

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



FORMULACIONES GRANULARES Y MICROCAPSULADOS
DE DIFERENTES SEROVARIEDADES DE
Bacillus thuringiensis

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

QUE PRESENTA LA

M.C. PATRICIA TAMEZ GUERRA

MONTERREY, N. L., MEXICO

MAYO, 1996



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

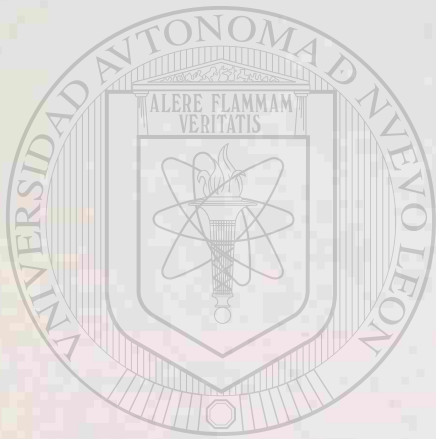
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
SB975
T3
C.1



1080072448



UANL

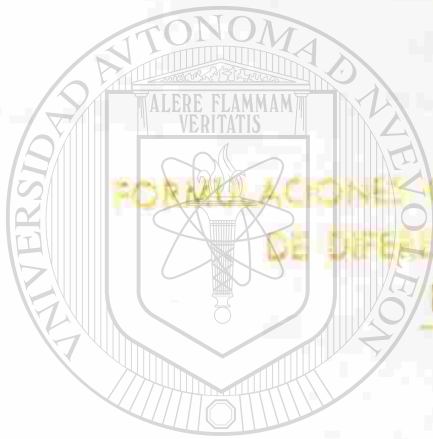
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



FORMULACIONES GRANULARES Y MICROCAPSULADOS
DE DIFERENTES SEROVARIEDADES DE
Bacillus thuringiensis

UANL
TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

®

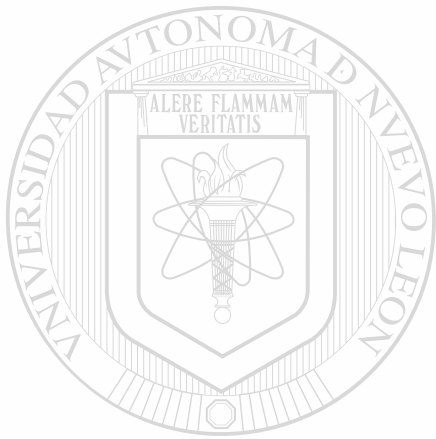
QUE PRESENTA LA

M.C. PATRICIA TAMEZ GUERRA

ESCRITO EN SAN ANTONIO, N. L., MÉXICO

ABRIL DE 1990

TD
B 975
T



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**FORMULACIONES GRANULARES Y MICROCAPSULADOS
DE DIFERENTES SEROVARIEDADES DE
*Bacillus thuringiensis***

**TESIS
QUE PRESENTA LA**

M. C. PATRICIA TAMEZ GUERRA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS
DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN

MICROBIOLOGIA

Monterrey, N. L. México.

Mayo, 1996.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FORMULACIONES GRANULARES Y MICROCAPSULADOS
DE DIFERENTES SEROVARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis***

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

POR

M. C. PATRICIA TAMEZ GUERRA

**APROBADA:
COMISION DE TESIS**

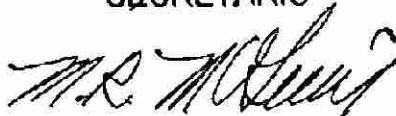


DR. LUIS J. GALAN-WONG

**DIRECTOR
PRESIDENTE**

DR. HIRAM MEDRANO ROLDAN

**CO-DIRECTOR
SECRETARIO**



DR. MICHAEL R. MCGUIRE

ASESOR EXTERNO

VOCAL

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y DEL SUELO "Dr. H. T. DULMAGE", GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-UANL, EN COLABORACION CON EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ITD, EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA URUZA DE LA UACH, UNIDAD BERMEJILLO, DGO.; EL DEPARTAMENTO DE ENTOMOLOGIA DEL CIIDIR DEL IPN, UNIDAD VICENTE GUERRERO. DGO.; Y LA UNIDAD DE INVESTIGACION DE AGENTES BIOACTIVOS DEL ARS/USDA/NCAUR, UNIDAD PEORIA, ILL., EUA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BAJO LA DIRECCION INTERNA DE:
DR. LUIS JESUS GALAN WONG (FCB/UANL),
DR. HIRAM MEDRANO ROLDAN (ITD),
Y DIRECCION EXTERNA DEL
DR. MICHAEL RAYMOND McGUIRE
(NCAUR/ARS/USDA)

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	1
ABREVIACIONES.....	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCION.....	7
Control Biológico-Manejo Integrado de plagas.....	7
Empleo de Bt para control de insectos.....	8
Caracterización de cepas de Bt.....	9
Bt tóxico a lepidópteros.....	11
Bt tóxico a coleópteros.....	13
Formulaciones a base de Bt.....	14
Formulados granulares.....	15
Formulados microcapsulados.....	17
Evaluación de Bt en campo.....	18
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y METODOS.....	21
RESULTADOS.....	22
Artículos:	
I. Characterization of Mexican strains of <i>Bacillus thuringiensis</i> toxic for lepidopteran and coleopteran larvae for EPA certification..	23
II. New granular formulations based on corn meal with different serovar. of <i>Bacillus thuringiensis</i>	48
III. Sprayable granule formulations for <i>Bacillus thuringiensis</i>	71
IV. <i>Bacillus thuringiensis</i> microencapsulated formulations for control of the coleopteran <i>Epilachna varivestis</i> Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae).....	99
Capítulos en Libro: Bioassay of <i>Bacillus thuringiensis</i> against terrestrial insects. 1996. In: Manual of techniques in insect pathology. L. A. Lacey (ed.) Academic Press, England (en prensa).....	119
Patente (FCB-UANL): Microcapsulación de pesticidas.....	141
DISCUSION.....	164
CONCLUSIONES.....	169
PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION.....	170
LITERATURA CITADA.....	171

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: por ayudarme a llegar a esta meta, pero sobretodo, por estar siempre conmigo, haciéndome sentir su amor y presencia a cada momento. Gracias Dios mío, pues si de algo estoy segura, es que lo logrado hasta ahora es gracias a tu dirección y amor.

A MIS PADRES: quienes me han dado amor, apoyo, confianza y aliento. ¿Cómo podría haberlo hecho sin su ayuda? Este logro es gracia a Uds. Gracias por su amor incondicional!

A MIS DIRECTORES: Dr. Luis J. Galán Wong e Hiram Medrano Roldán. Gracias por su confianza. Gracias por todo el tiempo invertido para que este trabajo saliera adelante. Gracias por participar en mi formación como investigador.

A MI ASESOR EXTERNO: Dr. Michael McGuire de quien estoy profundamente agradecida, puesto que no solo se preocupó en analizar y revisar los experimentos, sino que trabajó conmigo codo con codo, tratando de obtener juntos un trabajo de calidad. Gracias Michael por todas las enseñanzas que me has dado, por compartir conmigo este trabajo, pero principalmente, gracias por tu amistad.

A LOS MIEMBROS DEL COMITE DE TESIS: Dr.. Rafael Castro Franco y Benito Pereyra Alférez, puesto que me ayudaron siempre a que mi trabajo saliera adelante, Rafael, en la parte de investigación de campo; y Benito, en la parte de caracterización de cepas. Gracias por darme su apoyo incondicional, gracias por su amistad.

A LA UANL Y AL CONACYT. A la Universidad, porque me permitió continuar avanzando como investigador. Al CONACYT, por el apoyo económico para la realización de este trabajo (proyecto 3559-N9311) y la beca del posgrado.

A MIS COMPAÑEROS DEL DPTO. DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA: Principalmente a Magda, Carlos Fco., Lucía, Alberto y Juanis, porque su ayuda en la parte experimental del mismo, pero principalmente por saber ser amigos.

A LOS COMPAÑEROS DEL ITD, quienes me ayudaron a realizar las puebas iniciales del trabajo de microcapsulación.

A LOS Dr. BARUCK S. SHASHA Y FERNANDO VEGA DEL USDA, Peoria, Ill., que me dieron importantes sugerencias con respecto a la parte experimental de la patente e incluso trabajaron conmigo, y además me brindaron su amistad, lo cual ayudó a sentirme como en casa a pesar de estar tan lejos.

AL M. C. CIPRIANO GARCIA DEL CIIDIR, IPN, Dgo. quien fue una pieza importante para lograr realizar el trabajo sobre conchuela del frijol, trabajando conmigo siempre con alegría y optimismo.

AL Dr. DAN MILLER: por ayudarme a revisar y corregir la mayor parte de los documentos en inglés. Gracias Danny.

A MI FAMILIA: A todos mis hermanos y cuñados, puesto que siempre me apoyaron, ayudaron y tuvieron confianza en que lo lograría. Gracias por todo el amor que me han dado.

A MIS HIJOS: José Eugenio, Alberto y Alejandra, porque sin saberlo, fueron el impulso mas grande, el mas fuerte. Cuantos días la pasamos separados para poder terminarlo! En cuantas ocasiones me pedían que regresara pronto, que me extrañaban mucho, que me necesitaban! Siempre me llenaron de amor, aún cuando no entendían porque tenía que estar lejos. Y soportaban mi enfado porque me sentía agotada después de un día de intenso trabajo. Y de pilón tener que enfrentar al maestro que los regañaba por no traer el trabajo completo! Gracias pequeños, LOS QUIERO MUCHO!

A RICARDO: porque su amor en estos momentos a sido el impulso que me ha permitido continuar, aún en los momentos más difíciles.

ABREVIACIONES

α	alfa
A	Amperes
ARS	Servicio de Investigación Agrícola
β	beta
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	grados centígrados
ca.	aproximadamente
CIIDIR	Centro de Invest. Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional
cm	centímetros
cps	centipoises
δ	delta
EPA	Agencia de Protección Ambiental
et al/	colaboradores
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
FIFRA	Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas, EUA
g	gramo
h	hora
ha	Hectárea
Hr	Humedad relativa
IA	Ingrediente Activo
IB	Insecticida Biológico
IQ	Insecticida Químico
IPN	Instituto Politécnico Nacional
ITD	Instituto Tecnológico de Durango
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
Kp	Kilopound
Lab	laboratorio
LD ₅₀	Dosis letal media
LD ₉₀	Dosis letal para el 90 % de la población
l	litro

MIP	Manejo integrado de plagas
µg	microgramo
mg	miligramo
µl	microlitro
ml	mililitro
NCAUR	Centro Nacional para la Utilización de la Investigación en Agricultura
OD	Oxígeno Disuelto
PCI	Proteína cristalina insecticida
psi	Presión interna
r.p.m.	revoluciones por minuto
SECOFI	Secretaría de Comercio y Fomento Industrial
Serovar.	Serovariedad
TE	Temperatura de entrada
TS	Temperatura de salida
Ton	Tonelada
UI	Unidades internacionales
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Luz Ultravioleta
URUZA	Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas
UACH	Universidad Autónoma de Chapingo
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VA	Velocidad de alimentación
V	Voltaje
VVM	volumen de aire por volumen de medio por minuto

RESUMEN

Se caracterizaron y probaron ocho cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuatro cepas mexicanas y cuatro de la colección clave HD. Las ocho cepas se seleccionaron por ser tóxicas contra lepidópteros y dos contra coleópteros. El trabajo se basó en los lineamientos recomendados por la EPA de los EUA para Bt. De acuerdo al antígeno-flagelar se encontró que las cepas C-4 y C-9 pertenecen a la serovariedad *kumamotoensis*; GM-7 y GM-10 a *aizawai*; HD-187 y HD-263 a *kurstaki*; HD-193 a *galleriae* y la HD-530 a *morrisoni*. Las cepas C-4 y C-9 mostraron citotoxicidad (úlceras abiertas) en ratones Balb/C, similar a la cepa control (productora de la β -exotoxina). La inmunodetección de las PCI reveló que las cepas tóxicas a lepidópteros dieron reacción positiva con un antisuero policlonal antiCryIAb en una banda de proteína de ca. 120-130 KDa. Las cepas C-9 y HD-193 produjeron una proteína de ca. 120 y 70 KDa que mostraron reacción con un antisuero policlonal antiCryIAc. Sólo las cepas C-4 y C-9 desarrollaron toxicidad contra larvas de *Epilachna varivestis*. A partir de los bioensayos a nivel de laboratorio, se procedió a elaborar dos tipos de formulados para ser evaluados en campo. Con el complejo spora-cristales se elaboraron formulados granulados y microcapsulados, ambos a base de harina de maíz nixtamalizado. Mediante bioensayos se comprobó que la actividad tóxica de las cepas en los granulados se conservó (mortalidad del 100%, con 50 μ g/ml, después de dos años de preparado). La evaluación de los granulares se realizó en cultivos de maíz en dos períodos de siembra, usando formulados al 2 y 4% de IA en 1994; y 3% del IA en 1995. Los resultados se evaluaron tomando en cuenta el rendimiento de grano de maíz (Kg/ha). En 1994, con GM-10 se obtuvieron rendimientos de 7,948.8 y 8,825.5, al 2 y 4% respectivamente, comparable al obtenido con la cepa HD-263 (8,972.2 al 4%), y con el insecticida químico se alcanzó un rendimiento de 8,616.7, y superó al biológico comercial Dipel® (5,628.6). En 1995 se probaron formulaciones al 3% de IA y, nuevamente, el rendimiento con las cepas GM-10 y HD-262 fue muy similar, alcanzando producción de 6,344.6 y 5,583.3, respectivamente; aún y cuando los formulados tenían dos años de haber sido producidos. Lo anterior indica que ambas cepas aisladas son efectivas en campo, es posible usar harina de maíz nixtamalizado para producir formulados granulares económicos y el producto propuesto tiene una aceptable vida de anaquel. Con respecto a las microcápsulas, éstas se produjeron con diferentes matrices (distintos tipos de almidón y harina de trigo; tres agentes antioxidantes y protectores solares) y dos tipos de secado. Los microcapsulados se evaluaron contra larvas de *Ostrinia nubilalis*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua* y *Trichoplusia ni* y se realizaron pruebas de estabilidad a rayos solares y lavado por lluvia. Los resultados indicaron que es posible microcapsular Bt con esta técnica; se pueden adicionar hasta el 50% del IA sin pérdida de actividad; es factible su aplicación por aspersión y el producto es 35% más económico que el producto actual en el mercado. Los microcapsulados con la cepa C-9 se aplicaron por aspersión en cultivo de frijol en 1994 en Vicente Gro, Dgo.; y en 1995 en Bermejillo, Dgo., sin observarse ataque de la plaga o diferencias en rendimiento de grano. Solo se observó reducción en número de larvas (de 80 a menos de 10). Ensayos de persistencia, realizando infestaciones artificiales semanales, comprobaron estabilidad de Bt formulado de ca. una semana.

ABSTRACT

Eight *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains were characterized, four Mexican Bt strains and four HD strains. These strains were selected for high toxicity against lepidopteran and/or coleopteran larvae. This work was done according to the Environmental Protection Agency (US-EPA, 1988) published a guidelines for those strains. By the antigen-flagellar test GM-7 and GM-10 were identified as the serotype *aizawai*, HD-187 and HD-262 as *kurstaki*, C-4 and C-9 as *kumamotoensis*, HD-193 as *galleriae* and HD-530 as *morrisoni*. Moreover, C-4 and C-9 showed cytotoxicity in mice (ulcers) similar to the β -exotoxin control. Immunoblot of insecticidal crystal proteins (ICP's) showed that strains killing lepidopteran larvae crossreacted with a polyclonal antiCryIAb antiserum in a 120-130 KDa protein band, but the HD-193 produced one 70 KDa protein that crossreacted with an antiCryIAC antiserum. However, only the C-4, and C-9 strains were toxic against the coleopteran *Epilachna varivestis* larvae. From these results were prepared formulations by field trials. Microencapsulated and granular formulations were prepared using the spore-crystal complex as active ingredient (AI) and nixtamalized corn as matrix. The granules were used for lepidopteran pest control on corn plots (*Zea mays*). The field experiment was performed in a semi-arid region in central Mexico in two years, using AI at 2 and 4 % (1994) and 3% (1995), respectively. Bioassays indicated that Bt survived in the gelatinized starch matrix complex (100% mortality with 50 μ g/ml, two years after preparation). Field results (yield, Kg/ha) were similar (7,948.8 and 8,825.5, 2 and 4% GM-10 respectively) to carbaryl (8616.7), and higher than Dipel (5,628.6). In both periods, the highest yields of corn were obtained with strain HD-263 (8,972.3, at 4% in 1994, and 6,344.6 at 3% in 1995) which had originally shown the highest efficacy in bioassays, also by using the strain GM-10 (5,583.3 at 3% in 1995 versus 4,720.3 -control); the latter as a two year old formulation. All this suggested that strains of Bt isolated in Mexico are as toxic as the HD strains; it is possible to use nixtamalized flour and the proposed product has an acceptable shelf-life. The matrices for microcapsules were both cornstarch and nixtamalized corn flour. The stability to artificial solar and rain of Bt in the microcapsules were tested in bioassays with lepidopteran larvae of *Ostrinia nubilalis*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni*. Microcapsules were produced also using several starch types and wheat flour, variable percentages of AI; three antioxidant agents; and solar protectants. Toxic activity was compared before and after the spray dry process. Moisture content in each microcapsule was measured as an indication of shelf-life for commercialization. The results obtained shown that it is possible microencapsulate Bt using spray dry technique. The AI can be used at a percentage of 50% without losing activity. It is possible to be sprayable on any crop, and the product is 35% less expensive than the actual market products. Microencapsulated C-9 was field tested on beans infested with *E. varivestis* in both 1994 and 1995. After applications, damage by this pest was not observed, and no difference in yield was observed. Differences were observed in larvae number after application only (80 to below 10 after application). Persistency assays were conducted through infestation each week demonstrate the longer residuality of microencapsulated Bt. ®

INTRODUCCION

Un problema principal que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas lo constituyen las plagas, las cuales atacan cultivos en pre y post-cosecha. Existen numerosos agentes que atacan los cultivos, los daños más severos son causadas por insectos, tanto por su diversidad como por su número, además de la extensa cantidad de cultivos que pueden dañar (Falcon, 1971). Tradicionalmente, el control de dichos insectos se lleva a cabo con insecticidas de origen químico (Byerly-Murphy y Bujanos-Muñiz, 1995). De hecho, en 1990 en los Estados Unidos se invirtieron alrededor de 400 millones de dólares en insecticidas a base de carbamatos y organofosforados (Goldburg y Tjaden, 1990). Los inconvenientes que presentan tales productos son su baja o nula especificidad, la rápida aparición de resistencia, alta toxicidad al hombre y animales, la potenciación de los residuos y la contaminación de suelos y mantos freáticos (Cunningham, 1988).

Debido a estos inconvenientes, hoy en día existe mucho interés en encontrar alternativas para evitar el uso excesivo de insecticidas químicos en favor del biocontrol (Payne, 1988; Simone, 1991). El biocontrol es un método más específico y seguro para el ambiente, además de reducir la aparición de resistencia por los insectos (Fox, 1989).

Control biológico en el Manejo Integrado de plagas

El concepto de manejo integrado de plagas (MIP) se originó en el área de entomología agrícola, como consecuencia de los efectos contaminantes de los plaguicidas químicos y aparición de plagas secundarias. Para el inicio de los 70's, el empleo del MIP se fue ampliando, y la aceptación del mismo ocurrió hasta que el empleo indiscriminado de químicos ocasionó el desastre de algunos cultivos, como el algodón, debido a la resistencia desarrollada por los insectos plaga (Flint y van der Bosch, 1981). Entre las alternativas de MIP se utilizan organismos entomófagos y entomopatógenos. Para el primer tipo de control sobresale la utilización de insectos como enemigos naturales de la plaga a controlar y en entomopatógenos tales como bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoarios (Daoust, 1990).

