacillus thuringiensis israelensis* EN LARVAS DE *Aedes aegypti* Y *Culex quinquefasciatus* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

El ingrediente activo; *Bacillus thuringiensis israelensis* se evaluó en larvas de 3er estadio de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*, el intervalo de dosis usadas fueron de 0.02 mg/l y 0.14 mg/l como mínima y máxima respectivamente.

En la Tabla 1 se muestra la mortalidad registrada para *Aedes aegypti* a las 24 horas fué de 17, 45, 56, 65, 85, 95 y 98% correspondiendo en el orden creciente las dosis: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14 mg/l. La concentración letal 50 y 90 obtenidas por el análisis Probit fueron: $LC_{50} = 0.049$ mg/l y $LC_{90} = 0.122$ mg/l respectivamente. Con los datos de Concentración Letal 50 del estandar y la muestra se obtuvo la potencia del Ingrediente activo en Unidades Tóxicas Internacionales (UTI) siendo esta de 3,061 UTI/mg.

La Tabla 2 resume los resultados para el estándar Internacional IPS-82 probado en larvas de *Aedes aegypti* se usaron las siguientes dosis: 0.005, 0.008, 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 mg/l. La Concentración Letal 50 fué de 0.010 mg/l; la $LC_{90} = 0.032$ mg/l. La potencia teórica en UTI/mg. es de 15,000.

La mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* se presenta en la Tabla 3, al Ingrediente Activo con dosis de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 mg/l fué de 6.5, 13.7, 20, 43.7, 52.5 y 83.7% respectivamente. La concentración letal 50

y 90 obtenidas a las 24 horas fueron de $LC_{50} = 0.045$ mg/l; $LC_{90} = 0.084$ mg/l. La potencia en Unidades Tóxicas Internacionales (UTI/mg.) fué de 3,333 UTI/mg.

Las Unidades Tóxicas obtenidas para el Ingrediente Activo en larvas de 3er. estadio de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* producido en un medio de cultivo a base de melaza y líquido de remojo de maíz fué de 3,061 UTI/mg. y 3,333 UTI/mg respectivamente. La actividad del ingrediente activo de *B.t. israelensis* para las larvas de *Aedes* y *Culex* es ligeramente mayor para larvas de *Culex quinquefasciatus* que para las larvas *Aedes aegypti*. Lo anterior concuerda con lo que señala Mulla (1990), *B.t. israelensis* tiene actividad larvicida contra larvas de Simúlidos y Culícidos; mostrando diferencia entre el nivel de susceptibilidad entre las especies. En general las larvas de *Culex* son ligeramente más susceptibles que larvas de *Aedes*; larvas de *Anopheles* son más tolerantes que *Aedes* y *Culex* a polvos primarios y a formulaciones (Mulla 1990). Weiser (1991) señala que para probar aislados de patógenos principalmente hongos y bacterias se debe considerar como más susceptibles las larvas de *Culex*, menos susceptibles *Anopheles* y en tercer lugar considera las larvas de *Aedes*.

De igual manera hay diferencia de susceptibilidad entre el estadio de la larva usado en las pruebas, Mulla (1990) señaló que que los primeros estadios larvarios son más susceptibles que los más viejos sin embargo; su manejo es mas difícil cuando son jóvenes. El segundo estadio es de 1.5 a 5 veces más

susceptible que el cuarto estadio pues este último se alimenta menos. Considerando lo anterior, en los bioensayos se optó por usar larvas del tercer estadio de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

La actividad del Ingrediente Activo probada en *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* comparada con el Estandar Internacional expresada en Unidades Tóxicas Internacionales por miligramo (UTI/mg); fué cinco veces menos potente que el estandar IPS-82, el cual tiene una potencia de 15,000 UTI/mg.

Vandekar y Dulmage (1982); al referirse a la producción de un insecticida microbial del tipo de *Bacillus thuringiensis* señalaron que cuando se desea propagar un aislado de *Bacillus thuringiensis*, se deben de considerar algunos aspectos que pueden influir en la producción de δ -endotoxina.

La δ -endotoxina es considerada altamente estable; sin embargo, existen factores como la presencia de pequeños cuerpos de ADN extracromosómico, llamados Plásmidos, que pueden transmitir información genética a las células y pueden alterar las propiedades del microorganismo.

De igual manera, otro factor que puede alterar la producción de la δ -endotoxina de un aislado específico de *Bacillus thuringiensis*; es el medio de cultivo usado en la fermentación, Dulmage (1982) demostró que un mismo aislado; en medio de cultivo de diferente diseño, influyó en la cantidad de δ -endotoxina producida: El aislado de *B.t.i.* HD-500, fué producido en 2 diferentes medios de fermentación, donde se

obtuvo 206 y 680 UTI/mg. Para el aislamiento de la cepa de *B.t.i.* HD-567, se actuó de igual manera; dos medios diferentes de fermentación y la potencia mostrada fue de 1,970 y 2,910 UTI/mg.

La cepa HD-500 produjo menos endotoxina comparativamente con el HD-567 y al mismo tiempo entre los mismos aislados la diferencia fue notoria.

Maldonado, (1994) realizó un trabajo de producción de *Bacillus thuringiensis israelensis* en varios medios de cultivo, usando subproductos de industrias alimenticias y obtuvo la siguiente respuesta en larvas de *Aedes aegypti*: LC_{50} de 0.031, esta actividad fue obtenida con pasta en polvo (Subproducto de elaboración de galleta); la potencia fue de 4,400 UTI/mg. Comparando este resultado con el obtenido en nuestro ingrediente activo donde la potencia es de 3,061 UTI/mg; la diferencia de casi 1,300 UTI/mg se atribuye básicamente al medio de cultivo usado (Comunicación personal).

B.- DISEÑO Y EVALUACION DE FORMULADOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

1.- **MATERIA INERTE.** Para diseñar el formulado en forma de polvo humectable se determinaron algunas características fisicoquímicas de 3 posibles candidatos para constituir la Materia Inerte (Talco, Caolín y Tierra de Diatomeas). Dichas características fueron: pH, tamaño de partícula, capacidad de absorción de líquidos y suspensibilidad.

EL pH .- Para el talco fué de 8.4; para el caolín de 7.5 y para la tierra de diatomeas de 9.4 (Tabla 4).

EL TAMAÑO DE PARTICULAS.- Expresado en porcentaje de rechazo: fué de 0%, 10% y 15% para Talco, Caolín y Tierra de Diatomeas respectivamente (Tabla 4).

LA CAPACIDAD DE ABSORCION DE LIQUIDOS.- Se expresó en porcentaje de rechazo; fué la materia inerte que no fué "absorbida" por el líquido probado: Prueba con aceite mineral para las tres materias inertes el volumen de 2 ml/g fué suficiente para formar una masa homogénea que no pasó a través de la malla del tamiz No. 325 (Tabla 4).

Para el caso del agua con el volumen de 2 ml/g el talco presentó un 70% de rechazo que correspondió al 70% del peso inicial del talco, esto indicó que solamente el 30% se absorbió con 2 ml de agua. Con el segundo volumen de agua se observó que el rechazo disminuyó al 40% del total de la muestra (Tabla 4).

Con la Tierra de Diatomeas y el Caolín, se observó que con el volumen de 2 ml de aceite mineral se formó una masa que no pasó a través del tamiz. El primer volumen de agua de 2 ml fué suficiente para que se formará una masa uniforme (Tabla 4).

Con esto se concluyó que el talco tiene una capacidad menor para absorber el agua que la Tierra de Diatomeas y el Caolín. Con el aceite mineral sin embargo; las tres materias inertes presentaron un comportamiento semejante.

LA SUSPENSIBILIDAD.- Para el Talco fué de 77.8%, de 54.4% para el Caolín y 40.1% para Tierra de Diatomeas (Tabla 4).

Con el análisis de las características fisicoquímicas mostradas por los compuestos no resultó sencillo hacer la selección de cuales serían las mas adecuadas para el diseño de los formulados; pues se tendría que considerar el tipo de formulación requerida para los hábitos alimenticios específicos y el hábitat de los insectos de prueba que en este caso fueron *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* primordialmente. Las larvas de *Aedes aegypti* se alimentan de organismos y partículas sólidas que se encuentran en el fondo del recipiente que los contienen y las larvas de *Culex quinquefasciatus* se alimentan en la interfase.

Angus y Luthy (1971), enlistaron una serie de compuestos que pueden ser usados como portadores ó Materia Inerte para preparar en forma específica polvos humectables; atapulgita, pirofilita, tierra de diatomeas, caolín, talco. Este dato fué la base principal de la primera selección.