Se conoce como biocontrol al uso de organismos, genes o producto de genes, naturales o modificados, para reducir las poblaciones de organismos indeseables en favor de organismos benéficos (Gabriel y Cook, 1987). El control biológico ha venido

incrementándose en nuestro país a finales de los 70's y existen muchos programas de investigación en muy diferentes áreas (Valenzuela, 1987). Un ejemplo de ello se inició en la región del bajo guanajuatense, donde se utilizó un producto a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para controlar la "palomilla dorso de diamante" *Plutella xylostella* en cultivos de calabaza, obteniéndose protección comparable a la proporcionada por insecticidas químicos (Biever, 1995). Existe una gran cantidad de organismos entomopatógenos, y de ellos sobresalen las bacterias formadoras de endoesporas entre las que destaca Bt.

Empleo de Bt para control de insectos

Bt se encuentra distribuido en los suelos de todo el mundo, aunque se han encontrado en mayor proporción en suelos de Asia (Martin y Travers, 1989). Bt es un bacilo Gram positivo, con flagelos peritricos a excepción de un biotipo, esporulado, fase durante la cual sintetiza un cuerpo paraesporal de naturaleza proteica (cristal) de forma variable, ya sea bipiramidal, redonda, triangular, amorfa, ovoide, cuadrada o rectangular (Insell, 1983). A los péptidos que forman este cristal se les ha llamado proteínas del cristal insecticida (PCI). El cristal sintetizado por Bt puede estar formado por una o diferentes δ -endotoxinas, mismas que pueden causar parálisis intestinal y muerte al insecto. Se ha demostrado que esta toxina es inocua para el hombre y animales superiores, y desarrolla alta especificidad contra larvas de diferentes órdenes de insectos, principalmente Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros (Ignoffo, 1973).

Existen diversas formas de identificar las cepas de Bt, donde destaca la clasificación serológica en base al antígeno flagelar (H). De esta manera, se han logrado identificar 54 diferentes serotipos (Lecadet, 1994). Dentro de todos los serotipos de Bt, solamente ciertas cepas se producen a nivel comercial donde sobresalen las pertenecientes a las serovariedades *kurstaki* y *aizawai* para el control de lepidópteros; *israelensis* para dípteros y las subespecies "san diego" y "tenebrionis" contra coleópteros (Frankenhuysen et al, 1992).

Con respecto al empleo de bioinsecticidas, se han estipulado algunos criterios importantes para comercializar un agente microbiano, tales como:

1. Elevada patogenicidad e infección del insecto preferentemente por dentro, por ingestión del bioinsecticida, excepto en el caso de los hongos.
2. Efecto reproducible en condiciones de campo.

3. Efectivo aún a baja densidad de población y amplio espectro de acción.
4. Controlar la plaga y evitar el daño económico a los cultivos.
5. Seguro a la vida silvestre, animales domésticos, a otros insectos y a humanos.
6. Capacidad de crecer en un medio simple, en cultivos sumergidos y económicos de producir en escala masiva a nivel comercial.
7. Persistencia después de la aplicación en el hábitat natural y fáciles de usar.
8. Capaces de reducir o eliminar la necesidad de un tratamiento químico.
9. Ofrecer una ventaja sobre los químicos, ya sea en el precio o en la liberación de regulación gubernamental sobre los residuos.
10. Resistencia para los rayos solares y otros factores ambientales.
11. Cepas libres de fagos y resistencia a bacteriófagos.
12. Manipulable y estable genéticamente.
13. Transportable a cualquier lugar del mundo.

Barack *et al* (1988), Debabov *et al* (1984), (Dulmage, 1967).

La implementación de programas permanentes de aislamiento y selección de cepas nativas de Bt, ha resultado en la obtención de cepas con mayor toxicidad y/o especificidad, alcanzándose más de 400 patentes en EUA. Así mismo, el empleo de herramientas de biología molecular e ingeniería genética en Bt, han permitido conocer a nivel molecular la toxina y los genes que la sintetizan, movilizar estos genes hacia otras bacterias y plantas, alterando las características originales; hechos que promovieron el registro de 22 patentes de cepas Bt transformadas (Feitelson *et al*, 1992; Benedict *et al*, 1992; Gasser y Fraley, 1992; Warren *et al*, 1992; Koziel *et al*, 1990).

Caracterización de cepas de Bt

Las cepas de Bt que hayan mostrado alta toxicidad y/o especificidad en ensayos a nivel de laboratorio, se deben someter a diversos tipos de caracterizaciones, donde sobresalen la caracterización bioquímica, serológica, espectro de acción, tipo de toxina, aspectos de bioseguridad, etc. Por lo anterior, para las autoridades reguladoras como la EPA, a través de FIFRA (Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas) en EUA, es prioridad el considerar los posibles impactos del plaguicida sobre la salud pública y el ambiente. En el caso de organismos no blanco, estos

coexisten de forma natural con las plagas y las aplicaciones a gran escala de organismos desarrollados industrialmente, pueden cambiar el balance natural de los agentes de control biológico y organismos residentes. Los requerimientos normativos para su registro y uso experimental como plaguicidas microbianos naturalmente encontrados, incluyen información de cinco grandes áreas: análisis del producto, análisis de residuos, toxicología, efectos ecológicos y destino ambiental (Betz *et al*, 1990).

Con fines de seguridad, para evitar posibles contaminaciones con productos elaborados a base de Bt, los EUA piden que los mismos se regularicen de la siguiente manera:

1. El organismo usado deberá ser una cepa auténtica de Bt.
2. Métodos de cultivo puro deberán ser usados con control adecuado para evitar cualquier cambio en las características de la cepa original o contaminación con otros organismos.
3. Antes de cualquier otra adición, cada lote deberá ser probado a través del uso de inyecciones subcutáneas de por lo menos un millón de esporas, en 5 ratones que tengan pesos de entre 17 a 23 g, no deberá producir evidencias de infección o daños después de 7 días.

(Betz *et al*, 1990)

Los datos requeridos que ha implementado la EPA de los EUA (US-EPA, 1988), en Diciembre de 1988, para el registro de cepas de Bt incluye lo siguiente:

1. Datos morfológicos y bioquímicos.
2. Análisis del serotipo.
3. Historia de la cepa.
4. Patrón de resistencia a antibióticos.
5. Descripción de las toxinas insecticidas producidas.
6. Perfil de plásmidos.
7. Descripción morfológica de la proteína cristalina.
8. Bioensayos para diversos tipos de insectos.
9. Pruebas de toxicidad intraperitoneal en ratón para la β -exotoxina.

Dentro de la caracterización, la prueba de toxicidad intraperitoneal en ratones para la β -exotoxina es importante, ya que estudios de seguridad realizados con dicha toxina demuestran que la misma provoca la muerte en ratas después de inyección intraperitoneal (Faust, 1973). Cabe destacar que solo algunas cepas de Bt producen este metabolito, y su formación se produce cuando el bacilo se encuentra en su estado de crecimiento vegetativo, liberándola al medio de cultivo. El efecto bioinsecticida de esta toxina se ha evaluado principalmente en control de *Musca domestica*, pero debido a que se ha comprobado que puede inhibir la ARN polimerasa su uso es restringido (Johnson, 1978).

Bt tóxico a lepidópteros

Desde que Berliner dio una descripción de Bt en 1911, cuando lo descubrió infectando larvas de lepidópteros en un cultivo de trigo en Alemania, llegó a la conclusión de que este microorganismo tenía potencial como control del insecto plaga. Poco después, en 1935, en Francia, se desarrolló un producto piloto a base de Bt para el control de lepidópteros en granos almacenados. El desarrollo industrial real vino al final de los 50's con el empleo de fermentaciones líquidas, mediante las cuales se inició el estudio de producción masiva y eficiente de Bt. Para alentar la producción del mismo, se realizó un experimento de campo para el control de la oruga de la alfalfa. Esto fue lo que motivó el interés industrial en los EUA, y se realizó una conferencia para persuadir a muchas firmas de industriales americanos, para producir Bt a nivel de planta piloto. En fechas recientes, en países europeos, Canadá y los EUA, es una recomendación rutinaria el empleo de este bioinsecticida en los invernaderos, en almácigos de tomate, cultivo de flores y otros vegetales para el control de *Trichoplusia ni*, *Plutella xylostella* y *Pieris rapae* (Lambert y Peferoen, 1992).

La clave del MIP es permitir el desarrollo durante la primavera de los enemigos naturales de otras plagas, así como su permanencia y aumentar el desarrollo, hasta tener un máximo de población para el otoño. En lugares donde las plagas se han vuelto resistentes a la mayoría de los químicos el empleo del MIP es la única solución (Byerly-Murphy y Bujanos-Muñiz, 1995). Los productos a base de Bt que se usan para control de lepidópteros representan alrededor de la mitad del mercado actual, y solo dos se elaboran como formulados granulares, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Productos comerciales de *B. thuringiensis* para control de lepidópteros.

Nombre	Compañía	Tipo de formulado	Empleo
Bactospeine 16PB	Duphar	Polvo humectable	Agricultura
Bactospeine 85FLO	Duphar	Pasta	Agricultura
Bactospeine	Duphar	Polvo humectable	Agricultura
		Polvo asperjable	Plantas ornamentales
Bactucide-P	Ricerca chim	Polvo humectable	Agric. Salud. C. golf, Forestal
Bactucide-S	Ricerca chim	Líquido concentrado	Agric., Árboles, C. de Golf
Bernan Bt	Bactec	Polvo humectable	Agricultura
		Polvo asperjable	Alimentos almacenados
		Gránulos	Lepidópteros
Cutlas	Ecogen	Polvo humectable	Vegetales
Delfin	Sandoz	Microgránulos	Agric. Forestal, Jardinería
Dipel	Abbott	Polvo humectable	Agricultura, Árboles, Jardín
Dipel ES	Abbott	Susp.emulsificante	Agricultura
Dipel 2X	Abbott	Polvo humectable	Tabaco, girasol, cacahuete
Dipel 4L	Abbott	Susp.emulsificante	Agric.,Hortic., Invernadero
Dipel 6L	Abbott	Susp.emulsificante	Agric.,Hortic., Forestal
Novo Biobit 32B	Novo	Concentrado acuoso	
Novo Biobit 16K	Novo	Polvo humectable	Agric. C. de golf, Forestal
Novo Foray	Novo	Concentrado acuoso	Agric. C. de golf, Forestal
Thuricide 32B	Sandoz	Concentrado acuoso	Agricultura, Forestal
Thuricide 32LB	Sandoz	Concentrado acuoso	Campos de Golf, Forestal
Thuricide HP	Sandoz	Polvo humectable	Agric. C. de golf, Forestal
Thuricide SC	Sandoz	Concentrado acuoso	Agric. C. de golf, Forestal
Thuricide 48LV	Sandoz	Concentrado acuoso	Campos de Golf, Forestal
Thuricide HPC	Sandoz	Concentrado acuoso	Agric. C. de golf, Forestal

Bt tóxico a coleópteros

La toxicidad de Bt a coleópteros inicialmente se demostró contra el escarabajo colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Krieg *et al*, 1984), por la subespecie "tenebrionis". A partir de entonces se tienen más reportes con la misma variedad contra otros coleópteros (Robert *et al*, 1994). Otra subespecie reportada es la "san diego", ambas pertenecientes a la serovariedad *morrisoni*. Los trabajos realizados a nivel de campo con esta subespecie contra el escarabajo ya mencionado sólo dieron resultados positivos hasta que se emplearon formulaciones microcápsuladas (Zehnder *et al*, 1992). Recientemente se ha reportado la presencia de las serovariedades *mexicanensis*, *morrisoni*, *neolonensis* y *thuringiensis* en *Lasioderma sericorne* (F.), cuyas larvas atacan tabaco almacenado. Los resultados mostraron que con excepción de la *mexicanensis*, presentaban homología serológica con la subsp. *tenebrionis*. La variedad *thuringiensis* mostró homología con la serovar. *kurstaki* (Kaelin *et al*, 1994).

Con respecto al insecto ya mencionado, el escarabajo colorado de la papa (*L. decemlineata*), los resultados obtenidos con cepas de Bt mostraron que son una buena alternativa de control, al ser inactivo frente a otros insectos benéficos (Ferro y Gelernter, 1989). Posteriormente, empleando la formulación denominada M-ONE en cultivo de papa, se observó en general lo mismo que para el control de lepidópteros; que las larvas de los primeros estadios son más susceptibles a este tipo de bioinsecticidas que los últimos estadios o los adultos, y el resultado de su empleo aumenta significativamente el rendimiento del cultivo (Zehnder y Gelernter, 1989).

En el Noreste de México los cultivos de frijol son severamente dañados por la conchuela del frijol (*Epilachna varivestis*, Mulsant; Coleoptera: Coccinellidae) principalmente (INIFAP, 1992). Las pérdidas económicas por esta plaga ha motivado la implementación de un programa de control por medio de insecticidas químicos y control biológico. El empleo de insecticidas químicos ha tenido algunas dificultades debido a la gran cantidad de los mismos requerido para un control adecuado. En el control biológico, se están valorando dos estrategias: cultivo de variedades resistentes (INIFAP, 1992), y liberaciones de parasitoides naturales, como la avispa *Pediobius foveolatus* (C.), la cual es parásita de las pupas de la conchuela (García-Gutiérrez *et al*, 1993). Una tercera alternativa dentro del control biológico es el empleo de cepas de Bt específicas a este insecto. Los reportes que existen a este respecto indican una actividad débil de la variedad *tenebrionis* a este insecto, y también se menciona la

susceptibilidad del mismo a la β -exotoxina (Keller y Langerbruch, 1993). A este respecto, aunque se desconocen reportes de toxicidad contra ellos por la serovariedad *kumomatoensis*; una cepa de Bt nativa de México de esta misma variedad ha mostrado ser una posibilidad como bioplaguicida contra este coleóptero (Medrano-Roldán, comunicación personal). Por lo anterior es necesario realizar una caracterización más amplia para definir el espectro de acción y nivel de actividad tóxica y su seguridad.

Formulaciones a base de Bt

Un insecticida puede introducirse en el mercado en varias formas, y es necesario tomar en cuenta: a) el ambiente del insecto que va a ser controlado, b) el método de aplicación preferido, y c) el uso de formulaciones. Los tipos de aplicación de Bt a cultivos, se ha modificado notablemente en los últimos años. Inicialmente y hasta fechas recientes, se realiza la aplicación del ingrediente activo en forma líquida por aspersión (Lambert y Peferoen, 1992), mediante el uso del complejo espora-cristal mezclado con agua y otros emolientes o aditivos, basado principalmente en los empleados para los insecticidas químicos, aplicado directamente sobre la planta (Angus y Lüthy, 1971). El mercado de productos a base de Bt se ha incrementado notablemente en los últimos años, y aunque solo representa alrededor del 0.1% del mercado actual de pesticidas, las ventajas del producto sobre los químicos con respecto al bajo impacto en el deterioro de la ecología muestran un alto crecimiento anual. Actualmente en el mercado se encuentran alrededor de 50 productos a base de Bt, destacando en número los polvos humectables, seguidas de los concentrados acuosos (Morales-Ramos, 1994). En cuanto al insecto blanco, la mitad de los productos tienen como insecto blanco a lepidópteros, seguido por dípteros y coleópteros. Aunque los polvos humectables los más comercializados, tienen la desventaja que el ingrediente activo queda expuesto al ambiente, y su inactivación es rápida (su actividad tóxica disminuye a la mitad en 24 horas). Es por este motivo principalmente que se han buscado alternativas para aumentar la estabilidad y residualidad de los productos a base de Bt, principalmente aquellos que se van a aplicar en campo.

Formulados granulares

Los tipos de aplicación de Bt a cultivos, se ha modificado notablemente en los últimos años, en un intento de aumentar la toxicidad, el número de insectos blanco y la residualidad del mismo. Hasta fechas recientes se realiza la aplicación del ingrediente activo en forma líquida por aspersión (Borgatti y Guyer, 1963), cuyo formulado estaba compuesto del complejo espóra-cristal mezclado con agua y algún otro emoliente o aditivo, basado principalmente en los empleados para los insecticidas químicos, y la aplicación se efectuaba directamente sobre la planta por aspersión (Angus y Lüthy, 1971). Este método, tiene como desventaja que el ingrediente activo queda expuesto y su actividad insecticida disminuye drásticamente en poco tiempo (Ignoffo y García, 1978). Por esto se pensó en formular en forma de gránulos los bioinsecticidas elaborados a base de Bt. Los formulados granulares fueron probados exitosamente para Bt (Creighton *et al*, 1961), y fueron comercializados como Biotrol 2.5[®]. Posteriormente, Raun y Jackson en 1966 (citados por Ignoffo y Batzer, 1971), utilizaron este método para formular insecticidas y mantener la viabilidad de las esporas de Bt en gránulos de talco, confirmándose su eficacia tanto en laboratorio como en campo. El empleo de harina de maíz como matriz del granulado se realizó con excelentes resultados en Georgia, sobre el cultivo de algodón (Cannerday *et al*, 1975).

La baja estabilidad y persistencia del Bt en el ambiente es un factor indeseable en las formulaciones. Como ya se mencionó, los factores climáticos, especialmente la intensidad de la luz solar, son destructivos debido a que afectan la persistencia de insecticidas microbianos. Diferentes estudios revelaron la inactivación de Bt después de 24 horas de exposición a luz solar simulada debido a la generación de radicales peróxido en los aminoácidos (Ignoffo y García, 1978). Esto propició la adicionar agentes de potenciación, estabilizadores o adherentes. Los resultados positivos fueron observados con cebos de harina de maíz, o adherentes, de los cuales se emplearon algunos carbohidratos, entre los que destacó la sacarosa (Norris, 1978). Levinson (1988), desarrolló un bioplaguicida a base de una mezcla de la toxina de Bt, un compuesto que liga taninos, tales como: poliamida sintética, suero, gelatina, polietilenglicol, un borato o urea y un soporte que puede ser agua o un sólido como piedra pómez. El compuesto que liga taninos asegura la permanencia del insecticida por mayor tiempo sobre la planta sin desnaturalizarse. También se han realizado

pruebas de campo con protectores como: Adjuvante San-285^R, Melazas P/yac^R, Lufilm^R, Triton X-100^R y ADWNP 66^R, carbón activado y colorantes como rojo congo; verde de malaquita, etc.; y también polímeros sintéticos que además de funcionar como protectores solares minimizan la desecación (Couch, 1978). De los más empleados en campo está el rojo congo. Al usar este o ácido fólico en formulaciones granulares se obtiene una estabilidad de 12 días (contra dos días sin capsular), con el 50% de la actividad original (Dunkle y Shasha, 1989), y la melanina en concentraciones líquidas para control de mosquitos (Liu *et al*, 1993).

Para incrementar el consumo por parte del insecto, una alternativa es el empleo de fagoestimulantes y/o atrayentes sexuales. De los primeros, el más comercializado es quizá el Coax^R, ya que actúa como atrayente alimenticio y muestra cierto efecto protector contra los rayos UV, (Moffat, 1990; McGuire *et al*, 1990); obteniendo resultados similares al disminuir en un 75% la cantidad de ingrediente activo mediante su empleo en formulaciones granulares (Bartelt *et al*, 1990). Además de los granulados ya mencionados a base de harina o almidón de maíz, otra forma de poder conservar varios agentes potenciadores en una sola matriz, es mediante alginatos arcillosos (Fravel *et al*, 1985; Bashan, 1986); llegándose a utilizar incluso alginatos bacterianos en formulaciones de biocontrol (De Lucca *et al*, 1989). Una de las formulaciones granulares que se puede usar en cultivos de gramíneas y pastos, es en la que se utiliza como matriz almidón de maíz en estado pregelatinizado (Dunkle y Shasha, 1988; McGuire *et al*, 1990; McGuire *et al*, 1991). La desventaja que tiene este tipo de matrices se debe a su forma (como panal de abeja), peso y volumen; fácilmente se precipitan al suelo durante su aplicación, recomendándose solo en los cultivos antes mencionados, puesto que la emergencia de la hoja permiten que el gránulo quede retenido, y en ese sitio se establecen las plagas a controlar. Además se ha capsulado la protoxina (cristal) de Bt (Lereclus *et al*, 1995).

Sobre estos aspectos, los trabajos de investigación realizados en el laboratorio para la producción de formulados granulares indican que la harina de maíz nixtamalizada es un soporte del formulado eficaz, se polimeriza en frío y forma redes matriciales adecuadas; y el verde de malaquita fue el mejor protector solar. Así también, el extracto de la planta *Agave lechuguilla* actúa como coadyuvante sinérgico con Bt, y el aceite vegetal evita la desecación y favorece la viscosidad del material (Castro-Franco, 1994).

Formulados microcapsulados

Entre las estrategias actualmente utilizadas para alcanzar el mayor potencial de bioinsecticidas se ha requerido el desarrollo de formulaciones más estables, dentro de las cuales la microcapsulación es un sistema muy versátil, ya que permite la elaboración de capsulados sólidos aspersables y fácilmente se le pueden incorporar fotoprotectores para extender la actividad insecticida, fagoestimulantes para atraer más al insecto blanco, agentes de adherencia que evitan la pérdida del insecticida por lavado del follaje etc. La microencapsulación está definida como la tecnología de empaque de sólidos, líquidos y gases en pequeños contenedores o cápsulas; las microcápsulas pueden liberar su contenido a rangos controlados, dentro de condiciones específicas (Sparks, 1981). Esta tecnología se usa para protección, estabilización y liberación lenta (Taylor, 1985; Youngs, 1986). Actualmente es aplicado en alimentos, saborizantes, resinas adhesivas y reactivas, drogas, perfumes, insecticidas, etc. (Flinn y Nack, 1967). Los métodos de capsulación incluyen secado por aspersión, secado por congelamiento, cubierta en base fluidizada, extrusión, co-cristalización, inclusión molecular y co-acervación (Taylor, 1985; Youngs, 1986).

El paso inicial en el proceso de microcapsulación es la selección del material adecuado, referido como la matriz de capsulación. Los materiales comúnmente empleados son el almidón, derivados del almidón, proteínas, gomas, lípidos o cualquier combinación de ellos. Estos materiales deben tener propiedades reológicas importantes, tales como: viscosidad, fuerza de corte, tensión cortante, capacidad de dispersión, cubrir el material activo, etc. (Rao, 1992; Shahidi y Han, 1993). Los materiales tipo polímeros no-iónicos, enriquecidos con otros agentes como la albúmina, ayudan a mejorar la gravidez específica (Baker et al, 1989); microesferas de este tipo (poliméricas) se han probado con éxito para formular herbicidas con rangos de liberación controlados (Tefft y Friend, 1993).

Las formulaciones aspersables de Bt están basadas en mezclar el IA con adyuvantes, y requiere de una cantidad determinada de materiales por unidad de volumen requerido. El producto final es el IA atrapado dentro de pequeños gránulos, los cuales se pueden disolver en agua y aplicarse por aspersión (McGuire y Shasha, 1990). Estos microcapsulados elaborados a base de Bt son reflejo de formulados granulares en cuanto a su constitución (Dunkle y Shasha, 1988). Otro ejemplo lo constituyen los alginatos arcillosos y bacterianos que han servido como matriz o

agente capsulante en formulaciones granulares, se han probado posteriormente para la elaboración de microcápsulas (De Lucca y Bland, 1990). También se ha utilizado un polímero llamado Eudragit[®] para elaborar microcápsulas suaves y digestibles. Además se les pueden incorporar protectores para la luz solar como verde de malaquita y pueden producirse con baculovirus o Bt como agentes insecticidas (Bohm y Friend, 1988).

Por otra parte, se han utilizado microorganismos transformados con la toxina de Bt, a partir de los cuales se desarrollaron dos productos basados en el sistema M-Cap[®], que consiste en transferir el gen responsable de la producción de la δ -endotoxina a *Pseudomonas fluorescens*. Mediante el uso de esta tecnología, al final de la fase de crecimiento las células de *Pseudomonas* se inactivan con calor y un tratamiento químico. Posteriormente se emplea la pared celular como microcápsula protectora que encierra la toxina de Bt. Los dos productos obtenidos con esta biotecnología son el MVP[®], que poseen la δ -endotoxina de Bt serovar. *kurstaki*, y el M-One[®], que posee la δ -endotoxina de Bt variedad "san diego" (Gelernter y Zehnder, 1989). De esta forma se incrementó la actividad residual de la toxina, como resultado de la protección de la cubierta celular (Frankenhuyzen y Ortíz, 1990; Gelernter, 1990). En 1990, la EPA, aprobó el uso experimental de este bioinsecticida, el cual fue desarrollado con tecnología de ADN recombinante.

Finalmente cabe aclarar que aunque la mayoría de estos formulados se nombran como microcapsulados, en realidad su tamaño de partícula es de alrededor de 0.5 - 1 mm, siendo quizá más adecuado llamarlos microgránulos, como se indica en el producto comercial.

Evaluación de Bt en Campo

Las pruebas de campo son la última etapa en la evaluación experimental de un insecticida microbiano y generalmente se efectúan en forma simultánea con pruebas de seguridad que se requieren para su registro. En los EUA se realizan pruebas a escala pequeña (menos de 10 acres), cuando se utilizan cepas nativas. Éstas se pueden llevar a cabo sin notificar a la EPA. En cambio, experimentos con microorganismos modificados genéticamente requieren de notificación y permiso de uso a nivel de campo por la EPA, así como las pruebas que exceden de 10 acres. La información obtenida en este tipo de experimentos se utilizan como referencia para establecer las instrucciones de uso de los productos, tiempo de aplicación, rango de

uso, instrucciones de mezclado, aplicación, dosis recomendada en diferentes tipos de cultivos e insecto blanco (Daoust, 1990). Cabe aclarar que aumentar el uso combinado de Bt con nuevas formulaciones e ingeniería genética para mejorar su persistencia, sobre todo en lo que respecta a plantas transgénicas, podría traer como resultado inducir resistencia. Actualmente, el empleo de Bt debe enfocarse a programas de MIP. Lo anterior se demuestra por estudios con cultivos en apio y el MIP con Bt, que ha dado en California una ganancia neta de 1,047 dólares/ha, comparada con 393 dólares/ha para un programa convencional de plaguicida.

Para finalizar, en la FCB-UANL se estableció un convenio con el INIFAP y el ITD, el Departamento de Agricultura de los EUA (USDA; Peoria, Ill.) para realizar trabajos multidisciplinarios. Por tal se ha propuesto realizar investigaciones a nivel de campo con los cultivos que se siembran en mayor proporción en el estado de Durango: frijol (*Phaseolus vulgaris*, L) y maíz (*Zea mays*). La plaga a controlar en el primer cultivo la causada por el coleóptero *E. varivestis* (conchuela del frijol), la cual ocasiona graves pérdidas (del 25 al 100%) en la región del Llano de Durango (INIFAP, 1992); y en el segundo, las causadas por los lepidópteros de los géneros *Heliothis virescens* (gusano barrenador) y *Spodoptera exigua* (gusano soldado) y *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor). Las ventajas que ofrece Bt sobre control de plagas, como alta especificidad, baja residualidad y por ende menor posibilidad de desarrollo de resistencia por el insecto, así como su bajo impacto en el deterioro del ambiente son los principales motivos que nos llevaron a planear los trabajos de campo con este microorganismo. De cualquier forma, la estabilidad de Bt es muy baja (en un día su potencia disminuye a la mitad), e incrementar la misma en una proporción que permita mayor protección cultivo por el ataque de plagas es un punto clave dentro de su empleo como efectivo control biológico. Con respecto a esto nos preguntamos: ¿El empleo de maíz nixtamalizado como matriz de formulados granulares ayudará a aumentar la persistencia de Bt en campo? ¿Las cepas aisladas de México muestran actividad tóxica similar a la de los formulados comerciales a base de Bt a nivel de campo? ¿Dichas cepas son seguras para liberarse en campo? ¿Hasta que punto los formulados microcapsulados protegen la protoxina de Bt de los rayos solares y la lluvia? ¿Es el maíz nixtamalizado una buena matriz del microcapsulado o existen otras opciones mas viables? ¿Se reflejarán los resultados observados en bioensayos de laboratorio en evaluaciones de campo? Para responder a estas preguntas planteamos lo siguiente...

HIPOTESIS

Los formulados granulares y microcapsulados a base de maíz nixtamalizado ayudarán a proteger la protoxina de cepas nativas *Bacillus thuringiensis* de los factores ambientales y aumentarán la persistencia del mismo al aplicarse en campo para control efectivo de plagas, logrando tener un bioinsecticida que se pueda comercializar, aplicarse en cualquier tipo de cultivo y elaborado con materiales seguros y de menor costo.

OBJETIVO GENERAL

Elaborar formulados granulares y microcapsulados de diferentes serovariedades de *Bacillus thuringiensis* y evaluarlos a nivel de laboratorio, invernadero y campo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I) Caracterizar, en base a los lineamientos propuestos por la EPA para Bt, ocho cepas de las serovars. *aizawai*, *gallierae*, *kumomatoensis*, *krustaki* y *morrisoni*® para su uso seguro en pruebas a nivel de campo.
- II) Evaluar a nivel de campo formulados granulares de diferentes serovariedades de Bt para el control de plagas de lepidópteros.
- III) Elaborar formulados microcapsulados a base de matrices de harina nixtamalizada y almidón de maíz, para su aplicación por aspersion.
- IV) Evaluar la actividad tóxica de los microcapsulados en pruebas de invernadero y campo para el control del coleóptero *Epilachna varivestis*

MATERIALES Y METODOS

La descripción de la metodología se encuentra dentro de los artículos que se generaron como resultado de la presente tesis. La forma en que se realizaron los bioensayos se encuentra descrita en el capítulo del libro editado por la Academic Press. El orden en que estos aparecen dentro del texto es el siguiente:

Artículos:

- I. Characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* toxic for lepidopteran and coleopteran larvae
- II. New granular formulations based on corn meal with different serovar. of *Bacillus thuringiensis*
- III. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*
- IV. *Bacillus thuringiensis* microencapsulated formulation for control of the coleopteran *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinelidae)

Capítulo en Libro: *Bacillus thuringiensis* bioassays into artificial diets. 1995. In: Manual of techniques in insect pathology. L. A. Lacey . (ed.). Academic Press, England (en prensa).

Patente: Microcapsulación de pesticidas (en trámite).

RESULTADOS

Como forma de presentación del presente trabajo doctoral, nos permitimos adjuntar las publicaciones que se tienen listas como resultado del desarrollo experimental del trabajo, de las cuales, la patente ya se tiene registrada, el capítulo ha sido aceptado para publicación y los artículos han sido revisados y se encuentran listos para ser enviados a revisión. El orden de presentación de los mismos en el texto es el siguiente:

Artículos:

- I. Characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* toxic for lepidopteran and coleopteran larvae
- II. New granular formulations based on corn meal with different serovar. of *Bacillus thuringiensis*
- III. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*
- IV. *Bacillus thuringiensis* microencapsulated formulation for control of the coleopteran *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae)

Capítulo en Libro: *Bacillus thuringiensis* bioassays into artificial diets, 1996. In: Manual of techniques in insect pathology. L. A. Lacey . (ed.). Academic Press, England (en prensa).

Patente: Microcapsulación de pesticidas (en trámite).

For: Southwestern Entomologist

Send correspondence to:

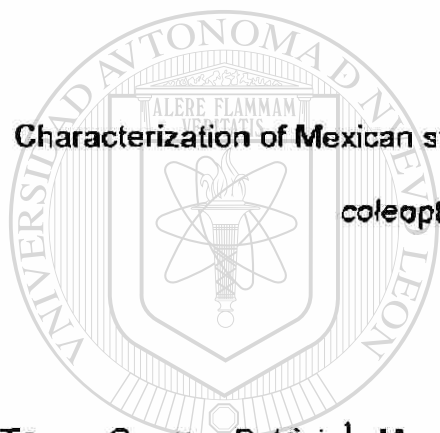
Patricia Tamez-Guerra

Dpto. de Microbiología e Inmunología

Fac. de Ciencias Biológicas UANL. A P. 414.

Pedro de Alba y Manuel Barragán Sur.

San Nicolás de los Garza, N. L. México. 66450



Characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* toxic for lepidopteran and coleopteran larvae for EPA certification.

UANL

Tamez-Guerra, Patricia¹, Ma. Magdalena Iracheta-Cárdenas², Luis J. Galán-Wong¹,
Benito Pereyra-Alferez^{2,4}, and Ma. Cristina Rodríguez-Padilla³.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

¹Lab. de Microbiología Industrial y Suelo. ²Lab. de Genética y Biología Molecular. ³Lab. de Inmunología. Dpto. de Microbiología e Inmunología. F. Ciencias Biológicas. UANL. A. P. 414. San Nicolás de los Garza. México. 66450.

⁴To whom reprint requests should be sent.

ABSTRACT

Several *Bacillus thuringiensis* strains isolated from dead larvae and soil samples from cultivated fields located in northeast Mexico were characterized and compared with HD strains. These isolates were tested against lepidopteran (*Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni*) and coleopteran (*Epilachna varivestis*) pests and those showing high toxicity were subjected to the biological tests proposed by the EPA. We chose nine *B. thuringiensis* strains, five of the Howard Dulmage collection designated HD-73, HD-187, HD-193, HD-263 and HD-530 and four Mexican strains named C-4, C-9, GM-7 and GM-10. These strains were characterized by their flagellar serotype and identified as the serotypes *kurstaki* (HD-73, HD-187, HD-262, HD-530), *aizawai* (GM-7, GM-10), *galleriae* (HD-193), *morrisoni* (HD-530), and *kumamotoensis* (C-4, C-9). The results showed that there was no relation between them among the host range, serotype, molecular weight of the insecticidal crystal proteins (ICP), biochemical metabolism, antibiotic resistance and plasmid patterns. GM-7 and GM-10 were sensitive to R-41 and CP-51 phages. C-4 and C-9 strains showed toxicity against the coleopteran *E. varivestis*, and produced ulcers in mice, like a β -exotoxin producing strain (HD-41). Immunoblot of ICP's showed that strains killing lepidopteran larvae crossreacted with a polyclonal antiCryIA_b and/or antiCryIA_c antiserum in ca. 70 and 120-130 KDa protein bands. These results indicate that the CryIA is present.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*, characterization, coleopteran, lepidopteran.

Use of microbial control agents has specific advantages over synthetic chemical insecticides. Microbial agents are usually highly specific, affecting only the target pests, allowing beneficial insects and natural predators of the pests to survive. There is little or no environmental impact associated with use of microbial agents and they are safe for the workers handling them. *Bacillus thuringiensis* is the most widely used of these agents. Its major advantages are that it can be grown in bulk by conventional industrial liquid fermentation making it relatively inexpensive to produce, although it still costs more to produce than most synthetic chemical insecticides; it is stable in storage; it is pathogenic to many of the world's major crop pests; and, once applied, it does not persist in the environment. In addition, reports of resistance developing in a target pest in the field are rare (Meadows, 1992).

B. thuringiensis synthesizes a parasporal inclusion (crystal) named δ -entotoxine, which is toxic to several insect orders and it can be composed of one or several insecticidal crystal proteins (ICP). *B. thuringiensis* spore preparations have been registered as insecticides since 1961, and considerable toxicologic data has been collected over the years. Prior to the early 1970's, some *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* spore preparations contained a toxic substance known as β -exotoxin. This toxin is a nucleotide analog that inhibits RNA synthesis and is distinct from δ -endotoxin (Goldburg & Tjaden, 1990). Because of this, for registration of *B. thuringiensis* strains for use in biological control, they need to be analyzed by both laboratory and field tests.

For experiments at the field level, the Environmental Protection Agency (US-EPA, 1988) published guidelines for those strains with high insecticidal potency.

Regulations are necessary to avoid contamination with *B. thuringiensis* products. The organism used needs be an authentic strain of *B. thuringiensis*, grown in pure culture with adequate controls to avoid any change in the characteristics of the original strain or contamination with other organisms. Before use, each lot needs to be tested by subcutaneous injections with one million or more spores into five 17 to 23 gram mice which remain healthy for seven days post injection (Betz *et al*, 1990).

In Mexico, *B. thuringiensis* bioinsecticide use is still not extensive, because the manufacturing technology is in development and the available commercial products are imported and more expensive. We isolated 400 *B. thuringiensis* strains from soil or dead larvae. Of these, we selected four strains, two of which were highly toxic against lepidopteran and two which were toxic against lepidopteran and the coleopteran *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle). Because of the possibility of using these strains for bioinsecticide production in Mexico, we characterized four Mexican strains following the EPA (1988) and Betz *et al* (1990) recommendations and compared the differences vs five HD strains, which showed high toxicity 13 years after production by Howard Dulmage *et al* and storage in FCB-UANL (Galán-Wong, 1994).

Material and Methods

***B. thuringiensis* strain history.** All the HD strains (HD-73, HD-187, HD-193, HD-263, and HD-530) were obtained from International Collection of Entomopathogenic *Bacilli* (Fac. de Ciencias Biológicas, UANL, Mexico). The *B. thuringiensis* isolated in Mexico, C-4, C-9, GM-7, and GM-10 are placed in the same collection.

Biochemical data. The strains were biochemically tested following the guidelines given in Bergy's Manual (Sneath *et al*, 1986), for *B. thuringiensis*. The growth and fermentation were tested in a different media containing salts with 10.0 g/1000 ml of sorbitol, glucose, arabinose, melobiose, sucrose, raffinose, lactose, glycine, manittol, urea, maltose, dulcitol and celobiose as carbon source. Other characteristics were gelatinase activity; arginin, lysine, and ornitin decarboxylase; growth on thioglycolate; α and β hemolysis, and oxidase, peroxidase, caseinase, amylase, and catalase activity using Difco™ media following the manufacturer's guidelines. All the tests were done using tubes or petri dishes, with three replications. Each strain was inoculated and the tubes and dishes were incubated at 37°C for 48-72 h.

Flagellar antigen serotype analysis. The serotype analysis was based on serological tests using the *B. thuringiensis* antigenic flagellar reaction (H antigen, De Barjac & Bonnefoi, 1962; De Barjac y Frachon, 1990).

Antibiotic resistance patterns. The strains were grown on nutritive broth (Difco™) for 18 h and grown petri dishes with nutritive agar (Difco™). At this time antibiotic multidiscs for Gram (+) (Rigaux™) were placed. After this, the cultures were incubated at

37°C for 24-48h. The inhibition zones of susceptible strains to each antibiotic were detected visually.