Se eligió como Materia Inerte para hacer nuestras formulaciones con *B.t.i.* a Tierra de Diatomeas y Talco pues aún cuando ninguna reunió las características ideales en un 100%; se presentaron cuando menos 1 ó 2 que podían ser considerados a favor de la selección.

El pH fué mayor para tierra de ditomeas de 9.4 con respecto al del talco que fué de 8.4; el pH alto en la Materia Inerte puede ser considerado como inadecuado pues puede causar la hidrólisis del principio activo.

El Tamaño de Partículas expresada en porciento de rechazo,

se refiere a la proporción de partículas que lograron pasar a través de una malla de 44 μ m de apertura (Tamiz # 325); el talco presentó un cero por ciento de rechazo lo que nos indicó que el tamaño de la partícula es menor a 44 μ m; la tierra de diatomeas presentó 15% de rechazo lo que indica que el tamaño de partícula es mayor que la del talco. Esta característica es muy importante para los polvos humectables ya que se prefiere que las partículas sean menor de 44 μ m. pues entre más fino es el polvo, presentará mayor dispersión y cobertura, Barberá (1976).

Capacidad de Absorción de Líquidos, se expresa en por ciento de rechazo. Esta capacidad de absorción se define como cierta cantidad de líquido que puede ser absorbida por la materia inerte sin perder sus cualidades de polvo fino fluyente y fácilmente dispersable, esto indica que el formulado presentaría apelmamientos difíciles de vencer cuando la capacidad de absorción de líquidos fuera menor. Por la técnica descrita por Barberá (1976) y donde se usa el aceite mineral, señala que hay materias inertes que absorben hasta cinco veces su peso.

Con respecto a la suspensibilidad; que se expresó en por ciento; el talco presentó el mayor por ciento de suspensibilidad fué del 77.8% y la tierra de diatomeas fué de 40.4%. Barberá (1976); cita que esta característica es de gran importancia para los polvos humectables ya que la idea es que las partículas del polvo e ingrediente activo se mantengan en suspensión en el agua el mayor tiempo posible para que las

larvas tengan más oportunidad de ingerir el tóxico.

Esta característica se asocia directamente al comportamiento de los formulados al momento de hacer la aplicación, con el equipo convencional, por ejemplo una máquina de mochila, cuando la suspensibilidad es menor el ingrediente activo se puede precipitar al fondo de la mochila y lo que se aplica sea únicamente diluyente secundario que generalmente es agua.

2.- PREPARACION Y EVALUACION DE LOS FORMULADOS EN LABORATORIO.

a) MATERIA INERTE 50% - INGREDIENTE ACTIVO 50%.

La Tabla 5 presenta los resultados de la primera fase del formulado que fué hacer mezclas del Ingrediente Activo (*B.t.i.*) con las Materias Inertes (Talco y Tierra de Diatomeas) y evaluar la actividad a través de bioensayo. Como resultado de la primera mezcla que fué de 50% de Ingrediente Activo y 50% de Materia Inerte; se obtuvieron los siguientes datos: La respuesta de las larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* el formulado hecho con 50% talco y 50% de Ingrediente activo fué de $LC_{50} = 0.037$ mg/l y una potencia de 4,054 UTI/mg.

En la Tabla 6 se resume los resultados de la misma especie expuesta al formulado donde el soporte fué Tierra de diatomeas se resumen: $LC_{50} = 0.051$ mg/l con 50% del soporte y 50% de *B.t.i.* La potencia para esta proporción fué de 2,941 UTI/mg.

La respuesta de *Ae. aegypti* a la mezcla de 50% de Tierra de Diatomeas y 50% de Ingrediente Activo (B.t.i.), se presenta en la Tabla 7: La LC_{50} 0.030 mg/l la potencia obtenida fué de 5,093 UTI/mg.

Tabla 8 resume la respuesta de esta misma especie que fué ensayada con la mezcla de 50% de Talco y 50% de Ingrediente Activo (B.t.i.); La LC_{50} fué de 0.065 mg/l y la potencia de 2,483 UTI/mg.

b).- MATERIA INERTE 70% - INGREDIENTE ACTIVO (B.t.i.) 30%

En la Tabla 9 se presenta la actividad tóxica en las larvas de *Aedes aegypti* del tercer estadio con 70% de Talco y 30% de Ingrediente Activo fué de $LC_{50} = 0.072$ mg/l, la potencia en unidades tóxicas fué de: 2,128 UTI/mg.

En la Tabla 10 se resume el resultado del formulado en la misma proporción pero usando Tierra de Diatomeas como Materia Inerte se tuvo el siguiente resultado: $LC_{50} = 0.149$ mg/l., la potencia que correspondió fué de: 1,006 UTI/mg.

Culex quinquefasciatus mostró la siguiente respuesta cuando se hizo bioensayo con la proporción de 70% de Talco y 30% de Ingrediente Activo: LC_{50} fué de 0.382 mg/l; la potencia de 471.0 UTI/mg (Tabla 11).

La actividad del formulado con 70% de Tierra de Diatomeas y 30% de Ingrediente Activo fué de: $LC_{50} = 0.430$ mg/l la potencia fué de: 346 UTI/mg (Tabla 12).

c) MATERIA INERTE 90% - INGREDIENTE ACTIVO (B.t.i.) 10%

Aedes aegypti la respuesta de las larvas expuestas al formulado preparado con 90% de Talco y 10% de B.t.i. fué de: $LC_{50} = 0.433$ mg/l la potencia obtenida fué de 346 UTI/mg (Tabla 13).

En la Tabla 14 se presenta la respuesta de larvas de *Aedes aegypti* expuestas al formulado con 90% de Tierra de Diatomeas y 10% de B.t.i. fué de: $LC_{50} = 3.42$ mg/l la potencia de 43 UTI/mg.

Culex quinquefasciatus al ser expuesto al formulado preparado con Tierra de Diatomeas (90%) y 10% de B.t.i. se obtuvo una respuesta: $LC_{50} = 0.733$ mg/l y una potencia de 245 UTI/mg (Tabla 15).

La Tabla 16 resume la respuesta de la misma especie expuesta al formulado con 90% de Talco y 10% de B.t.i. dió la siguiente respuesta: $LC_{50} = 4.54$ mg/l la potencia correspondiente fué de: 33.0 UTI/mg.

d).- MATERIA INERTE 95% - INGREDIENTE ACTIVO (B.t.i.) 5%

Aedes aegypti fué expuesto a un formulado preparado con 95% de Talco y 5% de B.t.i.; la LC_{50} fué de: 6.89 mg/l la potencia obtenida fué de: 21.62 UTI/mg (Tabla 17).

La respuesta de las larvas expuestas a 95% de Tierra de Diatomeas y 5% de B.t.i. fué de: $LC_{50} = 75.21$ mg/l la potencia fué de 1.98 UTI/mg (Tabla 18)

Culex quinquefasciatus respondió al formulado con la proporción de 95% de Talco y 5% de B.t.i. con una $LC_{50} = 26.15$

mg/l la potencia correspondiente fué de 5.69 UTI/mg estos resultados se presentan en la Tabla 19.

La Tabla 20 presenta la respuesta al formulado preparado con 95% de Tierra de Diatomeas y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.) al ser probado en *Cx. quinquefasciatus* se obtuvo una $LC_{50} = 7.35$ y una potencia de 20.27 UTI/mg.

e).- MATERIA INERTE 99% - INGREDIENTE ACTIVO (B.t.i.) 1%

La Tabla 21 resume la respuesta de *Aedes aegypti* cuando se ensayaron larvas del 3er. estadio de esta especie con el formulado que se preparó con 99% de Talco y 1% de Ingrediente Activo se observó la siguiente respuesta: $LC_{50} = 29.58$ mg/l la potencia correspondió a 5.03 UTI/mg. En la Tabla 22 se presenta la respuesta con 99% de Tierra de Diatomeas y 1% de B.t.i. la respuesta fué de: $LC_{50} 101.36$ mg/l la potencia obtenida fué de: 1.47 mg/l.

En la Tabla 23 se observa la respuesta de *Culex quinquefasciatus*, a 99% de talco y 1% de B.t.i. fué: $LC_{50} 44.34$ mg/l la potencia de 3.36 UTI/mg.

Cx. quinquefasciatus con la proporción de 99% Tierra de Diatomeas y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) se obtuvo una $LC_{50} = 44.87$ la potencia fué de 3.32 UTI/mg, Tabla 24.

El formulado comercial Bactimos se evaluó en larvas del 3er. estadio de las especies de prueba: *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* con la idea de usarlo como referencia ya que es un formulado en presentación de Polvo Humectable. Los

resultados de los Bioensayos se resumen en las Tablas 25, 26. La potencia obtenida en *Culex quinquefasciatus* fué de 993.3 UTI/mg. y la potencia obtenida para *Aedes aegypti* fué 2,980 UTI/mg.

Con los resultados obtenidos de las evaluaciones de los formulados preparados con distintas proporciones de Materia Inerte e Ingrediente Activo; se seleccionaron las proporciones de 50% y 50% del soporte y de B.t.i. de ambas especies para probar con larvas de campo de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. A estos formulados se le adicionó el Coadyuvante (Tritón X-114) en una sola proporción que fué de 1%. Los resultados obtenidos con el formulado preparado con Talco-B.t.i.-Tritón (5:5:1) en larvas de *Cx. quinquefasciatus* se resumen en la Tabla 27. La potencia obtenida fué de 4,806 UTI/mg. Con el formulado preparado con Tierra de Diatomeas B.t.i.-Tritón (5:5:1) esta misma especie presentó una potencia de 7,717 UTI/mg, Tabla 28.

La potencia obtenida en larvas de *Ae. aegypti* provenientes del campo y expuestas al formulado de Tierra de Diatomeas-B.t.i.-Tritón (5:5:1) fué 2,272 UTI/mg Tabla 29 y con el formulado preparado en la misma proporción que el anterior pero usando Talco como Materia Inerte la potencia fué de 1,910 UTI/mg, Tabla 30.

En las Tablas 31 y 32 se presenta la respuesta de las larvas provenientes del campo que fueron evaluadas con el formulado Bactimos; la respuesta de *Cx. quinquefasciatus* fué

una LC_{50} de 0.01 y la potencia de 14,900 UTI/mg. *Aedes aegypti* mostró una potencia de 3,725 UTI/mg con una LC_{50} de 0.04.

La actividad tóxica de los formulados preparados y evaluados en larvas del tercer estadio de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* de insectario, estuvo en función de la potencia respectiva; a menor concentración letal 50 correspondió mayor potencia y mejor actividad tóxica para ambas especies de mosquitos.

En la formulación se usaron dos tipos de materia inerte; Tierra de Diatomeas y Talco, estas dos sustancias se mezclaron con el ingrediente activo de B.t.i. en proporciones que fueron desde el 50% al 99% y con las respectivas proporciones de ingrediente activo que fluctuó desde el 1% al 50%. Estos productos usados como materia inerte son recomendados en la preparación de formulados de tipo Polvo Humectables; ya que estos son polvos de gran volumen y baja densidad aparente, Primo Yufera y Carrasco (1976); Matthews (1987).

La Tabla 7 y 8 presentan la respuesta de la proporción de materia inerte, que presentó mayor potencia en ambas especies de mosquitos: fué la del 50% y 50% de B.t.i.. La potencia en *Ae. aegypti* con Tierra de Diatomeas y Talco fué de 5093 UTI/mg y de 2483 UTI/mg respectivamente.

Esta misma proporción en *Cx. quinquefasciatus* la potencia con Tierra de Diatomeas fué de 2941 UTI/mg y con Talco de 4054 UTI/mg lo cual puede verse en las Tablas 5 y 6.

En la Tabla 33 se presenta una lista de las compañías

formuladoras de *B.t.i.* que producen tipos de formulados que varía en proporción de la materia inerte e ingrediente activo y en la presentación del producto. Compañías como Novo Nordisk, Biochem Products, tienen en el mercado tres presentaciones de formulados: gránulos, peletts y polvo humectable; esta última presentación viene en una proporción de 50% de materia inerte lo cual coincide con la de los formulados preparados localmente y que presentaron una potencia en UTI/mg que va desde 2483 UTI/mg - 5093 UTI/mg la menor y mayor potencia respectivamente, que varía con la materia inerte y la especie de prueba, Matthews (1987). Cabe aclarar que las UTI/mg que las compañías agregan es determinada en el laboratorio usando larvas de *Ae. aegypti*.

La Potencia de los formulados diseñados con proporciones del 30, 10, 5 y 1% de Ingrediente Activo; tanto para los que se formularon con Tierra de Diatomeas como con Talco; fué disminuyendo drásticamente conforme fué bajando la proporción del Ingrediente Activo. En las Tablas 34 y 35 se resume la potencia de los formulados preparados y puede observarse que de la proporción del 50% a la del 1% de Materia Inerte la potencia que en Tierra de Diatomeas para *Ae. aegypti* fué de 5,093 UTI/mg a la obtenida con el 99% fué 1.47 UTI/mg. Este último resultado representa solo 0.02% de la potencia del formulado preparado con el 50% de Materia Inerte e Ingrediente Activo respectivamente. Esto mismo se observó en *Culex quinquefasciatus* donde el formulado con 50% de Tierra de

Diatomeas la potencia fué de 2,941 UTI/mg y el formulado con 99% de Materia Inerte y 1% de B.t.i. la potencia fué de 3.32 UTI/mg. Esta última potencia representa el 0.11% de la obtenida con el 50% y 50% de Materia Inerte e Ingrediente Activo respectivamente.

Esta diferencia en potencia se atribuye a la proporción del Ingrediente Activo en función de la Materia Inerte: Talco y Tierra de Diatomeas; pues al formular con proporciones mayores del 50% de Materia Inerte el Ingrediente Activo practicamente se "perdía" en el soporte pues estos son productos de alto volumen y de baja densidad. Se considera que otras de las razones en la pérdida de actividad de los formulados fué la deficiencia en la preparación de las mezclas de los formulados ya que estas se hicieron manualmente.

3.- EVALUACION DE LOS FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis israelensis* EN CAMPO.

a) EVALUACION EN *Aedes aegypti*.

Area de Evaluación: Panteón Jardín Español, Gpe., N.L. Junio de 1992.

Formulados Evaluados: Tierra de Diatomeas, B.t.i., Tritón X-114 (5:5:1); Bactimos.

Dosis Aplicadas: Tierra de Diatomeas-B.t.i.-Tritón: 0.136 mg/l; 0.272 mg/l; 0.408 mg/l.

Bactimos: 0.086 mg/l; 0.172 mg/l; 0.258 mg/l

Volumen de agua en los Floreros: 11 Litros.

Características del área de Evaluación: Area sombreada parcial, temperatura ambiente 32°C, nublado. La aplicación de los formulados se llevó a cabo de inmediato después de tomar la densidad pretratamiento, con un cucharón de uso doméstico con capacidad para 100 ml de agua; en cada florero se tomaron 3 caladas ó inmersiones del cucharón. La evaluación se llevó a cabo en Junio de 1992 después de las lluvias registradas a finales del mes de Mayo y que permitieron que los floreros se llenaran con agua y se iniciara la eclosión de los huevecillos que estaban en diapausa. Antes de la aplicación se había estado observando la presencia de larvas en los floreros y se colectó material suficiente para hacer las pruebas en laboratorio.

Los resultados de las evaluaciones de los formulados probados en larvas de *Aedes aegypti* del panteón en el laboratorio se presentan en la Tabla 29. La LC_{50} para el formulado preparado con T. Diatomeas-B.t.i.-Tritón (5:5:1) fué de 0.068; la potencia de 2,272 UTI/mg con el dato de la LC_{50} se determinó la dosis de aplicación en campo siendo estas: 0.136; 0.272; 0.408 mg/l correspondiendo la LC_{100} una vez, dos veces y tres veces respectivamente. Los resultados obtenidos se concentran en el Tabla 36; donde se representan las dosis del formulado de diseño local. La densidad pretratamiento fué de 2.75, 1.75 y de 1.0 en promedio de larvas para las tres dosis en orden creciente respectivamente. Los testigos con una densidad pretratamiento de 4.0 larvas en promedio.

La Tabla 32 y 36 presenta los resultados del formulado Bactimos la $LC_{50} = 0.04$ y la potencia de 3,725 UTI/mg (Tabla 32); las dosis del Bactimos fueron: 0.086 mg/l; 0.172 mg/l y 0.258 mg/l para este formulado la densidad larvaria pretratamiento fué de: 4.25; 1.5; y 2.0 larvas en promedio respectivamente. El testigo con una densidad larvaria promedio de: 1.25.

La densidad postratamiento a las 24 hs. para el formulado de diseño local y para las dosis en orden creciente fué de: 0.25; 0 y 0 de densidad larvaria promedio respectivamente. Para los testigos de este formulado la densidad larvaria promedio fué de: 5.