Protein profile of the insecticidal δ -endotoxin produced. The strains were grown on nutrient agar (Difco) petri dishes. The dishes were incubated at 30°C until 95% sporulation (3-4 days). Double distilled water (5 ml) was added and the cultures were harvested by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C in a JA-21. The pellets were washed two or three times with double distilled water and loaded on a polyethylene glycol 4000 (PEG) gradient. The gradient was prepared with 11.0 g PEG (Sigma Chemical Corp. St Louis, MO, USA); 34.0 ml of 1.0 M pH 7.4 phosphate buffer; and 5 ml spore-crystals mixture. The mixture was centrifuged at 1000 rpm for 3 min. The crystal phase (interface) was separated and washed twice with double distilled water and stored at -20°C until needed. The crystals were mixed with an equal volume of double-strength SDS-PAGE sample buffer (Tris 0.25 M, SDS 4%, glycerol 20%, and 2- β -mercaptoethanol 10%) and heated at 100°C for 5 min (Nagamatsu *et al*, 1984). The extracts were assayed by SDS-PAGE carried out in 10% polyacrylamide on 1.5 mm thick gel. Gels were run in a VERY SMALL II VERTICAL SLAB UNIT (Hoefer). 10% acrylamide gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue (Laemmli, 1970). Molecular weights were estimated by comparison to these standard proteins (molecular weights in parentheses -kDa-): α_2 -Macroglobulin reduced (170), β -galactosidase (116.4), fructose-6-phosphate-kinase (85.2), glutamate dehydrogenase (55.6), aldolase (39.2), triosephosphate isomerase (26.6).

Inmunoblot. Discontinuous buffer SDS-PAGE was performed in 10% polyacrylamide gels. Separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes

using a Tris-glycine buffer. After transfer, membranes were blocked in TBS buffer containing 2% Tween 20. The membranes were then incubated in TBS -antiCry. The antiCry used were polyclonal antiCryIAb, antiCryIAc, and antiCryIIa. The nitrocellulose membranes were then washed and developed as previously described (Towin *et al*, 1979).

Plasmid profiles. Plasmid profiles were detected using Gonzalez' method (Gonzalez *et al*, 1981) modified as following. Nine strains were reactivated on petri dishes on nutritive agar for 18 h at 37°C, and grown in nutritive broth for 14-22 h at the same temperature (before sporulation). The culture was centrifugated at 10,000 rpm for 3 min, and washed one time with water. We used the Gonzales technique after this. Gels were stained with 0.5 mg of ethidium bromide per ml and photographed through a red filter on Polaroid type 107 film.

Bioassays. The strain was tested against both first instar larvae of the coleopteran *E. varivestis* on bean leaves and the lepidopteran *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni* using diet incorporation bioassays. For *E. varivestis*, the leaves were inoculated with 100 ml of each concentration on an marked area of 33 cm² and allowed to dry. The concentrations employed were 10, 25, 50, 100, and 250 mg/50 ml of spore-crystal complex or active ingredient of the microencapsulated formulation. A disk was cut from each leaf and put in a plastic dish. Each leaf was infested with three larvae using five repetitions by treatment and one negative control. The dishes were maintained in a room at 25°C ± 3°C, and 65% ± 5% relative humidity (RH) for five days and supplied with one leaf each third day. The LD₅₀ was obtained using the Probit statistical method (SAS, 1989). The

bioassays with the lepidopteran *Helicoverpa zea*, *Heliothis zea*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni* were made using first instar larvae and artificial media (Castro-Franco *et al.*, 1995). The concentrations employed were 5, 10, 13, 15, 25, 50, and 100 µg/ml, with three replications and 25 larvae/replication, one larva per container. Each treatment was maintained at 28°C ± 5°C and 65% ± 5% of RH for one week. LD₅₀'s were obtained in the same way as the coleopteran larvae.

Sensibility to phages. We used the R-41 and CP-51 phages. These phages and *Bacillus cereus* strain NRRL 569 were supplied by Molecular Biology laboratory (FCB, UANL, México). The phages were grown on *B. cereus*, and separated by filtration using 0.22µm Milipore™ membranes to obtain the phage solution. GM-7, GM-10, and HD-73 strains were grown on YP medium (Krieg, 1981), for 24-48 hrs, at 37°C. After this, 200 µl of the culture was mixed on 3 ml YPA media (semisolid), and transferred to a nutritive agar petri dish. When the YPA was solid, one drop of phage solution was added. Each dish was incubated at 37°C for 24-48 h. The inhibition zones were visually detected.

Mouse subcutaneous cytotoxicity test. This test was based on Betz *et al.* (1990). Mexican strains were tested using the HD-41 strain as a positive control. It is reported to be a β-exotoxin producer (Arévalo-Niño & Galán-Wong, 1994). Each strain was grown on nutritive broth (Difco™) until sporulation. Spore numbers were counted using a New Bower camera. Tubes were centrifuged at 2,000 rpm for spore precipitation and the pellets were resuspended in phosphate buffer (PBS). Six mice of 17-23 g were subcutaneously injected with approximately one million two thousand PBS-spores of each strain and a negative control injected with PBS only. The mice were maintained for eight days and then cytotoxic

activity was determined. In the case of infection or death of the mice, to be sure that the ulcers were produced by the strain injected, we took a tissue sample (0.5 grams approximately) and ground it in a sterilized mortar in PBS buffer. After this, we took 10 μ l of this solution and inoculated it on nutritive broth tubes. Tubes were incubated for 36 h at 35 °C (until sporulation). Then the tubes were subjected to thermic shock in water at 80 °C for 10 min and inoculated into petri dishes with nutritive agar. The inoculated dishes were place at 35 °C for 48-36 h to grow *B. thuringiensis*. In addition, the tissue samples were histopathologically examined by the Giemsa technique.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Results

***B. thuringiensis* strains history.** C-4 and C-9 strains were isolated from dead larvae of *E. varivestis* in Durango, Mexico. GM-7 and GM-10 were isolated from cultivated soil located in Valle del Yaqui, Son., Mexico. All Mexican strains have bipyramidal crystal. The size of the GM-7 crystal is approximately 1.6 μ , and the GM-10 crystal is approximately 0.87 μ .

Biochemical and morphological data. The *B. thuringiensis* strains showed differences between each carbon source utilization. All the strains fermented glucose and arabinose, assimilate maltose, dulcitol and celobiose, except HD-530 strain, which fermented (acid production) the two last carbon sources. The rest of the strains were variable metabolism with the different source carbone (Table 1). We can see the same respect the metabolic activity on different substrates (Table 2). All the strains produced acid on ornitin decarboxylase, can hydrolyzed casein, and exhibited catalase activity. No one grow on citrate or produced oxydase. All given negative response to indol.

Flagellar antigen serotype analysis. Serological results showed that C-4 and C-9 strains are serovar *kumamotoensis*; GM-7 and GM-10 strains are *aizawai*; HD-73, HD-187 and HD-263 strains are *kurstaki*; the HD-193 strain is *galleriae*; and the HD-530 strain is *morrisoni*.

Antibiotic resistance patterns. In this test, in general, GM-10, HD-187, HD-263, and HD-530 were more resistant to antibiotics (Table 3). All the strains were sensitive to cefuroxime (30 mg), erythromycin (15 mg), gentamicin (10 mg), penfloxacin (5 mg),

and tetracycline (30 mg). Only C-4, GM-7 and HD-530 were sensitive to trimethoprim-sulfamethoxazol.

Description of the insecticidal toxins produced. Protein profiles showed that all the strains tested had a protein band of 120-130 Kda. Immunoblot assays showed that the strains crossreacted with a polyclonal antiCryIAb antiserum in a band of ca. 120 KDa. The C-9 and HD-193 crossreacted with a polyclonal antiCryIAC antiserum, in a band of ca. 120 and ca. 70 KDa respectively (Fig 1 y 2).

Plasmid profiles. *B. thuringiensis* strains tested showed variable plasmid profiles (Fig 3). C-4, GM-10, HD-73, and HD-263 showed five different plasmids; GM-7 four, HD-187 three, and C-9 and HD-193 two plasmids.

Bioassays for insect toxicity. In general, the HD-263 strain (*kurstaki*) was shown to be more toxic against the lepidopteran larvae, better than the HD-1-S-1980 control (LD₅₀ -µg/ml- of 3.5, 15.6, 18.8 and 5.6 with HD-263; vs 22.3, 16.7, 26.3 and 19.8 with

HD-1-S against *H. virescens*, *H. zea*, *S. exigua* and *T. ni* respectively)(Table 4). GM-7 and GM-10 were as toxic as HD strains against *H. virescens* and *T. ni* larvae, but less toxic against *S. exigua* larvae vs HD-1-S (LD₅₀ -µg/ml- of 30.8 and 35.5 with GM-7 and

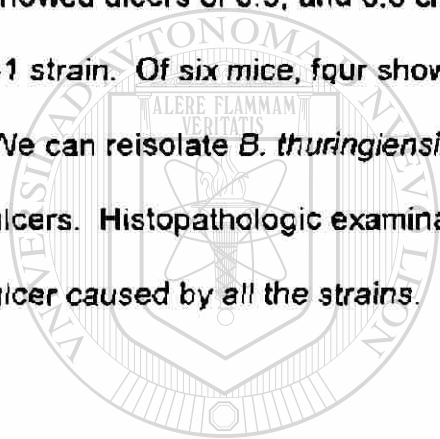
GM-10 vs 31.7, 31.0 and 22.3 with HD-187, HD-193 and HD-1-S against

H. virescens respectively; 73.7 and 44.4 vs 39.8, 92.8 and 26.3 against *S. exigua* respectively; 22.2 and 18.5 vs 25.7, 17.4 and 19.8 against *T. ni*, respectively). C-4

shown the lowest toxicity value compared to GM-7 and GM-10 (LD₅₀ of 241 vs 30.8 and 35.4 against *H. virescens*; 66.3 vs 73.3 and 44.4 against *S. exigua*; 29.3 vs 22.2 and 18.5 against *T. ni*, respectively). C-9 was least toxic against lepidopteran larvae (LD₅₀

of 219.35 $\mu\text{g/ml}$ against *T. ni*), but showed more activity against *E. varivestis* larvae than the C-4 strain (LD_{50} of 397 $\mu\text{g/ml}$ vs 587 $\mu\text{g/ml}$ of C-4). C-4 and C-9 showed toxicity against *E. varivestis* larvae only (Table 4).

Mouse subcutaneous toxicity test. Cytotoxic tests demonstrated that C-4 can produce ulcers similar to that of the HD-41 strain (β -exotoxin producer). Of six mice tested, two C-4 injected showed ulcers of 0.4 and 0.7 cm and two HD-41 mice injected showed ulcers of 0.5, and 0.8 cm. The C-9 strain produced larger ulcers than the HD-41 strain. Of six mice, four showed ulcers of 0.7, 0.8, 1.0, and 1.3 cm, respectively. We can reisolate *B. thuringiensis* of the C-9 and HD-41 ulcers, but not of the C-4 ulcers. Histopathologic examinations revealed necrotic and lymphocytic areas in the ulcer caused by all the strains.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Discussion

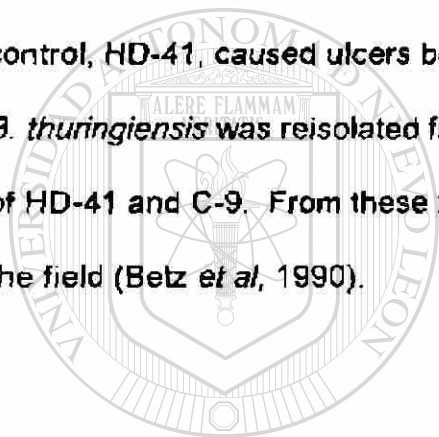
The possibility of using strains of *B. thuringiensis* with high insecticide activity has led to numerous studies, among which are field trials to control crop pests. The proof of results obtained in laboratories and greenhouses is carried out in this manner.

As with chemical insecticides, registration of biological pesticides is the first step in wide spread commercialization. In order to obtain registration, it is necessary to characterize the strains of *B. thuringiensis*. Therefore, we consider it essential to evaluate the Mexican strains that show activity against coleopteran and lepidopteran larvae according to the protocol put forth by the EPA.

The results show the strains isolated in Mexico have insecticidal activity similar to those in the HD collection (LD₅₀ of 30.8 and 35.5 µg/ml for GM-7 and GM-10 compared with 31.7, 31.0 and 3.5 µg/ml for HD-187, HD-193 and HD-263 respectively against *H. virescens*; 73.7 and 44.4 µg/ml compared with 39.8, 92.8 and 18.8 µg/ml respectively against *S. exigua*; 22.2 and 18.5 µg/ml compared with 25.7, 17.4 and 5.6 µg/ml respectively against *T. ni*). In addition, the different degrees of activity of the different serovars and strains against different insects that were observed were in agreement with the earlier report of Percy and Fast (1983). In this respect, C-4 showed the lowest toxicity compared with GM-7 and GM-10. GM-7 and GM-10 also were susceptible to attack by phages PC-51 and R-41, which can be undesirable in the field (Debabov *et al*, 1984). Therefore, it is desirable that the strain be free of phages (Barack *et al*, 1988). However, EPA omits this requirement (US-EPA, 1988).

The molecular weight of the PCI from strains with activity against lepidopteran corresponds to that reported for these serovar (ca. 120 KDa). Strains C-9 and HD-193 possess a protein of ca. 120 and 70 KDa respectively that reacts with AntiCryIAc. We also found that strains that demonstrate toxic activity against coleopteran are capable of producing damage similar to that reported for β -exotoxin producing strains in female Balb/C mice. Of six mice injected per group, C-9 caused raw ulcers 0.7 to 1.3 cm in four of them; C-4 produced similar ulcers (0.5 cm) in only two mice and the positive control, HD-41, caused ulcers between 0.4 and 0.8 cm in three of the mice.

B. thuringiensis was reisolated from the lesions only from mice inoculated with spores of HD-41 and C-9. From these results, only GM-7 and GM-10 can be used safely in the field (Betz *et al*, 1990).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Literature cited

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

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

Castro-Franco, R., J. S. García-Alvarado, L. J. Galán-Wong, and A. Gallegos-del Trejo. 1995. Efecto sinérgico de extractos de *Agave lechuguilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith). *PHYTON.* 57: 113-119, 1995

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

De Barjac, H., and A. Bonnefoi. 1962. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* de type *B. thuringiensis*. *Entomophaga.* 7: 5-31.

De Barjac, H., and F. Franchon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga.* 35: 233-240.

Krieg, N. R. 1981. Enrichment and isolation. In: , *Manual of methods for General Microbiology*. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips -eds. American Society for Microbiology. Washington, DC. USA. 140 p.

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

González, Jr., J. M., Howard T Dulmage, and B. C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmid and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5: 351-365.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685.

Meadows, M. P. 1992. Environmental release of *Bacillus thuringiensis*. In: *Release of genetically engineered and other micro-organisms*, J. C. Fry and M. J. Day - ed. Cambridge University Press, New York, N. Y., USA. 120-136 p.

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

SAS Institute. 1989. *SAS user's guide: statistics* SAS Institute. Cary, N. C., USA.

Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming Gram positive rods and cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt -eds. Williams & Wilkins. Baltimore, MD., USA. Vol. 2. 1104-1138 p.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.

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

Table 1. *B. thuringiensis* assimilation and fermentation of several carbon sources

Carbon source	<i>Bacillus thuringiensis</i> strains							
	C-4	C-9	GM-7	GM-10	HD-187	HD-193	HD-263	HD-530
Sorbitol	+	+	+	a	+	a	+	a
Melbiiose	+	+	a	+	a	a	a	a
Saccharose	a	a	a	-	-	-	-	a
Rafinose	+	+	+	+	a	a	+	a
Lactose	a	+	-	+	a	a	a	a
Glycine	+	+	-	a	+	+	+	-

1. + growth, - no growth, a acid production

Table 2. Some biochemical responses of *Bacillus thuringiensis* strains

Strain activity ²	<i>Bacillus thuringiensis</i> strains ¹							
	C-4	C-9	GM-7	GM-10	HD-187	HD-193	HD-263	HD-530
Arginine decarboxylase	a	a	b	a	a	b	a	a
Lysine decarboxylase	a	b	b	a	a	b	b	a
Blood hemolysis	β	+	+	β	+	α	-	+
Lechitinase	-	-	-	-	-	+	-	+
Amylase	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-

1. a acid production, b alcali production, + growth, - no growth, α and β hemolysis

Table 3. *Bacillus thuringiensis* antibiotic resistance patterns

Antibiotic ¹	Dose	<i>Bacillus thuringiensis</i> strains							
		C-4	C-9	GM-7	GM-10	HD-187	HD-193	HD-263	HD-530
Ampicillin	10 µg	-	-	+	+	+	-	+/-	-
Cefalotoxin	30 mg	-	+	+/-	+	+/-	-	+	+
Ceftaximide	30 mg	-	+	+/-	+/-	+	-	+	+
Dicloxacillin	1 mg	+	+	+	+	-	+	+	-
Penicillin	10 UI	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+
Trimesuxsol ²	26 mg	-	+	-	+/-	+	+	+	-

¹. + Inhibition, - Resistancy, +/- Slighty inhibition.

². Trimethoprim-sulfametoxasol

Table 4. LD₅₀ and LD₉₀ of six strains of *B. thuringiensis* for lepidopteran larvae.

Strains		<i>Helicoverpa virescens</i>		<i>H. zea</i>		<i>Spodoptera exiguua</i>		<i>Trichoplusia ni.</i>	
		LD ₅₀	Conf. Interval	LD ₅₀	Conf. Interval	LD ₅₀	Conf. Interval	LD ₅₀	Conf. Interval
HD-1-S	LD ₅₀	22.3	18.2-27.48	16.7	13.5-28.8	26.3	21.5-32.1	19.8	12.8-29.3
	LD ₉₀	95.3	57.1-257.3	71.2	34.6-290	127.9	81.0-311	82.5	58.3-187
C-4	LD ₅₀	241	45.2-1287	24.3	19.9-37.2	66.3	39.2-112	29.3	18.2-43.7
	LD ₉₀	5110	157-4.4x10 ⁶	88.6	52.2-196	1195	264-2.2x10 ⁵	772	140-2.1 x10 ⁵
C-9	LD ₅₀	n.d.		n.d.		n.d.		219	156-668
	LD ₉₀	n.d.		n.d.		n.d.		5762	398-2.5x10 ⁵
GM-7	LD ₅₀	30.8	24.8-38.4	n.d.		73.7	26.3-145	22.2	10.6-44.2
	LD ₉₀	162	97.1-438	n.d.		300	167-3366	86.1	57.9-203
GM-10	LD ₅₀	35.4	27.5-45.6	n.d.		44.4	29.3-68.9	18.5	12.8-39.4
	LD ₉₀	227	120-775	n.d.		248	178-472	69.4	34.6-99.3
HD-187	LD ₅₀	31.7	23.5-42.8	19.3	12.7-30.2	39.8	20.4-53.4	25.7	10.0-42.9
	LD ₉₀	175	82.3-762	439	106-6893	289	91.8-2685	854	29-3.3 x10 ⁵
HD-193	LD ₅₀	31.0	22.7-42.2	14.4	10.6-27.7	92.8	34.3-250.7	27.4	15.0-34.2
	LD ₉₀	190	84.0-940	94.4	53.7-246	1794	151-2.1 x10 ⁶	53.6	38.7-101
HD-263	LD ₅₀	3.50	1.1-11.0	15.6	9.74-25.3	18.8	14.7-24.0	5.61	4.57-6.88
	LD ₉₀	51.1	32.8-120	177	45.9-2477	135	62.2-611	24.2	17.7-44.5

Against *E. varivestis* only C-4 (LD₅₀ = 587 ~388-2.8x10⁶ IC, µg/ml), and C-9 (LD₅₀ = 397 ~264-2.3x10⁵ IC, µg/ml).