La densidad postratamiento registradas para las dosis del Bactimos fueron: 0 larvas para las tres dosis usadas; el testigo tuvo una densidad promedio larvaria de dos larvas.

En la misma Tabla 36 se observa el porcentaje de reducci3n larvaria que se expres3 por la diferencia entre las dos densidades pre y postratamiento; para el formulado de dise1o local en las dosis de: 0.136 mg/l fué de 90.9%. En la dosis 0.272 mg/l fué de 100% y para la dosis 0.408 mg/l fué de 100%

La reducci3n larvaria para el Bactimos fué del 100% para las tres dosis.

Los testigos de ambos formulados no presentaron reducci3n en la densidad de las larva.

Como puede observarse la aplicaci3n de los 2 formulados result3 efectivo para el control de larvas de *Aedes aegypti* en

floreros en cementerios.

Aedes aegypti ha sido usado como la especie de mosquito de referencia para evaluar en Laboratorio polvos primarios y formulaciones comerciales; sin embargo la evaluación de estos productos en campo no se hace en *Aedes aegypti*; posiblemente esto se deba al tipo de habitats que ocupa la especie; que son contenedores de agua de tamaño variado como cubetas, piletas, floreros, tanques, llantas; lo que dificulta una evaluación.

Los resultados de Actividad Tóxica de los formulados en *Aedes aegypti* pueden ser comparados con los resultados obtenidos por Molloy *et al* (1984) cuando determinó la potencia de 3 formulados comerciales: 2 en forma de Polvo Humectable Bactimos y Vectobac y un concentrado dispersable en agua Teknar. La potencia en *Ae. aegypti* fué de 3556 UTI/mg, 2317 UTI/mg y 1373 UTI/mg respectivamente. La Potencia del formulado experimental de diseño local fué semejante a lo de Vectobac y la potencia del formulado Bactimos probado localmente fué de 3,725 UTI/mg y el comercial fué de 3556 UTI/mg.

En otro trabajo que realizó con 2 formulaciones comerciales en líquido: SAN 402 SC 98 (Lote B.t.i.- 184 - P2) de Sandoz y ABG - 6188 (Lote 87-038-BA) de Laboratorios Abbott; las larvas probadas de colonias de laboratorio de *Ae. aegypti* duran una LC de 0.039 y 0.275 a las 24 horas con los formulados de Sandoz y Abbott respectivamente. Estos valores se comparan con el obtenido con el formulado Bactimos evaluado en *Aedes aegypti* provenientes de campo; la LC_{50} del Bactimos fué de 0.04

y la del formulado de Sondoz (SAN 402 SC 98) fué de 0.039. Como se puede ver las LC_{50} son casi semejantes.

b) EVALUACION EN *Culex quinquefasciatus*.

Area de Evaluación: Río Pesquería, Pesquería, N.L. Septiembre de 1992.

Formulados probados: Tierra de Diatomeas-B.t.i.-Tritón X-114 (5:5:1):0.11 mg/l; 0.22 mg/l; 0.33 mg/l Bactimos:0.12 mg/l; 0.24mg/l y 0.36 mg/l.

Características del área de Evaluación: Charcas de forma regular de 1 metro cuadrado, con una profundidad promedio de 20 cm con fondo lodoso y con exposición al sol.

Antes de la evaluación de los formulados en campo se llevó a cabo bioensayos en el laboratorio con larvas provenientes del área de aplicación en campo con los formulados: Talco-B.t.i.-Tritón (5:5:1); Tierra de Diatomeas-B.t.i.-Tritón (5:5:1) con los resultados preliminares se seleccionó el formulado de diseño local formado por Tierra de Diatomeas-B.t.i.-Tritón (5:5:1). Esta prueba se resume en la Tabla 28. La $LC_{50} = 0.020$ La potencia fué de 7,717 UTI/mg. La LC_{100} de 0.055 fué la base para las dosis de aplicación en campo. Cabe hacer la aclaración que en esta evaluación con *Culex quinquefasciatus* se usaron el doble de las dosis debido a que el agua era turbia y de color obscuro con partículas suspendidas que indicaban un alto grado de contaminación. Por lo tanto las dosis para el formulado de diseño local fueron: 0.11 mg/l; 0.22 mg/l y 0.33 mg/l cada

charca presentó un volumen de agua aproximado de 200 l de manera que la cantidad aplicada estuvo en función de este volumen.

En la Tabla 37 se observan las dosis para el Bactimos; la LC_{100} fué de: 0.06 mg/l y las dosis empleadas en campo fueron 0.12 mg/l; 0.24 mg/l y 0.36 mg/l correspondiendo para las charcas con 200 l de agua: 24 mg; 48 mg y 72 mg para las dosis 1, 2 y 3 respectivamente.

Las densidades pretratamiento en las dosis 1 del formulado de diseño local fué de 120 larvas y de 29 larvas 24 horas después de la aplicación; el porcentaje de reducción larvaria fué de 76%. La dosis 2 con una reducción larvaria del 80% y la dosis 3 con una reducción larvaria de 82%

El Bactimos mostró una reducción larvaria de 93.7%, 95.5% y 100% con las dosis 1, 2 y 3 respectivamente.

La actividad de los formulados fué mayor para el Bactimos que para el formulado de diseño local; aún cuando se consideró agregar una cantidad del doble de las dosis que correspondían a la LC_{100} . Esto se atribuyó a la contaminación del agua donde se aplicó; Mulla et al (1982) realizaron una prueba con el formulado Bactimos (3,500 UTI/mg) en agua limpia y en agua contaminada y observó que a la concentración de 0.250 mg/l la mortalidad fué de 95% en agua limpia y 0% en agua contaminada. El mismo autor probó varios formulados de *B.t.i.* en *Culex quinquefasciatus* en una laguna con agua contaminada con desechos de una lechería en California; observó que la

formulación de Bactimos a razón de 1 kg/ha causó el 81% de reducción larvaria y con 2 kg/ha del 99% de reducción larvaria. Con otro formulado granulado (ABG-6108), con la dosis de 4 kg/ha la reducción larvaria fué de 82% en la misma especie.

Estos mismos resultados obtenidos fueron comparados con los logrados por Masori y Ali (1984) en evaluaciones en laboratorio y campo con formulaciones comerciales de B.t.i. en algunas especies de mosquitos del Centro de Italia; ellos probaron dos formulaciones en forma de polvos humectables (Bactimos y Vectobac) un concentrado emulsionable (Teknar) en *Culex pipiens*, *Aedes caspius* y *Aedes dentritus*.

La LC_{50} en *Cx. pipiens* de insectario fué de 0.024 la $LC_{90} = 0.088$ al Bactimos. La LC_{50} para larvas de campo para el mismo formulado Bactimos fué de 0.012 y la LC_{90} de 0.042.

En la evaluación en campo se hizo en canales de irrigación de 0.5 km de área y se usó una sola dosis de 0.5 kg/ha el porcentaje de Reducción larvaria fué del 98%.

c) EVALUACION EN *Psorophora ciliata*.

Area de Evaluación: Charcas temporales de agua de lluvia. Carretera Monterrey-Colombia Km 16. Septiembre de 1992.

Formulados probados: Talco-B.t.i.-Tritón X-114 (5:5:1).

Dosis aplicadas: 0.12 mg/l; 0.24 mg/l; 0.36 mg/l.

Características del area de evaluación: Charcas con arreglo regular de 1 metro cuadrado con 17 cm de profundidad en promedio con vegetación emergente y circundante con sombreado

parcial y apariencia del agua cristalina.

Estos criaderos se localizaron en la Carretera Monterrey-Colombia a la altura del km 16 que corresponde al Municipio de Salinas Victoria, N.L. Las charcas se ubicaron a 20 metros aproximadamente al Oeste de la carretera, donde se acumula el agua de lluvia por un declive en el terreno que conduce a un pequeño vado. La prevalencia de estas charcas por observaciones previas no era mayor a 15 días, y la aparición de las primeras larvas era de 2 a 3 días de formadas las charcas. Las evaluaciones en campo se hicieron primeramente con material biológico en el laboratorio el cual se obtuvo en la primera lluvia del mes de Mayo. De manera que la aplicación del formulado en campo se hizo hasta que hubo otra precipitación en el mes de Septiembre. Las pruebas en el laboratorio se dificultaron debido a que esta especie como la mayoría del género *Psorophora* exhibe un canibalismo muy marcado, de tal manera que solo se hizo un bioensayo y usando 90 larvas por dosis.

Las dosis que se usaron fueron de: 0.02 mg/l y de 0.14 mg/l como mínima y máxima respectivamente. La LC_{50} obtenida fue de: 0.05 y la LC_{90} de 0.11; la potencia fue de 2,921 UTI/mg (Tabla 38). La base para las dosis de aplicación de campo fue de: LC_{100} 0.12 mg/l como dosis 1; 0.24 mg/l dosis 2 y 0.36 mg/l como dosis 3 lo que correspondió por dosis por charca: 24 mg, 48 mg y 72 mg respectivamente.

En la Tabla 39 se resume la densidad larvaria promedio

pretratamiento en la dosis 1 que fué de 24 y la densidad postratamiento fué de 5 larvas. El porcentaje de reducción larvaria fué de: 79.16%

Con la dosis 2 la densidad larvaria pretratamiento fué de: 34 en promedio y la postratamiento fué de 2 larvas. La reducción larvaria fué de 94.11%

En la dosis 3 hubo una densidad larvaria pretratamiento de 74 en promedio y de 7 larvas en postratamiento. La reducción larvaria fué de 90.54%

El testigo mostró una densidad pretratamiento de 22 larvas y de 33 en postratamiento lo que indicó que no hubo reducción como era de esperarse.

Los resultados muestran que el formulado de diseño local preparado con Talco-B.t.i.-Tritón en la proporción (5:5:1) es efectivo para el control de larvas de *P. ciliata* que se localizan en charcas temporales. Las especies del género *Psorophora* son consideradas como verdaderas plagas en cultivos de arroz, han estado sujetas a aplicaciones con insecticidas químicos, reguladores de crecimiento y formulados comerciales de B.t.i. para su control. Los formulados comerciales que se recomiendan son del tipo de los granulados como Vectobac, que es un producto que puede aplicarse a habitats donde hay vegetación y el Ingrediente Activo se va liberando poco a poco. Nuestro resultado con esta especie se comparó con una evaluación hecha por Hembree et al (1980) en *P. columbia* donde se usaron 9 lotes de prueba de 550 cm cuadrados cada 3 lotes

con una dosis de 0.44 ppm; 3 lotes con 0.88 ppm y 1 lote con 8.0 ppm de una formulación experimental de *B.thuringiensis israelensis* en forma de Polvo Humectable (Lote N°. 6406-125) proporcionado por Labs. Abbott. Estos lotes de prueba se localizaron en un cultivo de arroz con plantas creciendo a una altura de 25 cm. La profundidad de las charcas fué de 10 cm. El volumen de agua en cada lote fué de 5220 litros. Se observó la mortalidad a las 24 hs y se obtuvo una mortalidad de 61.5%, 95.0% y del 100% en las tres dosis (0.44 ppm, 0.88 y 8.0 ppm) respectivamente. Las dosis usadas en este trabajo fueron el doble de las usadas para el formulado de diseño local evaluado; que fueron 0.12 mg/l; 0.24 mg/l y 0.36 mg/l; 1,2 y 3 dosis respectivamente.

Para el caso particular de charcas temporales cercanas a las areas urbanas se puede aplicar cualquier producto a base de *B.t.i.* pues no existe el problema de persistencia ya que solamente se registra una generación por inundación.

CONCLUSIONES

Bacillus thuringiensis israelensis ha sido comercializado desde 1980. Sin embargo, su uso está limitado en los países en desarrollo. En el país se encuentran varios centros de investigación sobre biotecnología de insecticidas microbianos, con interés en implementar la producción de estos productos para reducir el uso excesivo e irracional de insecticidas químicos, Medrano y Galán (1993).

En la Institución un grupo de investigación ha venido trabajando desde hace más de 10 años en la búsqueda de cepas nativas de *B.t.i.* con actividad tóxica para las principales plagas de interés económico y médico. En el ámbito de la Entomología Económica se ha logrado el aislamiento de dos cepas de *B. thuringiensis* denominadas GM-7 y GM-10, las dos pertenecientes a la variedad *aizawai*, estas presentan hasta 20 veces más toxicidad contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz); que la cepa de *B. thuringiensis* (HD-1) *kurstaki*, Galán (1993). Sin embargo esta es la primera experiencia de nuestro grupo con *B.t.i.* en producción y evaluación en campo.

En el renglón de Entomología Médica además de 150 cepas nativas de *B. thuringiensis* pertenecientes a diferentes serovariedades, se han reunido 30 cepas de *B. sphaericus*, de estas cepas algunas han reportado actividad tóxica para larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*, sin que su potencia iguale o supere a *B.t.i.* o las cepas de *B. sphaericus* 1593 y

2363 consideradas como las más tóxicas.

La producción, y evaluación de bioinsecticidas microbianos es una parte fundamental del desarrollo biotecnológico que en la Facultad de Ciencias Biológicas ha alcanzado un gran avance. Se han realizado investigaciones a nivel experimental donde se han usado diferentes medios de obtención para las cepas nativas como GM-7 y GM-10 así como, con la cepa *B. thuringiensis israelensis*, así como su escalamiento a nivel de fermentadores de 130 y 800 l de capacidad total, Galán (1993).

Más recientemente, en 1993 se ha probado el crecimiento de *B.t.i.* en subproductos de industrias alimenticias locales como: pasta en polvo, líquido de remojo de maíz, jugo de agave, melaza, Maldonado (Comunicación personal).

Los resultados aportados son alentadores lo que pone de manifiesto que esta área puede ser óptimamente aprovechada; ensayando con otros subproductos como: harina de pescado, leche en polvo, sangre y suero animal, harina de hueso, entre otros. Esto daría como resultado un producto microbiano de calidad y económico que puede ser usado en el Manejo Integrado de Plagas.

La formulación y evaluación en laboratorio y campo, está limitada por el hecho de que las compañías formuladoras por proteger sus patentes no publican los tipos de materias inertes y coadyuvantes que proporcionan las características ideales de un formulado.

Los polvos humectables que fué el tipo de formulado diseñado localmente, son particularmente fáciles de preparar;

el soporte o materia inerte es de bajo costo. La evaluación en laboratorio y campo de productos formulados, es un proceso que incluye metodologías estandarizadas. La cría de insectos de prueba como: *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* para la obtención de las larvas que se usan en los bioensayos es sencillo y económico, Rodríguez et al (1993).

Entre las principales aportaciones del presente trabajo estan: Se establecieron las metodologías para diseñar formulaciones experimentales en laboratorio y campo a base de B.t.i. producido localmente.

Se detectaron criaderos de mosquitos culícidos en varias localidades el estado incluyendo el área Metropolitana de Monterrey, se identificaron las especies y se determinó el tipo de criaderos de las especies más frecuentemente encontradas. *Cx. pipiens quinquefasciatus* fué la especie más frecuente, se le localizó en criaderos como arroyos, charcas y depósitos de agua como tanques, floreros y llantas. *Ae. aegypti* que al igual que la especie anterior se localizó en contenedores con agua como tanques, floreros y llantas. *P. ciliata* y *P. cyanescens* se encontraron en charcas temporales durante las épocas de lluvia de Mayo y Septiembre, Rodríguez et al (1991).

Los formulados experimentales se evaluaron en campo con las especies de mosquitos citados como las mas frecuentes: *Ae. aegypti* en floreros en cementerios; *Cx. pipiens quinquefasciatus* en el Río Pesquería y *P. ciliata* en charcas temporales.

El uso de formulaciones con *B.t.i.* para el control de mosquitos ó mosquitas negras, el cual es compatible con otros tipos de control; hay ejemplos de combinación de *B.t.i.* con un producto denominado Arosurf que tiene como función modificar la interfase fisicoquímica del aire-agua; esto se logra con una fina película que actúa contra las larvas y pupas de mosquitos.

La compañía Zoecon (Texas, EUA) sugiere el uso de aplicaciones mixtas de Altosid y Teknar HP-D. El Altosid es un regulador de crecimiento que actúa principalmente en los primeros estadíos larvarios y *B.t.i.* actúa además de los primeros estadíos sobre el cuarto donde Altosid no tiene efecto. Con respecto a la acción de los depredadores sobre larvas que han sido previamente tratadas con *B.t.* se obsevó que los depredadores disminuyen el tiempo de manipulación y aumenta la capacidad de búsqueda del depredador de las larvas, debido a que estas fueron más debiles por la acción de la toxina, Ortegón y Quiroz (1990).

El estado actual en el contro microbiano de insectos vectores de enfermedades, se centra en dos líneas principales: una es la búsqueda de nuevos aislados de microorganismos de criaderos naturales o de insectos; la otra línea es la manipulación génetica de microorganismos con actividad tóxica conocida.