Probit statistic (SAS, 1989) with the confidence interval of 95%. n. d. not determined

Supported by grant of CONACYT 3559-N9311

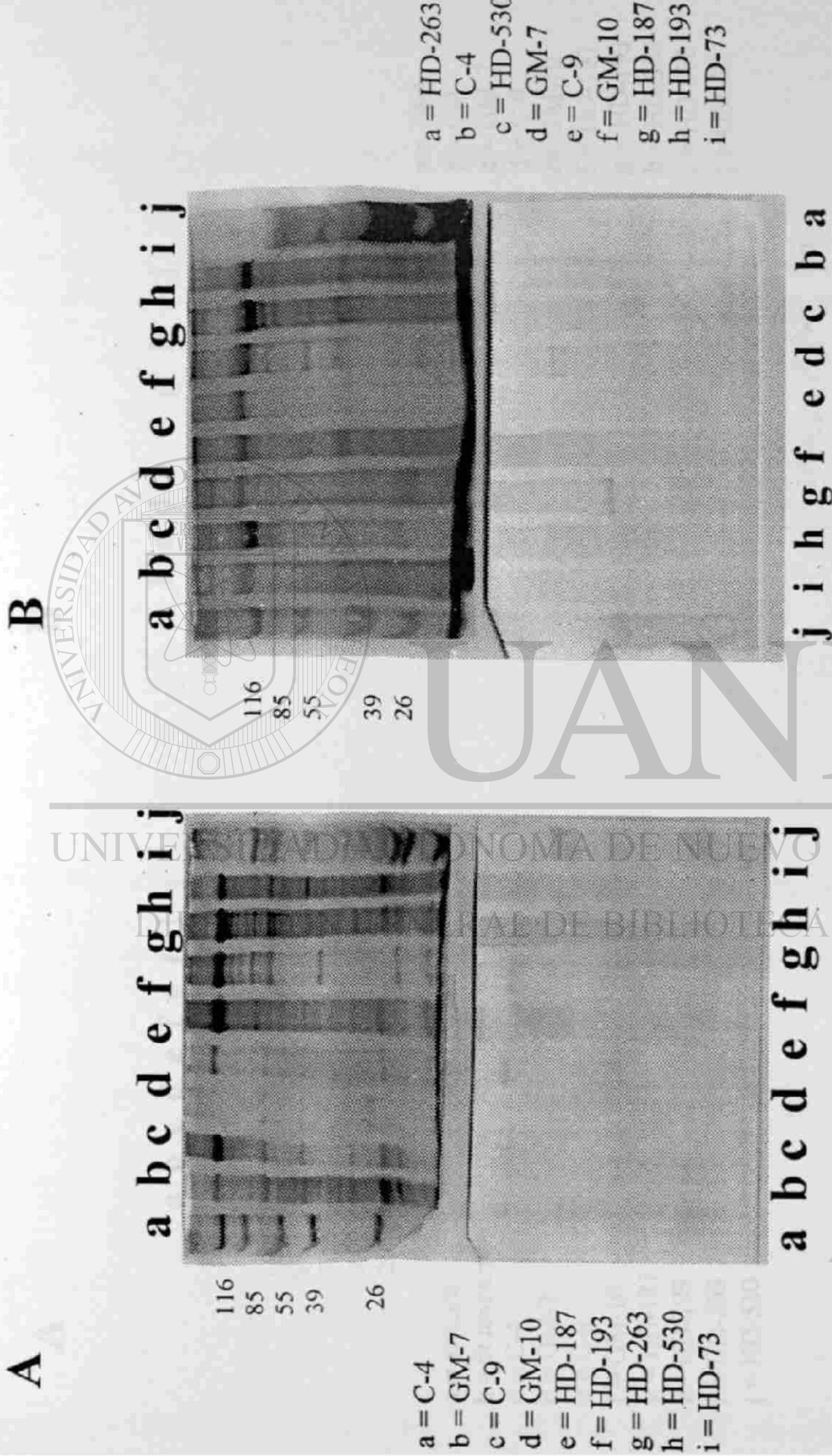
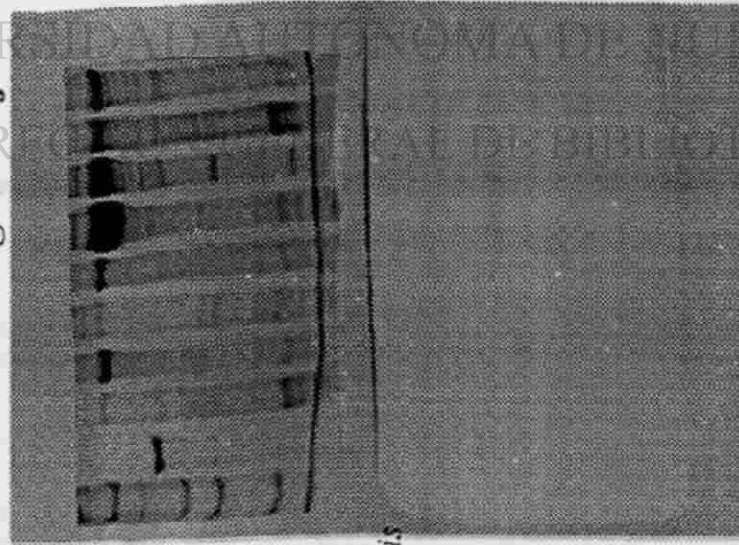


Fig. 1. Protein profiles and immunoblot of Mexican and HD strains assayed with antiCryIAb (HD-1; A) and antiCryIAc (HD-73; B)

A

a b c d e f g h i j

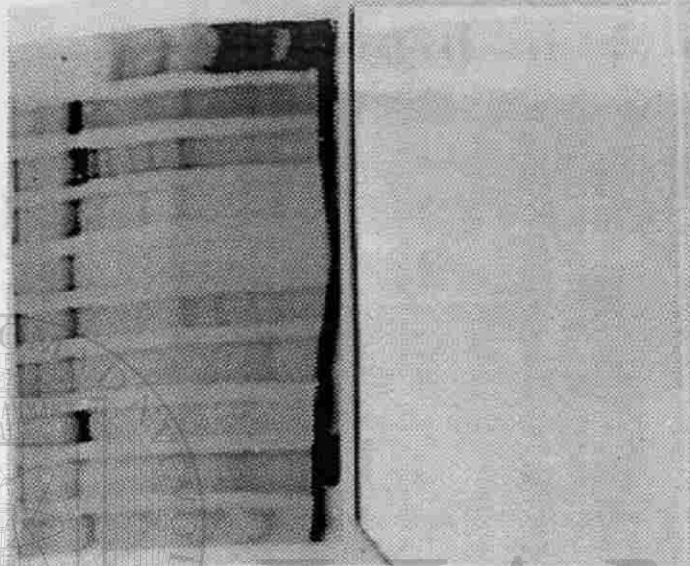


a = standard
b = *Bt tenebrionis*
c = C-4
d = GM-7
e = C-9
f = GM-10
g = HD-187
h = HD-193
i = HD-263
j = HD-530

116
85
55
39
26

B

a b c d e f g h i j



a = BSA
b = C-4
c = GM-7
d = C-9
e = GM-10
f = HD-187
g = HD-193
h = HD-263
i = HD-530
j = GM-33

Fig. 2. Protein profiles and immunoblot of Mexican and HD strains assayed with antiCryIII A (*Bt tenebrionis*; A) and antiCryIII C (GM-33; B)

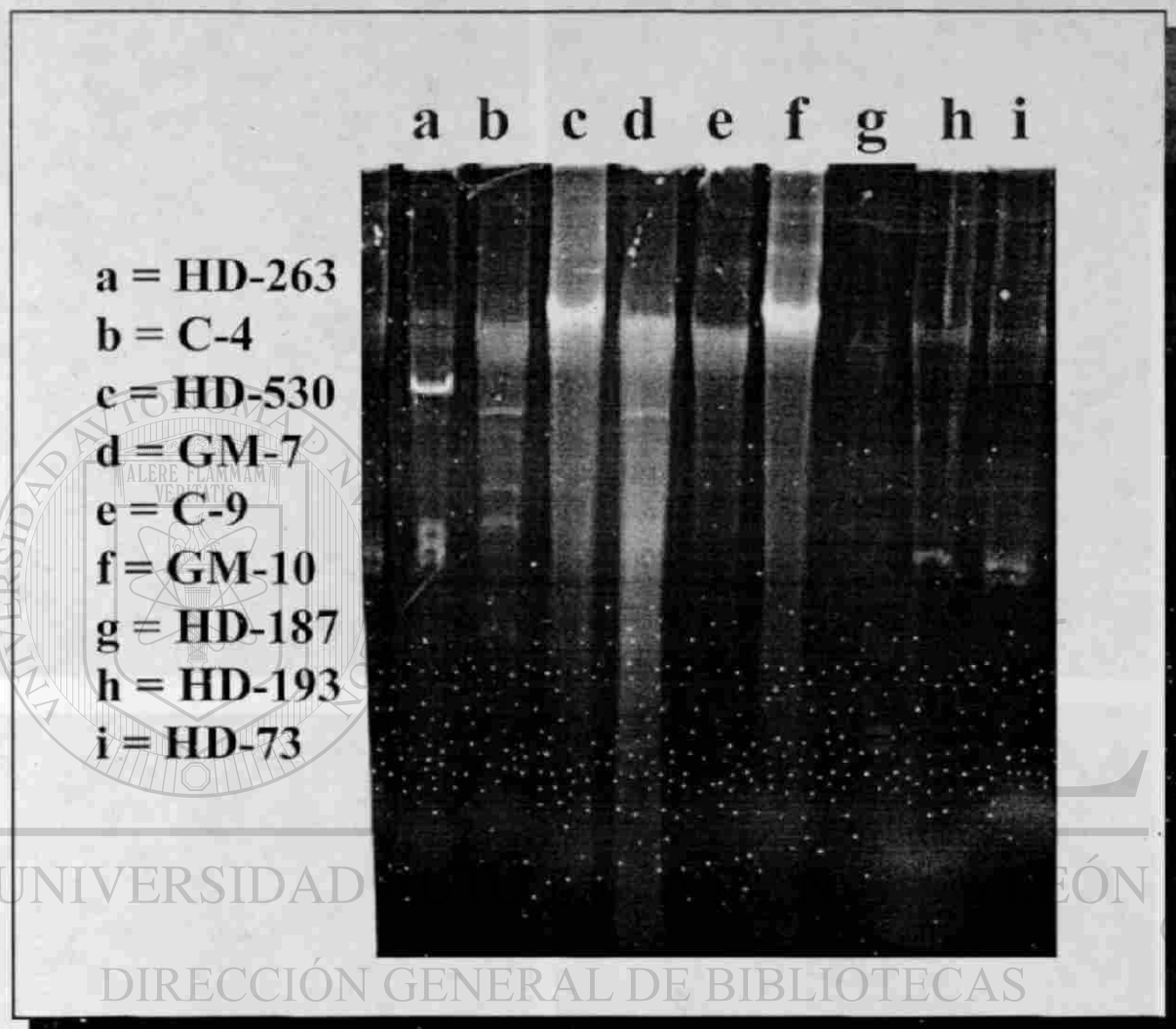


Fig. 3. Plasmid profiles of Mexican and HD strains

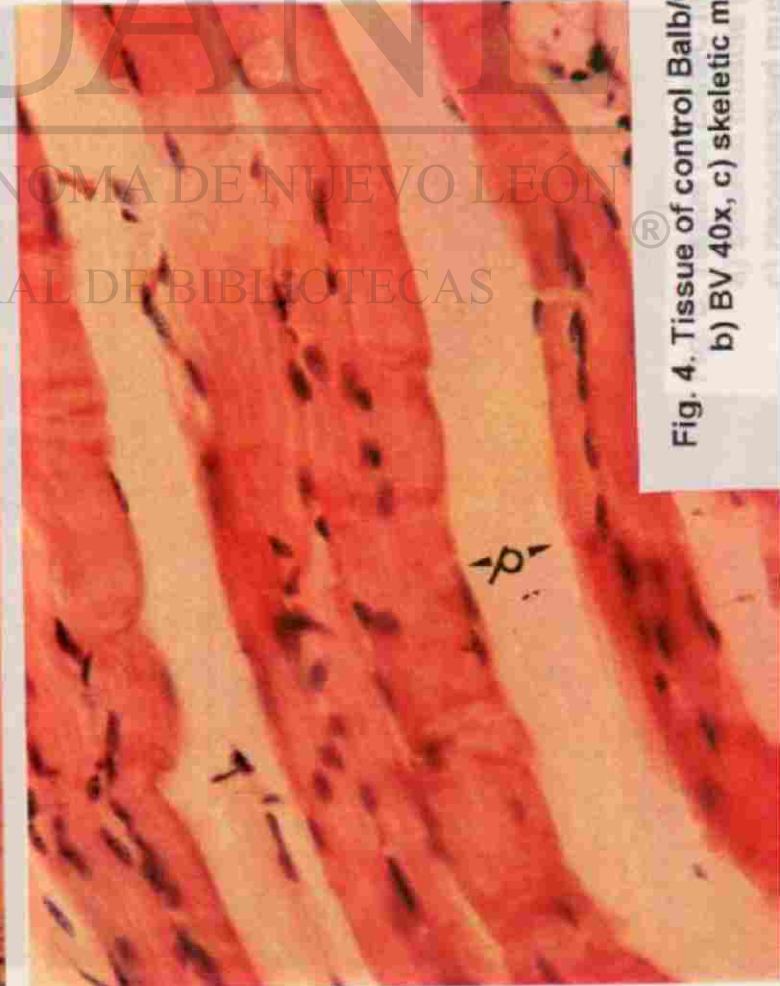
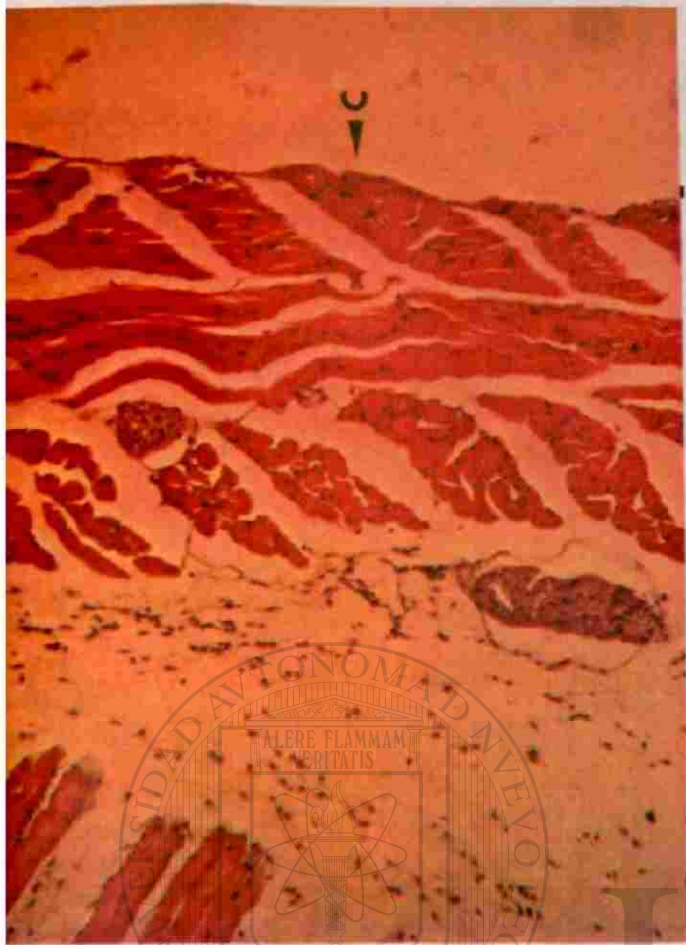


Fig. 4. Tissue of control Balb/C mouse. a) Blood vessel (BV10x), b) BV 40x, c) skeletal muscle (EM10x), d) EM 40x.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UANI

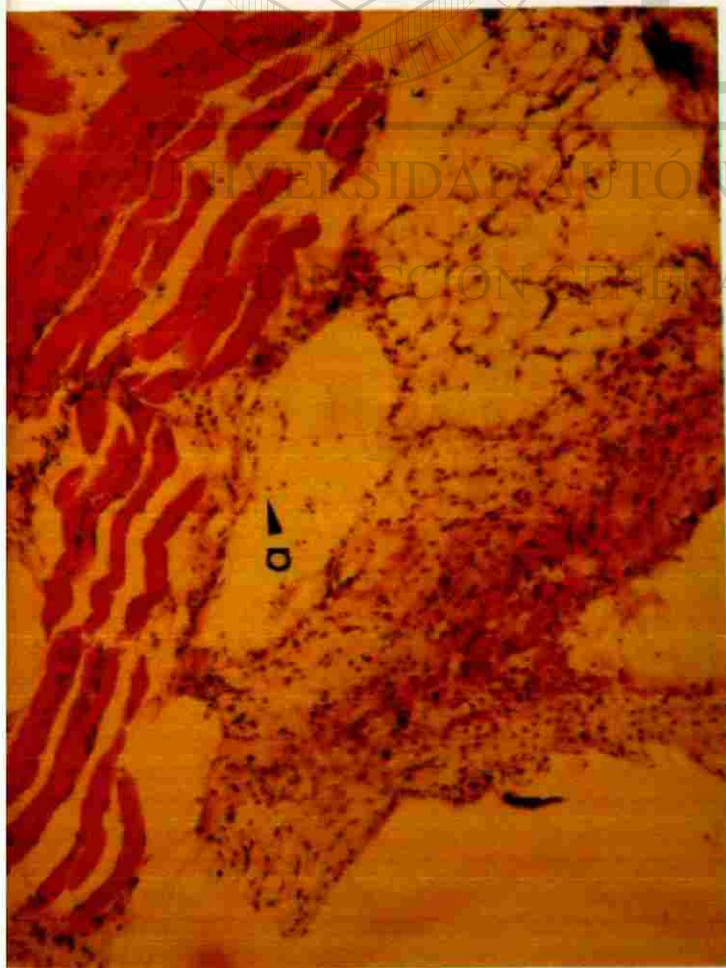
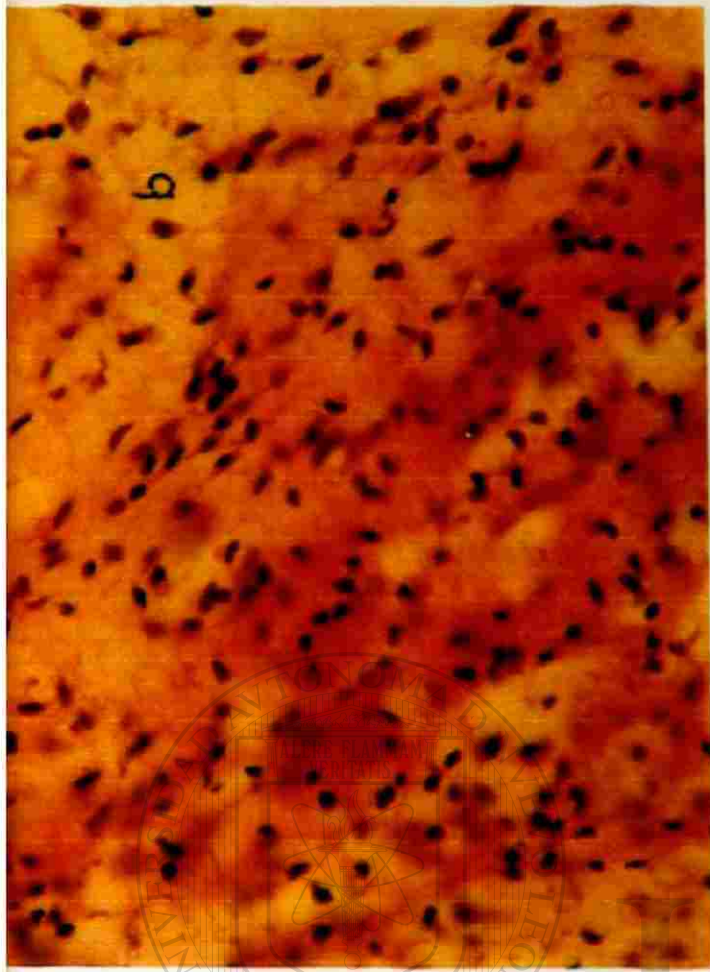