Badii (1993), considera algunos factores que impulsan el aumento del uso de microorganismos patógenos en el futuro: a) Desarrollo de la resistencia de insectos plaga a productos

químicos. b) Contaminación del ambiente por el uso irracional de plaguicidas. c) Alto costo de plaguicidas selectivos. d) Desarrollo del concepto de Control Integrado que permite el uso de métodos múltiples de control.

Para llevar a cabo un Control Integrado efectivo es importante contar con un apoyo cultural y económico, principalmente en los países en desarrollo, de esta manera puede integrarse el control microbiano a los métodos tradicionales de manejo de plagas, que sin duda resultará más eficaz.

Los objetivos planteados al inicio del presente trabajo fueron cumplidos totalmente; la hipótesis se acepta, es decir los formulados diseñados y evaluados fueron efectivos para el control de las especies de mosquitos culícidos más comunes: *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

- 12.- Chilcott, C.N.; H. Barbara H.; D.J. Ellar Francis A. Drobniewski. 1990. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* Parasporal body. En: Bacterial Control of Mosquitoes & Black flies. De Barjac H. y Southerland (Eds) Rutgers University Press New Brunswick. pp 349.
- 13.- Cooksey, K.E., 1971. The protein cristal toxin of *Bacillus thuringiensis*. Biochemistry and Mode of Action. En: Microbial Control of Insects and Mites. Burges H. D., Hussey N. W. (Eds). Academic Press, London.
- 14.- De Bach P. 1985. Control Biológico de las plagas de Insectos y Malas Hierbas. Editorial Continental. S.A. Mexico. pp. 949
- 15.- Dejoux, C. 1979. Recherches Preliminaires concernant L'action de *Bacillus thuringiensis israelensis* De Barjac sur La Faune D'Invertebres D' un cours D' EAU Tropical. WHO/VBC/79.721.
- 16.- Dulmage, H.T. 1975. The standaritation of formularions of the delta endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* J. Invertebr. Pathol. 25: 279 - 281.
- 17.- Dulmage, H.T., J.A. Correa. 1990. Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development en: Bacterial control of mosquitoes & black flies. De Barjac, H. y D, Southerland (Eds). Rutgers University Press. pp. 349.
- 18.- Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge Univ. Press., Cambridge.
- 19.- Galán, Wong, L. J. 1993. Biotecnología para la producción de Bioinsecticidas Microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM. Escuela Nacional de Estudios Profesionales IZTACALCA. México. págs. 1-101.
- 20.- Galán, Wong, L.J. 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hubner) y *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis Doctoral. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.
- 21.- García, R. y Barbara Desrochers. 1979. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to some California mosquitoes under different conditions. Mosquito News. 30: 541-545.

- 22.- Garduño, E.; L. Thorne; A.M. Walfield, J. Pollock. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* applied and environmental Microbiology. 54: 277 - 279.
- 23.- Gharib, A. H.; W.L. Hilsenhoff. 1988. Efficacy of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against *Aedes vexans* and safety to nontarget macro in vertebrates. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 4: 252-255.
- 24.- Gill, S. S., Elizabeth A. Cowles, and Patricia V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annv. Rev. Entomol. 37: 615-636.
- 25.- Golberg L.J. Golberg E.M., and Joel Margalit. 1977. Potencial application of a bacterial spore. ONR-60A to mosquito larval Control: Demonstrated rapid larvicidal activity against. *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex unvitatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Complex). WHO VBC/77.
- 26.- Gómez, D.H. 1991. The Dengue Control Program in Mexico and perspectives for the future (Abstracts) en Mosquito Vector Control and biology in latin America A Simposium. Clark. G. y Suarez M. (Eds) J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 633-645.
- 27.- Guillet, P.; Escaffre H. 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac, pour la lutte les larves de *Simulium damnosum*. 1.1. Resultates de premiers Essais realises sur le terrain. Documente WHO/BVC/79.
- 28.- Hall, I.M. and Arakawa K.Y.; Dulmage H.T. y J. Corea. 1977. The pathogenecity of mosquitoes, Mosquito news. 37: 246 -251.
- 29.- Hall, I.M. y Arakawa K.Y, 1980. Development of a standar biossay method for determinig potency of comercial B.t.i. Mosquito Control Research. Annual Report. University of California, Riverside Ca. pp: 63 - 64.
- 30.- Herrera, Basto. E. Situación actual del Dengue en México. 1989. Memorias del IV Simposio de Entomología Médica y Veterinaria. 21-24 de Mayo. Oaxtepec, Morelos.
- 31.- Ignoffo, C.M., Couch T.I., García C. y M.S. Jrohan. 1981. Relative activity of B.t.i. and B.t.k. against larvae of *Ae. aegypti*, *Culex quiquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* y *H. virescens*. J. of Economic Entomol. 74: 218 - 221.

- 32.- Lacey, L. A., Marilyn J. Urbina y C.M. Heitzman. 1984. Sustained release formulations of *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis* (H-14) for control of container - breeding *Culex quinquefasciatus* Mosquito News 44: 26 - 32.
- 33.- Lacey, L. A., y C. M. Lacey. 1990. The Medical importance of Riceland Mosquitoes and their control using alternatives to chemical Insecticides. J. Am. Mosq. Control Assoc. 5: 1 - 93.
- 34.- Lebrum, P., Vlagen P. 1981. Estude de la bioativite comparee et deseffects secundaries de *Bacillus thuringiensis* H - 14. Sonderdruck aus Bd. 91 H.I.S. pp: 15 - 25.
- 35.- Levy, R., Powel C.M., Hertlein B.C. y T.W. Miller J.R. 1984. Efficacy Arosurf MSF (Monomolecular surface film) Base formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mixed populations of Mosquito larvae and pupae: Biossay and preliminar evaluations. Mosquito news 44: 537 - 543.
- 36.- Lord, J., 1988. Prospects for Extending the Residual Activity of Bacterial Larvicides for Mosquitoes. Programs and Abstracts XXI Annual Metting of Society for Invertebrate Pathology. University of California, San Diego.
- 37.- Lozano González I.E.; E., López Barbosa. 1992. Evaluación y Persistencia en *Bacillus sphaericus* (cepa 2362) contra larvas de *Culex quiquefasciatus* (Say) bajo condiciones de laboratorio en Morelia, Michoacán. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Entomología. Abril 1992. San Luis Potosí, S.L.P. pp. 144.
- 38.- Majori, Giacarlo; Arshad Ali y G. Sabatinelli. 1984. Laboratory and field efficacy of *B.t.i.* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* Ouagadougou, Burkina Fasso. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3: 20-25.
- 39.- Majori, G. and Arshad 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.
- 40.- Margalit, J. 1990. Discovery of *Bacillus thuringiensis israelensis* in Bacterial Control of Mosquitoes & black flies. De Barjac H., Southerland (Eds). Rutgers University Press. New Brunswick. pp. 349

- 41.- Mathews, G.A. 1987. Métodos para la aplicación de pesticidas. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México. pp. 365.
- 42.- Medrano, Roldan. H. y Galán W. L.J. 1993. Aspectos de Bioingeniería y biotecnología de bioinsecticidas. En: biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrado en *Bacillus thuringiensis*. Galán, Wong L.J. y Col. (Eds). Escuela Nacional de Estudios Superiores IZTACALCA. UNAM, México pp. 101.
- 43.- Merritt, R. W., Edward D. Walker, Margaret A., Wilzbach Kenneth W. Commins and William T. Morgan. 1989. A broad evaluation of *B.t.i.* for Black fly (Diptera: Simuliidae) Control in a Michigan river: Efficacy, carry and nontarget effects on invertebrate and fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5: 397-415.
- 44.- Molloy D., Wraight S.P., Kaplan B. Gerardi J. and Patricia Peterson 1984. Laboratory Evaluation of comercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito and black fly larvae *J. Agric. Entomol.* 1: 161 - 168.
- 45.- Molloy D. 1990. Progress in the Biological Control of Black flies with *Bacillus thuringiensis israelensis*, with emphasis on Temperate climates. In *Bacterial Control of Mosquitoes & Black flies*, De Barjac H, y Southerland (Eds.). Rutgers University Press. New Bronswick. pp. 349
- 46.- Mulla M.S., Hwang Y.S., Federici B.A., Schultz G.W. and Anderson K. 1980. Mosquito Control with *Bacillus thuringiensis*. Mosquito Control Research Annual Report. pp: 57-62.
- 47.- Mulla M.S. 1990. Activity field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes chapter 9 en *Bacterial Control of Mosquitoes Black flies*. H. Barjac; D. Southerland. Editors. Rutgers University Press. New Brunswick. pp. 349
- 48.- Mulla M.S. Federic B. Darwazih y Leslie Ede. 1982. Field evaluation of Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis* H-14 against floodwater Mosquitoes. *Applied and Enviromental Microbiology* 43: 1283 - 1293.
- 49.- Mullen, G.R. y Nancy C. Hinkle. 1988. Method for determing setting rates of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 formulations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4: 132 - 137.