Fig. 5. Tissue of Balb/C mouse treated with HD-41 strain
a) skeletal muscle (EM 10x), b) EM 40x,
c) degenerated muscle fibers (DMF 10x), d) DMF 40x

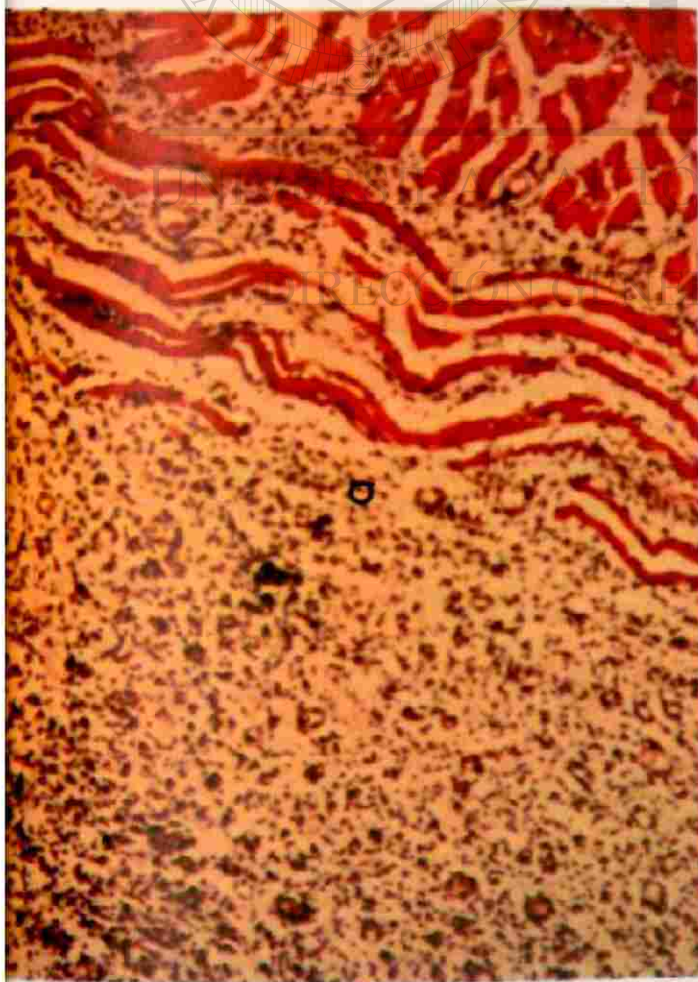
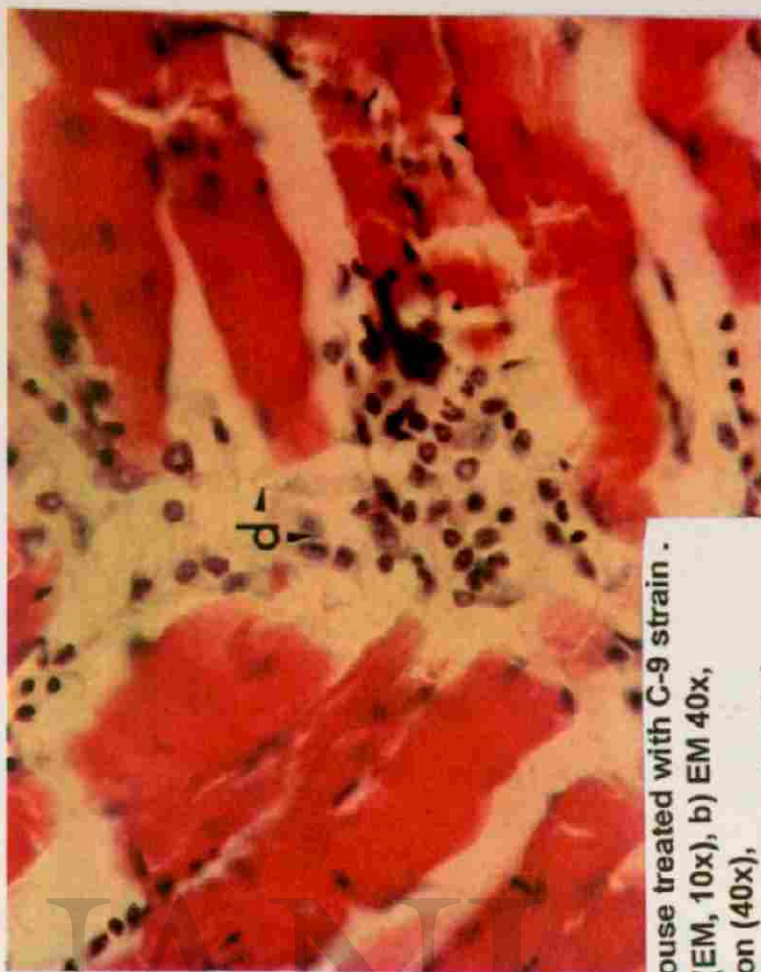


Fig. 6 Tissue of Balb/C mouse treated with C-9 strain .
a) skeletal muscle (EM, 10x), b) EM 40x,
c) neovascularization (40x),
d) necrosed and infiltrated muscle (40x).

For: Journal of Economic Entomology

Biological and Microbial Control

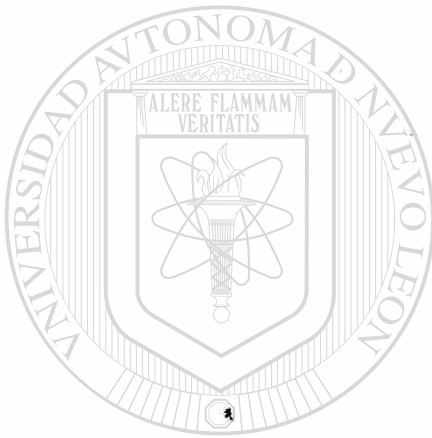
Send Correspondence to:

M. R. McGuire

USDA-ARS

1815 N. University

Peoria, IL 61604 (309-681-6595)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

New granular formulations based on corn meal with different serovar. of

Bacillus thuringiensis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

P. Tamez-Guerra, R. Castro-Franco, H. Medrano-Roldán, M. R. McGuire,
L. J. Galán-Wong and H. A. Luna-Olvera

ABSTRACT

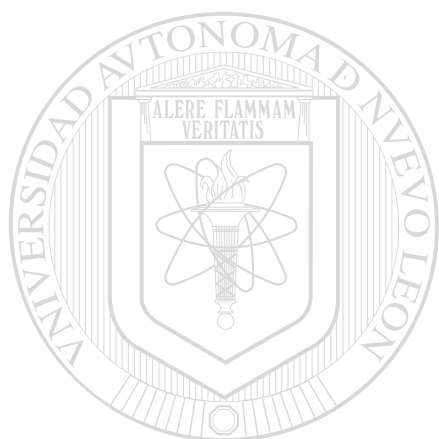
Corn starch based formulations were used to compare the toxicity of six strains of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) belonging to four serovars, *aizawai*, *galleriae*, *kurstaki*, and *kumamotoensis*, against four lepidoteran species, *Helicoverpa zea*, *H. virescens*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni*. Three of the strains were from the Howard Dulmage collection (HD) maintained at the University of Nuevo Leon (UANL) and three were isolated in Mexico. Laboratory bioassay results were used to select strains for field experiments.

Field tests were conducted on corn plots in a semi-arid region in central Mexico during 1994 and 1995 using two concentrations of spore-crystals, 2 and 4%, comparing the six experimental strains with a chemical insecticide (carbaryl) and a commercial bioinsecticide (Dipel™). In 1994 the yields of corn obtained from two HD strains (*galleriae* and *kurstaki*) and one Mexican strain (*aizawai*) were significantly higher ($p < 0.05$) than from the biological insecticides but were not significantly different from the carbaryl. The most dramatic differences were observed when a 4% spore-crystal complex was used. The other strains were not significantly different from the controls. These tests indicate that *Bt* survived in the gelatinized starch matrix complex.

In the 1995 field test, the three most toxic strains were evaluated individually or by mixing two at a time in the same granular formulation at a total dose of 3%, and a formulation prepared two years earlier was also tested. The highest yields of corn were

obtained with strain HD-263 (*kurstaki*), which had originally shown the highest efficacy in bioassays, and with strain GM-10 (*aizawai*), formulated two years earlier. This suggested that the product can be produced and retain shelf-life suitable for commercialization.

KEY WORDS: Granular formulation, *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticide, lepidopteran.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Methods of application of *Bt* to crops have been modified significantly in recent years in order to increase toxicity for target insects and increase residual time. The active ingredient has been applied as a liquid spray. One formulation was composed of spore-crystals mixed in water with other additives or emollients used primarily with chemical insecticides. The mixture was sprayed directly on the plants. Moreover, there have been reports of the possible utilization of granular formulations (Angus & Lüthy, 1971; Amhed *et al.*, 1973). Using corn starch had given better results than the liquid preparations, but the disadvantage of granular formulations is that they are lost in the air or the soil and only can be used in crops like corn and cotton (Couch, 1978). For this reason additional materials were added as stabilizing, potentiating, and adhering agents. Positive results were observed using baits of corn flour, or adherents such as carbohydrates including sucrose (Norris, 1978). Encapsulating agents such as alginate-clay had been shown to prolong residual time (Fravel *et al.*, 1985), or bacterial alginates like a good option to prepare biocontrol formulations (De Lucca *et al.*, 1990). Granular formulations of *Bt* spore-crystals based on corn starch have been shown to be effective bioinsecticides (Dunkle and Shasha, 1988). Additives to these materials can be used, such as solar protectants like congo red, to impregnate the granules to protect from ultraviolet light (Dunkle and Shasha, 1989) as well as feeding stimulants like Coax™ (Bartelet *et al.*, 1990) or adhesives such as 2-propanol to prevent rain washoff (McGuire

& Shasha, 1992). Another UV protectant reported is melanin for increased mosquitocidal activity of *Bt* serovar. *israelensis* (Liu *et al*, 1993).

In Mexico there has not been much commercialization of products based on *Bt* partly because of the high cost of imported products and partly because the biotechnology of production is still developing. Highly effective strains of *Bt* have been isolated and the technology for the production of inexpensive granular formulations using gelatinized corn starch based on an industrial product for making tortillas (nixtamalized flour) has been developed (Galán-Wong & Padilla-Rodríguez, 1991; Castro-Franco, 1994). The solar protectant tested successfully to make these granules was malachite green. Sucrose, vegetable oil and isopropanol were used as stabilizers. In this work, we will demonstrate the feasibility of production and use of the described granular formulations based on the activity of different serovars. of *Bt* for the control of lepidopteran larvae in the field.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Materials and methods

***B. thuringiensis* strains.** The six strains that were used for the production of spore-crystal complexes of *Bt* were from the lot HD; 187, and 263 (*kurstaki*) and 193 (*gallinae*), and three isolated in Mexico, GM-7 and GM-10, (*aizawai*), and C-4 (*kumomatoensis*). All of these were obtained from International Collection of Entomopathogenic Bacilli (Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N. L., México).

Production of the Active Ingredient (AI). The strains were propagated in tubes of nutritive agar, and at 24 hours, 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of tryptose phosphate sterile broth (Difco) were inoculated. The broth was agitated at 250 rpm in a mechanical stirrer at 30°C (Incubator Shaker Series 25, New Brunswick Sci, Inc.). After 18 hours 500 ml Erlenmeyer flasks containing 150 ml of sterile fermentation media were inoculated. A volume of approximately 1% v/v of an 18 hour culture of each *Bt* strain (described above) was used as the inoculation in each case. The fermentation media containing soy flour, 20 g; corn soaking liquid, 10 g; molasses, 20 g; calcium carbonate, 1 g; distilled water, 1000 ml was homogenized and the pH was adjusted to 7.0±0.2. The media was autoclaved for 2 hours and agitated until it reached 100% oxygen saturation (O. S.). The 500 ml Erlenmeyer flasks were agitated and 18 hr later were used to inoculate 14 liter fermentation flasks (New Brunswick Sci, Inc., model MF-214) containing

9 liters of fermentation media. Fermentation conditions were the following: temperature, $25\pm 3^{\circ}\text{C}$; pH 7.0 ± 1.0 , agitation 700 rpm, aeration 1 vvm (volume air/volume media/minute). Starting at this time pH readings were made and microscopic examination was done to monitor the development of spores and crystals. pH adjustment and foam control were done automatically and temperature and OS were recorded continuously. When the culture contained 95% free spores, agitation was stopped and the pH was adjusted to 7.0. Then the extraction of spore-crystal complexes was done by coprecipitation with lactose (Dulmage *et al*, 1970).

Determination of LD_{50} and LD_{90} . To evaluate the toxic activity of the spore-crystal complexes obtained, bioassays using artificial diets of Shorei modified media (Castro-Franco *et al*, 1995) were performed. The assays were done using neonatal larvae of *Helicoverpa zea*, *H. virescens*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni*. Two concentrations of 50 and 500 mg/ml of the A. I. were tested. Afterwards, seven concentrations were selected, depending on preliminary results, and evaluated in triplicate, 25 larvae/replicate, each one in individual cups. Each lot of 25 larvae was maintained individually at 28°C and 55% relative humidity for eight days. Controls were maintained similarly except that an artificial diet with granules without *Bt* was used. Other controls consisted of a standard *Bt* (HD-1-S-1980) and one without *Bt* or granules (Beegle *et al*, 1986). The number of dead larvae were counted to obtain the LD_{50} and LD_{90} by the Probit method (SAS, 1989).

Inhibitory effect. In bioassays done previously, it was noted that surviving treated larvae were smaller than the controls. In order to evaluate this effect that other

authors have called the inhibitory dose, the larvae were weighed and the weights were compared with the controls. All living larvae were weighed and the average weight was calculated for each replicate. Although this effect was noted in all the strains, we tested only the strains GM-7 and GM-10 and compared them to the standard HD-1-S-1980. The assay was performed on larvae of *Helicoverpa*, *Spodoptera* and *Trichoplusia* grown on artificial diet containing 100, 50, 25, 15, 13, 10 and 5 mg/ml.

Preparation of formulations. The preparation of the granules was done by mixing 100 g of powdered sugar, 100 g of nixtamalized (pregelatinized, Maseca™) corn starch, 5 ml of vegetable oil, and 4.1, 6.15 or 8.2 g of spore-crystal complex from each strain, to obtain granules of 2, 3 or 4% active ingredient respectively. The method of McGuire and Shasha (1992) was modified and the cool polymerization was done by combining 70 ml of water, 30 ml of isopropanol, 0.05 g of malachite green and 0.05 ml of formaldehyde, the latter as preservative. This was mixed with a spatula, left for 30 min and passed through 20 mesh sieve, forming granules. This was left to dry at room temperature until it reached 10% humidity. To evaluate the toxic activity of the strains and their shelf life, these preparations were evaluated after six months storage. Percent mortality was measured with *Trichoplusia ni* using artificial diets with concentration of 50 and 500 mg/ml as described above. Percent mortality was obtained using 75 larvae in three lots of 25 larvae per lot. The toxic activity of GM-10 was measured two years after preparation.

Field trials. Field trials were performed using corn (*Zea mays*) plots at the experiment station at URUZA, University of Chapingo, located in Bermejillo, Dgo.,

México. This is a semi-arid region in Central Mexico. In the first year (1994) the experimental design was a 2 x 8 x 4 factorial, corresponding to two levels of treatment (2 and 4%), six strains (C-4, GM-7, GM-10, HD-187, HD-193, and HD-263), chemical insecticide (carbaryl), the bioinsecticide Dipel 2x™ and the control; and four repetitions. Granules containing 2% A. I. were applied in the first block along with Dipel and the control. The plots were 4 x 10 meters for each treatment. The second block was treated with granules of the same strains at 4% A. I., carbaryl at recommended levels, and the control similar to the previous block. Artificial infestations with insects were not done in order to observe the effects of treatments in natural conditions. Only emergency irrigations were made, three altogether. When the presence of lepidopteran larvae was noted (usually after a rain) the number of larvae was counted on five plants per plot and the insecticides were applied. Larvae were counted again one week post treatment. In total three applications were done. The corn yield for each treatment was determined taking the total weight of dry grains.

In the second period (1995), the experimental design was 10 x 4 factorial where 10 represented three strains (GM-10, HD-193, and HD-263), and combinations (GM-10 + HD-193, GM-10 + HD-263, and HD-193 + HD-263), all at level of 3% A. I., using 1.5 % of each one in a case of formulations with two strains, Dipel and carbaryl following manufacturer's recommendations, granules without A. I. and untreated control. Parameters evaluated were: percent of insect damage, relative damage, percent relative severity, and yield of grain (Castro-Franco, 1994).

Results

Production of active ingredient. We used fermentation process for this work. To maintain the pH of the fermentation media between 6.0 and 8.0, different batches of *Bt* required different amounts of base or acid. The same thing occurred with the antifoam agent and the time required to reach 95% free spore-crystals. Yield values of spore-crystals and paste were different for different batches. These results are shown in Table 1. HD-187 and HD-193 yielded the lowest values of product, but the lowest value of A. I. came from HD-193.

Determination of LD₅₀ and LD₉₀. The Probit method was used to obtain the LD₅₀ and LD₉₀ of seven concentrations of AI for each strain and the standard HD-1-S-1980. (Table 2). These results show that for most insect species tested, the strain HD-263 was the most active and C-4, the least active.

Inhibitory effect of *Bt*. The growth inhibition demonstrated by the larvae cultivated on different doses of spore-crystals is shown in Table 3. The results show that the effect diminishes as concentration diminishes. However, the weights were always significantly less than the controls for all concentrations of A. I

Toxic activity of granular formulations. Percent age mortality of larvae (*T. ni*) after feeding on formulations produced six months and two years previously demonstrated that the activity was conserved for six months and two years, respectively (Table 4).

Field trails. Larval counts for the first trial (1994) are shown in Table 5. The number of larvae present decreased one week after the application of the different treatments except for the control. No larvae were found after the first application of chemical insecticide, but larvae were found in subsequent applications. The results of the second application of the granular formulation were the same.

With respect to harvest yield, for the 2% treatment, analysis of variance showed significant differences at a minimum of 1564.5 Kg/ha (Table 6). Using this value it was shown that the most effective strain is GM-10 and was comparable to GM-7, HD-193 and HD-187. Strains C-4, and HD-263 demonstrated values similar to Dipel™. In all cases, insecticide treatments were superior to the control. For the 4% treatment, analysis of variance showed significant differences at the minimum of 1372.1 Kg/ha (Table 6). GM-10, HD-263, and carbaryl shown the best control of pests; and GM-7, HD-193, and HD-187 were comparable. Strain C-4 had the lowest value and was barely superior to the control. In all cases, insecticide treatments were superior to the control. In general, the differences in yield were greater at 2% and the amount was greater at 4%. ®

For the second period (1995), analysis of variance showed significant differences of a minimum of 1065.4 Kg/ha (Table 7). Using this references value HD-263 and C. I. (Sevin™) produced the best results. GM-10 and GM-10 + HD-263 were comparable to HD-263 and C. I. and superior to HD-193 + HD-263 which were superior to the control and the corn starch base.