- 50.- Ortegon, M.J.J., Quiroz, M.H. 1990. Efecto de la cepa GM-10 de *Bacillus thuringiensis* LC₅₀ en la capacidad depredadora de *Buenoa* sp. (Hemiptera:Notonectidae) sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *Folia Entomol. Mex.* 79: 197-206.
- 51.- Perich, M. J., J. T. Rogers y 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.
- 52.- Primo Yufera, E. y J.M. Carrasco Dorrien. 1976. Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores. Editorial Alhambra, S.A. España. pp. 639
- 53.- Rodcharoen J, 1988. Small - Scale field evaluation of comercial preparations of *Bacillus sphaericus* against mosquitoes in Thailand. Programs y Abstracts XXI Annual Meeting, University of California, San Diego et la Jolla.
- 54.- Rodríguez, M.H. y E.G. Loyola. 1989. Situación Epidemiológica actual y perspectivas de la Investigación Entomológica Médica y Veterinaria. XXIV Congreso Nacional de Entomología. Oaxtepec, Morelos.
- 55.- Rodríguez, T. M.L., L.H. Morales R., R. Torres, H. Quiroz y M. Culebro. 1991. Evaluación en laboratorio y campo de un formulado de *Bacillus thuringiensis israelensis* en larvas de *Culex* sp. *Southwestern Entomologist.* 16: 277-281.
- 56.- Rodríguez, T. M.L., R. Torres, H. Quiroz, A.P. 1988. Localización de criaderos de *Psorophora* (P.) *ciliata* y *P.* (Jonthinosoma) *cyanescens* (Diptera:Culicidae) al Oriente del área Metropolitana de Monterrey, Nuevo León. México. *Folia Entomol. Mex.* 76: 193-194.
- 57.- Romi, R., Bakoli Ravoniharimelina., Marcel Ramiakajato y Giancarlo Majori. 1993. Field trials of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus* (strain 2362) formulations against *Anopheles arabiensis* in the central Highlands of Madagascar *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5: 325-329.
- 58.- Sinegré G. Gaven b., Vigo G. 1981. Contribution a la normalization deséprueves de Laboratoire concertain des formulations experimentales et commerciales du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. II.- Influence de la température, du chore residual du pH et de la profondeur de Veau sur activité biologique d' une poudre primaire. *Cach Orstom. Ser Ent. Med. el Parasitol.* XIX: 149 - 155.

- 59.- Service M.W. 1976. Mosquito Ecology. Field Sampling Methods, Wiley & Sons. N.Y. pp: 43-120.
- 60.- Steinhaus, E.A. 1985. Enfermedades Microbianas de los Insectos. En: Control Biológico de las plagas de Insectos y Malas Hierbas. De Bach P. (Ed). Editorial Continental. pp. 949.
- 61.- Vandekar, M., Dulmage, H. T., 1982. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 UNDP/WORD BANK/WHO pp. 124.
- 62.- Van Essen, F. W. y Stephen C. Hembree. 1980. Laboratory Bioassay of *Bacillus thuringiensis israelensis* against all instars of *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorynchus* larvae. Mosquito News. 40: 424-431.
- 63.- Van Essen, F.W. and Stephen C. Hembree. 1982. Simulated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, against mosquitoes. Mosquito News. 42: 66 - 72.
- 64.- WHO. 1982. Data Sheet on the Biological Agent. Information Document-produced by the WHO Division of Vector Biology and Control. WHO/VBC/79 750 and VBC/BCDS/79.01. Geneva Switzerland pp. 23
- 65.- Weiser J. 1991. Testing of activity of isolates. Chapter 13 en Biological Control of Vectors, J. Weiser (Ed.) John Wiley & Sons. pp. 89
- 66.- Zaritsky, A. and Khawaled Kamal. 1986. Toxicity in carcasses of *B.t.i.* killed *Aegypti aegypti* larvae against scavenging larvae: implicarions to bioassay. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2: 555-558.
- 67.- Zaritsky, A., Kamal K. and Rabi Tavassa. 1986. Biological Control of Monsquitoes by activity of delta endotoxin. Acta Microbiological Polonica 35: 207-214.
- 68.- Zar. J.R. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice Hall Inc. N.J. pp. 620.

TABLA 1

Actividad del Ingrediente Activo de *Bacillus thuringiensis israelensis* en *Aedes aegypti* en condiciones de Laboratorio.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.02	17	0.049	0.122	3,061
0.04	45			
0.06	56			
0.08	65			
0.10	85			
0.12	95			
0.14	98			

TABLA 2

Actividad del Estandar Internacional (IPS-82) de *Bacillus thuringiensis israelensis*, en larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de Laboratorio.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.005	24.6	0.012	0.032	15,000
0.008	30.0			
0.01	39.6			
0.02	79.6			
0.03	81.0			
0.04	99.3			

TABLA 3

Actividad del Ingrediente Activo de *Bacillus thuringiensis israelensis* en *Culex quinquefasciatus* en condiciones de Laboratorio.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.01	6.5	0.045	0.084	3,333.3
0.02	13.7			
0.03	20.0			
0.04	43.7			
0.05	52.5			
0.06	83.7			

TABLA 4

Características fisicoquímicas determinadas a 3 candidatos de Materia Inerte (talco, caolín, tierra de diatomeas) para la formulación de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS	M A T E R I A I N E R T E		
	TALCO	CAOLIN	TIERRA DE DIATOMEAS
pH	8.4	7.5	9.4
Tamaño de Partículas (% Rechazo)	0%	10%	15%
Capacidad de Absorción de Líquidos (% Rechazo)	a) 0% b) 70%	0% 0%	0% 0%
Suspensibilidad	77.8%	54.4%	40.4%

a) Aceite

b) Agua

TABLA 5

Actividad del formulado preparado con 50% de Ingrediente Activo (B.t.i.) y 50% de Materia Inerte (Talco) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mq/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mq/l	LC ₉₀ mq/l	POTENCIA UTI/mq
0.01	15.00	0.037	0.158	4,054
0.02	26.25			
0.03	42.50			
0.04	57.50			
0.05	45.00			
0.06	78.75			

TABLA 6

Actividad del formulado preparado con 50% de Ingrediente Activo (B.t.i.) y 50% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mq/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mq/l	LC ₉₀ mq/l	POTENCIA UTI/mq
0.01	6.5	0.051	0.151	2,941
0.02	12.5			
0.03	21.2			
0.04	27.5			
0.05	36.2			
0.06	80.0			

TABLA 7

Actividad del formulado de *Bacillus thuringiensis israelensis* preparado con 50% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 50% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.02	33.3	0.030	0.058	5,093
0.04	75.0			
0.06	88.3			
0.08	96.6			
0.10	100.0			

TABLA 8

Actividad del formulado preparado con 50% de Ingrediente Activo (B.t.i.) y 50% de Materia Inerte (Talco) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.04	16.6	0.065	0.134	2,483
0.06	48.3			
0.08	66.6			
0.10	75.0			
0.12	86.6			
0.14	91.6			

TABLA 9

Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Talco) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.01	15	0.072	0.347	2,128
0.02	22			
0.05	37			
0.09	40			
0.13	52			
0.17	85			
0.19	87			
0.20	87			

TABLA 10

Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.09	6.4	0.149	0.288	1,006
0.13	24			
0.17	73			
0.19	75			
0.20	80			
0.28	93			

TABLA 11

Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Talco) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.06	12	0.382	4.526	471
0.12	23			
0.25	50			
0.50	60			
0.75	75			
1.50	75			
2.50	80			
3.50	85			

TABLA 12

Actividad del formulado preparado con 70% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 30% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.2	15.0	0.43	1.26	346
0.3	37.5			
0.4	50.0			
0.5	55.0			
0.6	62.5			
0.8	67.5			
1.0	82.5			
1.2	100.0			

TABLA 13

Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Talco) y 10% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
.1	7.5	0.433	1.291	346
.2	20.0			
.3	30.0			
.4	40.0			
.5	50.0			
.6	65.0			
.8	70.0			
1.0	100.0			

TABLA 14

Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 10% Ingrediente activo (B.t.i) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
2.0	30	3.42	6.74	43
3.0	45			
5.0	70			
7.0	90			
9.0	100			

TABLA 15

Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 10% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.25	15	0.733	2.883	245
0.50	31			
0.75	55			
1.50	70			
2.50	90			

TABLA 16

Actividad del formulado preparado con 90% de Materia Inerte (Talco) y 10% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% DE MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.6	7	4.545	17.45	33.0
1.2	12			
2.5	17			
5	37			
7.5	83			

TABLA 17

Actividad del formulado preparado con 95% Materia Inerte (Talco) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.); en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de Insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
2	15	6.89	25.65	21.62
5	35			
7	45			
9	55			
11	65			
13	85			

TABLA 18

Actividad del formulado preparado con 95% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
50	33	75.21	241.76	1.98
60	40			
70	50			
80	55			
90	60			
100	60			

TABLA 19

Actividad del formulado preparado con 95% de Materia Inerte (Talco) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i) en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de Insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
10	6	26.15	72.71	5.69
20	35			
40	60			
60	85			
80	100			

TABLA 20

Actividad del formulado preparado con 95% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 5% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
2	5	7.35	14.56	20.27
5	20			
7	30			
9	55			
11	92			
13	92			

TABLA 21

Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Talco) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
10	2	29.58	68.03	5.03
20	5			
30	8			
40	12			
50	16			
60	20			

TABLA 22

Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
60	25	101.36	291.07	1.47
70	35			
80	40			
90	40			
100	50			

TABLA 23

Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Talco) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
20	32	44.34	522.75	3.36
40	52			
60	58			
80	62			
100	65			
120	73			

TABLA 24

Actividad del formulado preparado con 99% de Materia Inerte (Tierra de Diatomeas) y 1% de Ingrediente Activo (B.t.i.) en larvas de 3er. estadio de *Culex quinquefasciatus* de insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
20	17	44.87	171.67	3.32
40	53			
60	70			
80	72			
120	74			
200	98			

TABLA 25

Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de Insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.04	8.7	0.15	0.73	993.3
0.06	19.5			
0.08	29.1			
0.10	39.5			
0.17	54.5			
0.21	60.0			
0.40	76.2			
0.55	87.0			

TABLA 26

Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de Insectario.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.01	22.5	0.05	0.108	2,980
0.03	35.0			
0.06	37.5			
0.08	52.0			
0.10	76.0			

TABLA 27

Actividad del formulado preparado con Talco, B.t.i. y Coadyuvante, (5:5:1) en larvas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.02	26.6	0.031	0.09	4,806.4
0.04	31.6			
0.06	50.0			
0.08	60.0			
0.10	63.3			
0.12	81.6			

TABLA 28

Actividad del formulado preparado con Tierra de Diatomeas, B.t.i. y Coadyuvante, (5:5:1) en larvas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.01	13.3	0.020	0.050	7,717.3
0.02	78.6			
0.04	94.0			
0.06	95.2			
0.08	92.3			
0.10	100.0			

TABLA 29

Actividad del formulado preparado con Tierra de Diatomeas, B.t.i. y Coadyuvante (5:5:1), en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.02	8.6	0.068		2,272
0.04	20.0			
0.06	44.3			
0.08	70.0			
0.10	89.3			
0.12	92.6			
0.14	98.6			

TABLA 30

Actividad del formulado preparado Talco; B.t.i. y Coadyuvante (5:5:1), en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.04	18.6	0.078		1,910
0.06	35.0			
0.08	42.0			
0.10	51.6			
0.12	85.0			
0.14	88.6			

TABLA 31

Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de *Cx. quinquefasciatus* de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.01	52.0	0.01	0.06	14,900
0.02	70.0			
0.04	77.0			
0.06	82.5			
0.08	95.41			
0.10	97.5			
0.17	98.75			

TABLA 32

Actividad del formulado comercial Bactimos en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.01	23.0	0.04	0.314	3,725
0.03	44.1			
0.06	47.5			
0.09	50.1			
0.12	69.1			
0.15	87.5			
0.18	98.3			

TABLA 33

Compañías Formuladoras de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

COMPañIA	PRODUCTO FORMULADO NOMBRE COMUN	PROPORCION DE INGRED.ACTIVO	UTI/mg
Novo Nordisk (Conneticut EUA)	Bactimos - Gránulos	2.5%	300
	Bactimos - Polvo Hum.	50.0%	3500
	Bactimos - Pellets	5.0%	7000
Abbott (Chicago EUA)	Vectobac - AS	0.6%	600
	Vectobac - 12 AS	1.2%	1200
Biochem Products (Delaware, EUA)	Bactimos - Polvo Hum.	50.0%	3000
Sandoz (California EUA)	Teknar - (Concentrado - emulsionable)	1.0%	1500
Summit Chemical Co. (Canada)	Bactimos - Briquetas	10.0%	7000

TABLA 34

Potencia en UTI/mg. obtenida en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* con los formulados preparados con 5 proporciones de Talco como Materia Inerte y el Ingrediente activo de B.t.i.

PROPORCION %		POTENCIA UTI/mg.	
TALCO	B.t.i.	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
-	100	3,061	3,333
50	50	2,483	4,054
70	30	2,128	471
90	10	346	33
95	5	21	20
99	1	5	3

TABLA 35

Potencia en UTI/mg. obtenida en larvas de 3er. estadio de *Aedes aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* con los formulados preparados con 5 proporciones de Tierra de Diatomeas y el Ingrediente Activo de B.t.i.

PROPORCION %		POTENCIA UTI/mg.	
TIERRA DE DIATOMEAS	B.t.i.	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
-	100	3,061	3,333
50	50	5,093	2,941
70	30	1,006	346
90	10	43	245
95	5	1	20
99	1	1	3

TABLA 36

Evaluación en campo de 2 formulados: Diseño local (Tierra de Diatomeas, B.t.i. y Coadyuvante proporción 5:5:1) y el Bactimos formulado comercial; en larvas de *Aedes aegypti* en el Panteón Jardín Español, Guadalupe, N.L. Junio 1992.

FORMULADOS DOSIS	PROMEDIO DE LA DENSIDAD LARVARIA		% REDUCCION LARVARIA
	PRETRATAMIENTO	POSTRATAMIENTO	
T. Diatomeas-			
B.t.i.-Tritón			
0.136 mg/l	2.75	0.25	90.9
0.272 mg/l	1.75	0	100.0
0.408 mg/l	1.0	0	100.0
Testigo	4.0	5	0
Bactimos			
0.086 mg/l	4.25	0	100.0
0.172 mg/l	1.5	0	100.0
0.258 mg/l	2.0	0	100.0
Testigo	1.25	2	0

TABLA 37

Evaluación en campo de 2 formulados: Diseño local (Tierra de Diatomeas; B.t.i. y Coadyuvante proporción 5:5:1) y el Bactimos formulado comercial en larvas de *Cx. quinquefasciatus*, Río Pesquería, Pesquería, N.L. Septiembre de 1992.

FORMULADOS DOSIS	PROMEDIO DE LA DENSIDAD LARVARIA		% REDUCCION LARVARIA
	PRETRATAMIENTO	POSTRATAMIENTO	
T. Diatomeas-			
B.t.i.-Tritón			
0.11 mg/l	120.0	29	76
0.22 mg/l	155.0	31	80
0.33 mg/l	90.7	17	82
Testigo	215.0	200	0
Bactimos			
0.12 mg/l	111.2	17	84.7
0.24 mg/l	67.0	10	85.0
0.36 mg/l	172.0	22	87.2
Testigo	130.0	143	0

TABLA 38

Evaluación del formulado de Diseño local (Talco-B.t.i.-Tritón) en la proporción 5:5:1, en larvas de *Psorophora ciliata* provenientes de campo.

DOSIS mg/l	% MORTALIDAD 24 h	LC ₅₀ mg/l	LC ₉₀ mg/l	POTENCIA UTI/mg
0.02	0	0.051	0.11	2,921
0.04	40			
0.06	60			
0.08	83			
0.10	96			
0.12	76			
0.14	96			

TABLA 39

Evaluación en campo de un formulado de Diseño local preparado con Talco-B.t.i.-Tritón (5:5:1) en larvas de *Psorophora ciliata* en Salinas Victoria, N.L. Septiembre de 1992.

FORMULADOS DOSIS	PROMEDIO DE LA DENSIDAD LARVARIA		% REDUCCION LARVARIA
	PRETRATAMIENTO	POSTRATAMIENTO	
Talco-B.t.i.- Tritón X-114			
0.12 mg/l	24	5	79.16
0.24 mg/l	34	2	94.11
0.36 mg/l	74	7	90.54
Testigo	23	33	0