Discussion

The way to produce the active ingredient (fermentation media with molasses, corn liquor and soy flour) is an inexpensive and easy process, and a good option for production *Bt* strains for field trials. The active toxicity is well conserved by this production method. It was shown that the active ingredients of the different serovars of *Bt* retained their effectiveness when they are produced in by-products such as molasses, and corn liquor when combined soy flour. This production method was compared with the used by people of Weslaco for the production of *Bt* strains (Dulmage & De Barjac, 1973) Also, strains isolated in Mexico showed toxic levels equal to the strains in the Howard Dulmage Collection and the standard HD-1 when they are used like active ingredient in laboratory bioassays or in granular formulations using gelatinized corn flour produced in Mexico. Maybe the production method helped to potentiate the toxic activity of the strain HD-263, like happend with other medias using *Bt* (Dulmage, 1971), and for this reason was more toxic in artificial diet than the HD-1-S. Besides, the standard employed was decreased its toxic activity with time. The nixtamalized corn is obtained from a process of cooking kernels of corn with calcium carbonate and alkali at high temperature. The corn starch present is pregelatinized by this process (Collison, 1968). The nixtamalized corn is an industrial product used to make tortillas. It was possible to produce granular formulations by conventional methods based on nixtamalized corn, a material cheap and easy to obtain in Mexico, at a low cost. With respect to cost, the

matrix used in this experiment had a value in Mexico of US \$ 0.12 per Kg as opposed to US \$0.44 per Kg for corn starch or US \$ 1.32 per Kg for the pregelatinized starch Miragel™ (McGuire et al, 1994).

The *kurstaki* and *aizawai* serovars were shown to have higher toxic activity versus lepidopteran larvae in laboratory bioassays, but each strain showed different activity for each lepidopteran insect. There seemed to be a pattern that *H. virescens* and *S. exigua* were more resistant to the various strains of *Bt* than *H. zea* or *T. ni*, but this did not hold true for all strains of *Bt*. Since the laboratory insects were raised in an open insect colony established at least eight years previously and not exposed to any insecticides, there had been little selection within the population. However, the introduction of new specimens from the field may have brought in genes for resistance. This supports other work that shows that different strains of *Bt* vary in their effectiveness against different species of insects (van Frankenhuyzen et al, 1992). In addition, the marked inhibitory effect of *Bt* on the growth of the larvae reduced their capacity to damage crops even though they were not all killed. Prevention of pupation at all concentrations of *Bt* breaks the life cycle which also reduces the population of the insects.

Bioassays and field trials showed that the granules alone were not toxic for the larvae. In the former, larval survival was similar to the controls. Corn yield was the same in the granular treatment without *Bt* as in the control. Mortality of larvae in the field trials could not be determined as to species because of difficulty in speciation. However, *S. exigua* is the most common pest in the test region. Field counts of larval mortality did

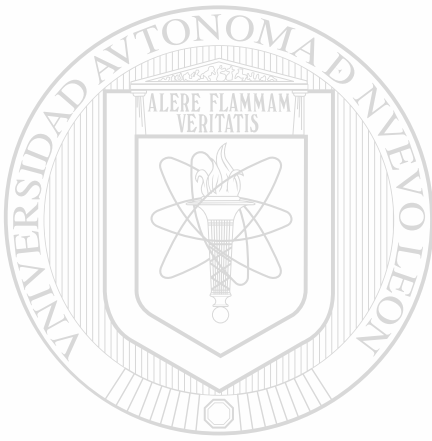
not seem to follow the same pattern as the laboratory bioassays. Also, the larval mortality did not seem to correlate with the yield of corn. For example, strain GM-10 showed good results in bioassays with diet incorporation, comparable to HD-193. However, in larval control in the field, GM-10 showed lower toxic activity than HD-193 as well as the others. Besides, C-4 showed the lowest toxic activity of all the strains in laboratory, but showed the same activity on larval counts in the field. This may have been for several reasons. One is that the number of larvae were counted on five plants only and the pretreatment counts were not done on the same plants as the post treatment plants. Another possibility is that there were other factors influencing production such as position in the field. There was a correlation, however, between the laboratory results and the yields in the field trials. Since the yields would have been influenced by the total damage done to the plants, the inhibitory effect may have reduced crop damage without reducing the number of larvae as much.

It was interesting to note that while the initial effect of the chemical insecticide was better than most bioinsecticides, in subsequent treatments its efficacy was greatly reduced. This would be difficult to explain on the basis of developing resistance because the adults would have dispersed to different plots and selection would not have been constant. However, there did seem to be an effect.

In the 1994 field trial, we saw differences between 2 and 4% level blocks. The lowest yield was the 2% level, in both treatment and control. This may have been because of the position in the field, because in the experimental design the 4% block was in the

interior of the field while the other block was next to the road. Despite this, the differences between the treatment versus the control can be shown in both levels.

For the results obtained in the field trials, we supposed that the malachite green can be used successfully as a solar protectant for treatment of corn plants with *Bt* as reported by Castro-Franco (1994).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Table 1. Production of six strains of *B. thuringiensis* in 14 liter fermentation flasks.

Strains	Time (h)	Antifoam (ml)	Base (ml) ¹	Acid (ml) ²	Paste	Spore-crystal A. I. (g) ³
C-4	48	150	30	150	945.3	105.0
GM-7	48	325	50	200	960.2	108.3
GM-10	45	200	10	200	894.9	118.7
HD-187	45	350	35	175	613.5	107.0
HD-193	51	100	40	150	787.6	87.6
HD-263	48	150	30	150	945.3	105.0

¹ Base = 30% NaOH ² Acid = 30% HCl ³ Paste = Sediments of fermentation products, spore-crystal complex after Dulmage's extraction (Dulmage *et al*, 1970. A. I. Active Ingredient

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Table 2. LD₅₀ and LD₉₀ of six strains of *B. thuringiensis* for lepidopteran larvae.

Strains		<i>Helicoverpa virescens</i>		<i>H. zea</i>		<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Trichoplusia ni.</i>	
		LD	Conf. Interval	LD	Conf. Interval	LD	Conf. Interval	LD	Conf. Interval
HD-1-S	LD ₅₀	22.3	18.2-27.48	16.7	13.5-28.8	26.3	21.5-32.1	19.8	12.8-29.3
	LD ₉₀	95.3	57.1-257.3	71.2	34.6-290	127.9	81.0-311	82.5	58.3-187
C-4	LD ₅₀	241	45.2-1287	24.3	19.9-37.2	66.3	39.2-112	29.3	18.2-43.7
	LD ₉₀	5110	157-4.4x10 ⁶	88.6	52.2-196	1195	264-2.2x10 ⁵	772	140-2.1 x10 ⁵
GM-7	LD ₅₀	30.8	24.8-38.4	n.d.		73.7	26.3-145	22.2	10.6-44.2
	LD ₉₀	162	97.1-438	n.d.		300	167-3366	86.1	57.9-203
GM-10	LD ₅₀	35.4	27.5-45.6	n.d.		44.4	29.3-68.9	18.5	12.8-39.4
	LD ₉₀	227	120-775	n.d.		248	178-472	69.4	34.6-99.3
HD-187	LD ₅₀	31.7	23.5-42.8	19.3	12.7-30.2	39.8	20.4-53.4	25.7	10.0-42.9
	LD ₉₀	175	82.3-762	439	106-6893	289	91.8-2685	854	29-3.3 x10 ⁵
HD-193	LD ₅₀	31.0	22.7-42.2	14.4	10.6-27.7	92.8	34.3-250.7	27.4	15.0-34.2
	LD ₉₀	190	84.0-940	94.4	53.7-246	1794	151-2.1 x10 ⁶	53.6	38.7-101
HD-263	LD ₅₀	3.50	1.1-11.0	15.6	9.74-25.3	18.8	14.7-24.0	5.61	4.57-6.88
	LD ₉₀	51.1	32.8-120	177	45.9-2477	135	62.2-611	24.2	17.7-44.5

Probit statistic (SAS, 1989) with the confidence interval of 95%. n. d. not determined

Table 2. LD₅₀ and LD₉₀ of six strains of *B. thuringiensis* for lepidopteran larvae.

Strains		<i>Helicoverpa virescens</i>		<i>H. zea</i>		<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Trichoplusia ni.</i>	
		Conf. Interval		Conf. Interval		Conf. Interval		Conf. Interval	
HD-1-S	LD ₅₀	22.3	18.2-27.48	16.7	13.5-28.8	26.3	21.5-32.1	19.8	12.8-29.3
	LD ₉₀	95.3	57.1-257.3	71.2	34.6-290	127.9	81.0-311	82.5	58.3-187
C-4	LD ₅₀	241	45.2-1287	24.3	19.9-37.2	66.3	39.2-112	29.3	18.2-43.7
	LD ₉₀	5110	157-4.4x10 ⁶	88.6	52.2-196	1195	264-2.2x10 ⁵	772	140-2.1 x10 ⁵
GM-7	LD ₅₀	30.8	24.8-38.4	n.d.		73.7	26.3-145	22.2	10.6-44.2
	LD ₉₀	162	97.1-438	n.d.		300	167-3366	86.1	57.9-203
GM-10	LD ₅₀	35.4	27.5-45.6	n.d.		44.4	29.3-68.9	18.5	12.8-39.4
	LD ₉₀	227	120-775	n.d.		248	178-472	69.4	34.6-99.3
HD-187	LD ₅₀	31.7	23.5-42.8	19.3	12.7-30.2	39.8	20.4-53.4	25.7	10.0-42.9
	LD ₉₀	175	82.3-762	439	106-6893	289	91.8-2685	854	29-3.3 x10 ⁵
HD-193	LD ₅₀	31.0	22.7-42.2	14.4	10.6-27.7	92.8	34.3-250.7	27.4	15.0-34.2
	LD ₉₀	190	84.0-940	94.4	53.7-246	1794	151-2.1 x10 ⁶	53.6	38.7-101
HD-263	LD ₅₀	3.50	1.1-11.0	15.6	9.74-25.3	18.8	14.7-24.0	5.61	4.57-6.88
	LD ₉₀	51.1	32.8-120	177	45.9-2477	135	62.2-611	24.2	17.7-44.5

Probit statistic (SAS, 1989) with the confidence interval of 95%. n. d. not determined

Table 3. Inhibitory effect of three strains of *B. thuringiensis* on lepidopteran larvae.¹

Dose		<i>Helicoverpa virescens</i>		<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Trichoplusia ni</i>	
(mg/ml)	Strain	No. of dead larvae	Weight/larva (mg)	No. of dead larvae	Weight/larva (mg)	No. of dead larvae	Weight/larva (mg)
100	GM-7	64	1.16	n. d.	--	a. d.	--
	GM-10	59	1.28	a. d.	--	a. d.	--
	HD-1-S	n. d.	--	66	5.54	n. d.	--
50	GM-7	42	1.76	n. d.	--	69	1.63
	GM-10	41	1.68	74	6.62	67	6.37
	HD-1-S	n. d.	--	54	9.39	n. d.	--
25	GM-7	39	3.90	n. d.	--	66	2.67
	GM-10	38	3.26	65	5.36	61	7.7
	HD-1-S	n. d.	--	30	12.24	n. d.	--
15	GM-7	21	5.3	n. d.	--	50	6.62
	GM-10	20	5.21	62	8.77	42	8.4
	HD-1-S	n. d.	--	26	24.8	n. d.	--
13	GM-7	19	6.50	n. d.	--	35	31.5
	GM-10	17	6.31	54	9.48	36	11.8
	HD-1-S	n. d.	--	20	25.8	n. d.	--
10	GM-7	10	8.50	n. d.	--	28	31.5
	GM-10	15	8.52	56	10.99	37	25.8
	HD-1-S	n. d.	--	17	34.8	n. d.	--
5	GM-7	8	9.50	n. d.	--	10	37.4
	GM-10	7	8.99	40	20.6	25	38.2
	HD-1-S	n. d.	--	8	43.5	n. d.	--
-	Control	0	85.82	0	183.82	0	105.5

¹ average of three replications. 75 larvae per trial. n. d. not determined. a. d. all the larvae were dead

Table 4. Percent mortality of *T. ni* with *B. thuringiensis* in matrices of gelatinized corn¹

Dose	<i>Bacillus thuringiensis</i> strains							Control	Form ²
	C-4	GM-7	GM-10	GM-10 ³	HD-187	HD-193	HD-263	--	not <i>Bt</i>
50 mg/ml	54	100	94	100	23	100	100	0	0
500 mg/ml	100	100	100	100	100	100	100	0	0

¹ Total of 75 larvae with three replicates of 25 larvae each. Formulations produced six months previously

² Formulation without *Bt* ³ Formulation produced two years previously

Table 5. Larvae count before and after each formulation application.¹

Treatment	APPLICATIONS						Percent total decrease
	First before	First after	Second before	Second after	Third before	Third after	
C-4	13	4	21	8	27	5	72.13
GM-7	16	7	35	5	21	5	76.38
GM-10	25	12	20	1	39	22	58.33
HD-187	19	6	19	4	29	14	64.18
HD-193	23	1	15	6	31	13	70.01
HD-263	31	5	14	5	28	9	73.97
Carbaryl	23	0	42	22	18	5	70.65
Control	13	12	19	18	31	62	+ 31.52 ²

¹ Average of three replications. ² Percent total amount

Table 6. Corn yield (Kg/ha) resulting from application of bioinsecticides and a chemical insecticide¹

A.I. ²	Treatment								
	C-4	GM-7	GM-10	HD-187	HD-193	HD-263	Carbaryl	Dipel TM	Control
2%	5413.7 ^{cd}	5576.3 ^{bcd}	7948.8 ^a	6636.5 ^{abu}	7190.7 ^{ab}	6115.5 ^{bcd}	n. d.	5628.6 ^{bcd}	4906.4 ^d
4%	7133.7 ^{bc}	8605.6 ^{ab}	8825.5 ^a	7677.2 ^{ab}	8375.5 ^{ab}	8972.3 ^a	8616.7 ^a	n. d.	6064.7 ^c

¹ Average of four replicates. ² Percent of active ingredient. n. d. not determined. Values in the same line with the same letter are not significantly different from each other. Tukey' difference at $p < 0.05$

Table 7. Field trial of corn meal formulations with different serovars of *B. thuringiensis*

Treat.	HD-263	Carbaryl	10+263	GM-10	193+263	HD-193	10+193	Dipel TM	Control	Granuls
Yield ¹	6344.6	6083.4	5961.2	5583.3	5513.7	5274.3	5101.5	5014.3	4720.3	4258.3
	a	ab	abc	abcd	abcd	bcd	bcd	bcd	de	e

¹ Kg/ha, average of three repetitions. Values with the same letter are not significantly different from each other. Range multiple analysis, $p < 0.05$

LITERATURE CITED

Angus, T. A., and P. Lüthy. 1971. Formulation of microbial insecticides. *In*: Microbial control of Insects and Mites. D. H. Burges, and N. W. Hussey -eds. Academic Press. London, N. Y. 623-637 p.

Ahmed, S. M., M. V. Nagamma, and S. Y. Majumdar. 1973. Studies of granular formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Pestic. Sci.* 4: 19-23.

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

Beegle, C. C., T. L. Couch, R. T. Alls, P. L. Versoi, and B. T. Lee. 1986. Standardization of HD-1-S-1980: U. S. Standard for assay of lepidopterus-active *B. thuringiensis*. *Entomol. Soc. Am.* 32: 44-45.

Castro-Franco, R. 1994. Desarrollo de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* y extracto de *Agave lechuguilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (B. J. Smith). *Doctoral thesis*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México

Castro-Franco, R., J. S. García-Alvarado, L. J. Galán-Wong, and A. Gallegos-del Trejo. 1995. Efecto sinérgico de extractos de bagazo de *Agave lechuguilla* Torr. en la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith). *PHYTON*. 57: 113-119.

Collinson, R. 1968. Swelling and gelation of starch. *In*: Starch and its derivatives. Ed by Raddley, J. A. 1st edition. Chapman and Hall Ltd. London U. K.

Couch, T. L. 1978. Formulation and application of microbial insecticides. The Entomological Society of America-Honolulu, Hawaii. Applications of the Entomological Society of America. 106-110 p.

De Lucca, A. J., W. J. Connick, D. R. Fravel, J. A. Lewis, and, J. M. Bland. 1990. the use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *J. Ind. Micro.* 6: 129-134.

Dulmage, H. T., J. A. Correa, and A. J. Martínez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invert. Pathol. 15: 15-20.

Dulmage, H. D. 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invert. Pathology. 18: 353-358.

Dulmage, H. T., and H. De Barjac. 1973. HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of δ -endotoxin. J. Invertebr. Pathol. 22: 273-277.

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

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

Frankenhuyzen van, K., M. Ross, R. Brousseau, and L. Masson. 1992. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* defoliating forest Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol. 59: 149-154.

Fravel, D. R., J. J. Morris, D. R. Lumsden, and W. J. Connick Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. Phytopathol. 75: 774-777.

Galán-Wong, L. J., y Padilla-Rodríguez, C. 1991. Proceso biotecnológico de plaguicidas de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* serovariedad *aizawai* cepas GM-7 y GM-10 efectivas y específicas contra insectos lepidópteros. SECOFI. Patent No. 156303. México, D. F. 1-32 p.

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

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

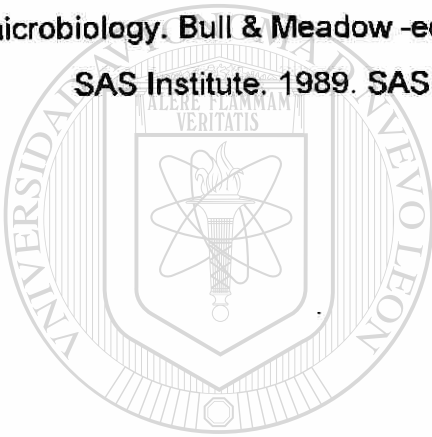
Lüthy, P., L. J. Cordier, and H. M. Fisher. 1982. *Bacillus thuringiensis* a bacterial insecticide: Basic considerations and application. *In: Microbial and viral pesticides*. E. Kurstak editor. Marcel Dekker, New York, N. Y. 35 p.

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

McGuire M. R., R. L. Gillespie, and B. S. Shasha. 1994. Survival of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) after exposure to *Bacillus thuringiensis* Berliner encapsulated in flour matrices. *Environ. Entomol.* 29: 182-189.

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

SAS Institute. 1989. SAS user's guide: statistics SAS Institute. Cary, N. C., USA.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

For: Journal of Economic Entomology
Biological and Microbial Control

Send Correspondence to:
M. R. McGuire
USDA-ARS
1815 N. University
Peoria, IL 61604 (309-681-6595)



SPRAYABLE GRANULE FORMULATIONS FOR *BACILLUS THURINGIENSIS*

Patricia Tamez-Guerra¹, Michael R. McGuire^{1,5}, Hiram Medrano-Roldan¹, Luis J. Galan-
Wong¹, Baruch S. Shasha¹, and Fernando E. Vega²

¹Depart. de Microbiología, Universidad Autónoma de Nuevo León, S. Nicolas de los
Garza, Nuevo Leon, AP2790 64, Mexico.

²USDA, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization
Research, Bioactive Agents Research Unit 1815 N. University Street, Peoria, IL
61604-3999.

³Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Mexico

⁴Bradley University, Dept of Chemistry, Peoria, IL

⁵To whom reprint requests should be directed

names are necessary to report factually on available data; however, the USDA neither guarantees nor warrants the standard of the product,
and the use of the name by USDA implies no approval of the product to the exclusion of others that may also be suitable.

ABSTRACT

Spray dried *Bacillus thuringiensis* formulations, based on citric or lactic acid, pregelatinized corn flour, cornstarch, isopropyl alcohol, sugar, and corn oil, were used in leaf and diet incorporation bioassays, to determine the effects of solar radiation and rain on insecticidal activity. In diet incorporation tests against *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* and *Spodoptera exigua*, insecticidal activity of spray-dried *B. thuringiensis* did not decrease when compared with non-spray dried material. Cotton leaf bioassay tests using *Ostrinia nubilalis* showed that insecticidal activity of formulations exposed to solar radiation was higher than technical *B. thuringiensis* exposed to solar radiation, suggesting the formulations provided protection against solar radiation. In cotton leaf bioassays, when five different starches were used in the formulations, insecticidal activity was reduced after exposure to solar radiation in only one case. Cotton leaf bioassays also showed a reduction in insecticidal activity due to exposure to solar radiation as the amount of active ingredient in the formulation increased. Throughout all tests, rainfastness did not improve over technical *B. thuringiensis* alone.

KEY WORDS: Formulation, cornstarch, corn flour, *Bacillus thuringiensis*, spray dry, microencapsulation

Commercially available pesticide formulations containing *Bacillus thuringiensis* are applied as dry granules or as sprayable preparations. Both types of formulations, however, suffer from a lack of residual insecticidal activity due to wash-off by rainfall or degradation by sunlight. In addition, most preparations of *B. thuringiensis* are not palatable to insects thus limiting their effectiveness. (Gillespie et al. 1994). Previous research to address these problems has resulted in the development of adjuvants containing starch (McGuire and Shasha 1990, 1992), gluten (Behle et al. 1996b), casein (Behle et al. 1996a), or lignin (McGuire et al. unpublished) as additives to spray tanks. These ingredients protect *B. thuringiensis* from wash-off by rainfall and/or degradation by sunlight. However, as adjuvants they require different amounts of material depending on the spray volume used. Therefore, a user applying 10 L/Ha spray volume would require much less material than a user applying 100 L/Ha. Thus potential for commercialization of these materials is limited because packaging for multiple uses is a problem. Development of granular formulations that are applied dry has also resulted in increased residual activity of microbial pesticides. Examples of these formulations include corn meal baits (Creighton et al. 1961, Cannerday et al. 1975) and granules formed with gelatinized starch or flour (Dunkle and Shasha 1988, Gillespie et al. 1994, Castro-Franco 1994), or gluten (Connick et al. 1991). However, the use of these large granules is restricted to corn or other plants that have a retaining device such as a whorl. This paper focuses on recent efforts conducted jointly by Mexican and U.S. scientists aimed at developing a sprayable granule that can resist wash-off and solar degradation of *B. thuringiensis*.

To overcome the limitations of adjuvant-based protectants, we wanted to develop a formulation in which the protectants maintained contact with the active ingredient throughout

the tank mixing and application process. One way to do this is to quickly dry materials onto small particles of active ingredient. Spray drying is a method commonly used in food and other industries to produce microcapsules of uniform quality containing multiple ingredients. The equipment is relatively inexpensive to purchase and operate, is commonly available and easy to use (Taylor 1983, Youngs 1986). The initial step in the spray drying process is to select a suitable coating material for the active ingredient. This material should have good rheological properties, disperse evenly, be non-reactive, and have the ability to hold the active ingredient (Shahidi and Han 1993). We have found that gelatinized starchy materials such as corn flour provide the properties described above. We now report on the use of spray drying as a method to prepare small (pass 60 mesh) granules containing *B. thuringiensis* that are sprayable and that extend the residual insecticidal activity of *B. thuringiensis* in response to simulated environmental factors.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Materials and Methods

***B. thuringiensis* isolate:** Technical *B. thuringiensis* provided by Abbott Laboratories (North Chicago, IL) was used in all formulations. The powder contained 64,000 IU/mg and was derived from the strain HD1 used commercially.

Spray drying conditions: A Niro atomizer (Niro Inc. Columbia MD) was used for all formulations. The settings of the atomizer were: inlet temperature 120-130°C, air pressure 4 KPS, outlet temperature 60-90°C and varied throughout the run depending on viscosity of the formulation mixture. Mixtures were pumped into the atomizer at the rate of 10 ml/min. As the formulations entered the atomizer, much of the material adhered to the sides of the tank. At the end of the run, the tank was opened and the material was scraped off the sides and into the collection vessel. Therefore, residence time for the material in each formulation varied from a few seconds to 30 min.

Formulations: The ingredients used in the formulations (Table 1) were selected based on availability, cost, and functionality. The combinations and designations for each of the formulations are shown in Table 2. The ingredients were mixed under precise conditions as follows: The oil and starches were first mixed by pressing the two together in a beaker; the mixture was then added to 280 ml warm (60°C) water to form a soft dough; sugar was added, then the alcohol, then the acid, then the malachite green, and then the active ingredient. In some cases the viscosity of the mixture was too high and the addition of more water was necessary to enable pumping of the material to the spray drier. A preliminary formulation utilized, among other ingredients, nixtamalized flour (used for food and industrial purposes and commonly available in Mexico), cornstarch, and formaldehyde (Tamez-Guerra et al.

1996). In the U.S., nixtamalized flour is not readily available and the use and presence of formaldehyde may raise concerns. Therefore, several types of formulations were developed. Formaldehyde was substituted with citric or lactic acids (1,2; Table 2), nixtamalized flour was substituted with other common flours or starches (3-7; Table 2), amount of active ingredient (initially 3% of the solids level) was increased up to 50% (8-10; Table 2). The ratio of nixtamalized flour to ungelatinized cornstarch was adjusted from the original 50:50 (11-12; Table 2) to determine if the starch content could be increased (thus decreasing overall cost of the formulation) without loss of protection or activity. Finally, malachite green, a potential sunscreen was removed from the formulation to determine if it played a role in solar stability (13).

Insect cultures: *Ostrinia nubilalis* was reared using procedures modified from Ortega et al. (1980) as reported by Bartelt et al. (1989). Neonates were used in all cotton leaf bioassays. *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni* were reared on artificial diet modified from Shorei and contained soy meal (1.0 g), corn meal (31.1 g), corn oil (10.6 g), SACAROSA (13.6 g), sorbic acid (1.0 g), methyl-p-hydroxybenzoate (1.6 g), sorbic acid (4.26 g), agar (15.7 g), formaldehyde at 10% (4.4 ml), clorox at 15% (7.3 ml), acetic acid at 25% (12 ml), vitamin solution (3.5 ml), and distilled water (1 liter). The vitamin solution contained calcium pantothenate (12 ml), niacin (6.0 ml), riboflavin (3.0 ml), folic acid (3.0 ml), thiamine (3.0 ml), pyridoxine (1.5 ml), biotin (0.12 ml), B12 (25 ml) and the volume was brought to 1 liter with distilled water.

Diet Incorporation Bioassays: In Monterrey, diet incorporation assays were done to determine the effect of spray drying on activity of the active agent. Selected formulations

were added to warm artificial diet, lacking the antibiotics, at a rate equivalent to 10, 25, 50, or 100 μg *B. thuringiensis* technical material per mg diet. The diet was then poured into cups (5 \pm 1 ml per cup) and allowed to cool. One neonate was added to each of 75 cups per treatment and held for one week. Probit analysis (Finney 1971) was done to determine LC50 for each formulation for each insect species.

Leaf Bioassays: In Peoria, bioassays on cotton leaves were conducted with *O. nubilalis* and involved methods similar to those reported by Behle et al (1996a). Cotton plants were treated with spray dried formulations added to water. For assays involving rainfastness, formulations were applied over the tops of plants in a spray chamber with a single traveling flat fan nozzle (8002ss, Spraying Systems, Wheaton, IL) at 4.9 kg/cm² and a track speed setting of 3.0 km/h to apply 35 ml total volume. This rate is equivalent to 235 liters/ha. To account for differences in susceptibility to *B. thuringiensis* by laboratory-reared neonate insects, the relative amount of *B. thuringiensis* was reduced because field rates will kill all neonate larvae (MRM unpublished). The rate of 10 mg technical powder /50 ml water was used and generally killed about 85% of the test larvae. For all applications, an amount of spray dried material that contained the equivalent of 10 mg technical material was added to 50 ml water and held until use. For at least 5 min prior to use, suspensions were mixed thoroughly using a magnetic stirrer. The rainfastness assay was conducted in the same chamber as that used to apply formulations. The chamber was modified to provide continuous traversing of the nozzle assembly that was attached to a water source. As the assembly traversed, water was sprayed through a full cone nozzle until 5 cm of water was collected in a rain gauge (approximately 50 minutes of spraying). For solar stability assays, (10 cm²) circles

were marked onto cotton leaves. This area was then treated with 0.033 ml of formulation that was spread evenly across the circle with a glass rod. Once dried, plants were then placed under a light source (CPS SunTest, Hereaus, Hanau, Germany), and exposed for 8 h. Regardless of assay type, leaf disks were cut from the plants after treatment and placed in plastic petri plates containing a filter paper disk. Ten larvae were placed in the dish and capped with a sealing lid. The dishes were held for three days in the dark at 28°C and then percentage mortality was obtained for each dish. Data were analyzed with analysis of variance and means were separated using a protected least significant difference test (Statistix 1994).

To determine if the process of spray drying was adding a benefit to the overall formulation, a test was done comparing spray dried and tank-mix formulations. Spray dried formulations made with 3% and 50% technical material (2 and 10 respectively; Table 2) were compared with a tank mix containing the same ingredients and levels of *B. thuringiensis*. The tank mix formulations had not been spray dried. Solar and rainfastness assays were done as described above.

Results

Diet Incorporation: Assays to determine LC_{50} for spray dried formulations were done for four insect species (Tables 3-6) to determine if the conditions inherent to spray drying (e.g. high temperatures, presence of alcohol) caused a loss of insecticidal activity. In all cases, activity did not decrease when compared with non-spray dried *B. thuringiensis* and in many cases, LC_{50} decreased. This effect could be due to increased feeding due to the large amount of sugar incorporated into the formulation.

Leaf Bioassays: Bioassays were conducted on cotton leaves against *O. nubilalis*. The plant leaf assays gave a good indication of how the formulations protect insecticidal activity of *B. thuringiensis* when exposed to simulated rainfall or simulated sunlight. Previous tests have indicated that these procedures provide results that will be applicable to field performance (Behle et al. 1996a).

Effect of acid type and ratio of nixtamalized flour to unmodified cornstarch:

Formulations with either lactic or citric acid caused high mortality of *O. nubilalis* after exposure of treated leaf surfaces to simulated sunlight compared with technical *B.*

thuringiensis only (Table 7). No significant loss of activity occurred after exposure to sunlight.

In addition, both formulations retained some activity after exposure to artificial rain.

Significant loss of activity did occur upon exposure to sunlight when formulations were made with a ratio of nixtamalized flour to unmodified starch other than 50:50. However,

significantly more activity was retained in these formulations than technical material only.

Very little activity remained after simulated rainfall.

Effect of modified starch type: Five different starch types were incorporated into the

formulations and tested on cotton leaves for rainfastness and solar stability (Table 8). In this test, percent mortality before solar or rain simulation was similar for all formulations, including technical material only, except for the formulation made with oxidized starch. None of the formulations protected the insecticidal activity against 5 cm rainfall. However, several of the formulations provided solar protection; most notably, flour 961, a gelatinized corn flour available commercially.

Effect of amount of *B. thuringiensis* and malachite green: The initial formulation contained only 3% *B. thuringiensis* technical powder. While this rate produced some rather remarkable results with respect to solar stability, to be economically viable, the level of active ingredient must be increased. In leaf assays, a clear trend emerged with respect to solar stability and amount of active ingredient (Table 9). As the level of active ingredient increased, the solar protection decreased. Formulations with *B. thuringiensis* levels of 3 and 10% survived significantly better than formulations with 25 or 50% *B. thuringiensis*. However, formulations with 50% *B. thuringiensis* were significantly better than technical powder alone both before and after exposure to simulated sunlight. Perhaps the initial difference is due to the ingredients in the formulation acting as feeding stimulants. While this may affect overall results, original activity remaining after solar simulation for spray dried formulations with 50% active ingredient (44%) is still better than technical material by itself (39%). As above, none of the formulations provided protection from rainfall. There was no significant improvement in solar stability from the addition of malachite green when the amount of *B. thuringiensis* in the formulation was 3%. There was, however, an effect on rainfastness. The formulation made without malachite green adhered better during the simulated rainfall than

the formulation without malachite green. The formulation without malachite green was not more rainfast than technical *B. thuringiensis*.

Effect of spray drying: To test the effect of spray drying on resistance to wash-off and solar degradation, formulation ingredients were tank mixed using the same proportions and solids levels of two previously made spray dried formulations. While there was no effect on rainfastness, there were two other effects worth noting. First, spray dried formulations made with 50% *B. thuringiensis* gave higher mortality before exposure to sunlight. This effect could be due to the close adherence of potential feeding stimulants to the active agent. The second point is that spray dried formulations provided better solar protection than tank mixed formulations when 3% *B. thuringiensis* is used. The 50% *B. thuringiensis* spray dried formulation did not provide additional solar protection compared with technical material only.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Discussion

Some of the first formulations of *B. thuringiensis* involved some form of protection system and some of the formulations were considered to be encapsulated (Creighton et al. 1961, Angus and Luthy 1972). Angus and Luthy (1972) suggested the use of smudge proof carbon paper as a matrix and demonstrated that the matrix provided phagostimulation, solar protection and did not harm activity. Rainfastness has continued to plague formulations of *B. thuringiensis* and a search for ingredients with resistance to wash-off resulted in the use of pregelatinized starches and flours (McGuire and Shasha 1990). Since this discovery, gluten (Behle et al. 1996b) and casein (Behle et al. 1996a) have been shown to be more effective with smaller amounts of material necessary for resistance to wash-off. In addition, each of these materials provides solar stability to *B. thuringiensis* foliar deposits. However, all of these materials require addition to a spray tank in relatively specific amounts, i.e. flour requires 2 g per 100 ml (2% solids); gluten requires 1% solids and casein requires 0.5% solids. These requirements place limitations on the commercial use of the adjuvants because end users may use different amounts of water for different applications. The spray dried formulation, however, removes this percent solids requirement. By tying the protective matrix directly to the active ingredient and maintaining the two together in the spray tank, the deposition on the leaf surface will survive in response to sunlight.

The spray dried formulations did provide adequate solar protection to *B. thuringiensis* when levels of *B. thuringiensis* were relatively low (3% or 10%) in the formulation. Increasing the amount of *B. thuringiensis* in the formulation is important because costs

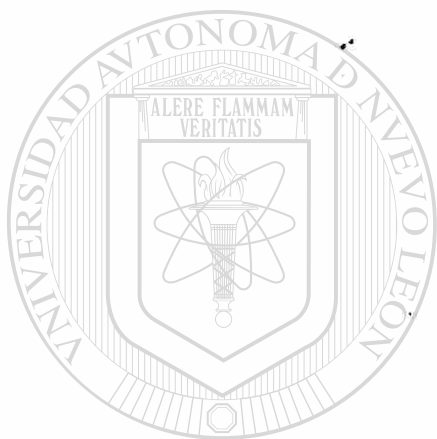
associated with handling and processing large amounts of formulation ingredients could prohibit wide scale use of these formulations. Although costs of the ingredients are relatively low (approximately \$0.50 U.S. dollars/kg for the flour), applying 500 g *B. thuringiensis* per ha in a 3% formulation would require 16.6 kg of formulated product. A 50% formulation would require only 2 kg/ha and is more representative of a commercial formulation.

Surprisingly, rainfastness was not consistently improved with the spray dried formulations and in certain cases performed worse than technical material only (Table 9). Possibly, the granules provide enough relief on the leaf surface to enable water to physically knock the formulation off the plant.

In summary, the formulations presented in this manuscript do provide a mechanism for tying protective ingredients to an active agent. These ingredients are inexpensive, most are commonly available and easy to use. Likewise, the spray drying process and equipment is well known and generally available. The formulations can be added to a spray tank in any ratio to the amount of water and sprayed onto a leaf surface. While these formulations do not render stability to rainfall, they do provide a high level of solar stability.

Acknowledgments

We wish to thank Jeff Baumgardner, Joy Steinkamp, Erica Bailey, and Brian Finnerty for technical assistance in Peoria and — in Monterrey.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Literature Cited

- Angus, T. A. and P. Luthy. 1971. Formulation of microbial insecticides. pp. 623-638. In H. D. Burges and N. W. Hussey [eds.], *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, New York.
- Bartelt, R. J., M. R. McGuire, and D. A. Black. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Environ. Entomol.* 19:182-189.
- Behle, R. W., M. R. McGuire, R. L. Gillespie, and B. S. Shasha. 1996a. Effects of alkaline gluten on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* in press
- Behle, R. W., M. R. McGuire, and B. S. Shasha. 1996b. Extending the residual insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* with casein-based formulations. *J. Econ. Entomol.* in press.
- Cannerday et al. 1975.
- Castro Franco, R. 1994. Desarrollo de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* y extracto de *Agave lechuguilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith). Doctoral dissertation, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico. 66 pp.
- Connick, W. J., Jr., C. D. Boyette, and J. R. McApLine. 1991. Formulations of mycoherbicides using a pasta-like process. *Biol. Control* 1:281-287.
- Creighton et al. 1961.

Dunkle, R. L., and B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol. 17:1201-126.

Finney 1971

Gillespie, R. L., M. R. McGuire, and B. S. Shasha. 1994. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 87:452-457.

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

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

Ortega, A., S. K. Vasal, J. Mihm, and C. Hershey. 1980. Breeding for insect resistance to maize. pp. 371-419. In F. G. Maxwell & P. R. Jennings [eds.], Breeding plants resistant to insects. Wiley, New York.

Shahidi, F. and X. Han 1993. Encapsulation of food ingredients. Crit. Rev. Food Sci. Nut. 33:501-547.

Shorei

Statistix Analytical Software Version 4.0. 1994. Analytical Software, 1958 Eldridge Avenue. St. Paul, MN 55113.

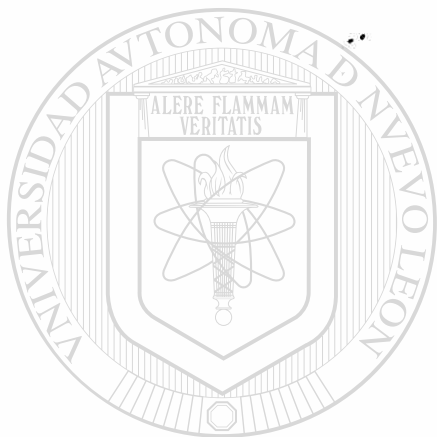
Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, H. Medrano-Roldan, and L. J. Galan-Wong. 1996. Microcapsulacion de pesticidas. Patent Application SN ??? 21 pp.

Taylor, A. H. 1985. Encapsulation systems and their applications in the flavor industry.

Food Flav. Ingred. Pack. Proc. 5:48-49, 51-52.

Youngs, R. A. 1986. Spray drying encapsulation - today's review. Food Flav. Ingred. Pack.

Proc. 8:31.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Table 1: Ingredients used in the formulations

<u>Ingredient</u>	<u>Source</u>
Nixtamalized flour	Maseca, location
Cornstarch	CPC products, New Jersey
Miragel	Staley, Inc. Decatur, IL
Flour 961	Illinois Cereal Mills, Paris, IL
Oxidized Starch	National Starch, New Jersey
Potato Starch	National Starch, New Jersey
Enriched Bleached Wheat Flour	IGA Grocery store brand
Corn Oil	Mazola, CPC International, New Jersey
Powdered Sugar	IGA Grocery store brand
Citric acid	Eastman, Rochester, New York
Lactic Acid	Fisher Chemical, New Jersey
Isopropyl alcohol	Fisher Chemical, New Jersey

Table 2: Amounts of ingredients used for different tests.

Ingredient	Formulation Number												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nixtamalized flour (g)	50	50						50	50	50	25	75	50
Cornstarch (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	75	25	50
Miragel (g)			50										
Flour 961 (g)				50									
Oxidized Starch (g)					50								
Potatin Starch (g)						50							
Enriched Flour (g)													50
Citric acid (ml)	0.5												
Lactic Acid (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Malachite green (mg)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
<i>B. thuringiensis</i> (mg)	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	22	55	110	6.6	6.6	6.6

All formulations also contained 100 g powdered sugar, 120 ml isopropyl alcohol, and 20 g oil.

Table 3. Effect of spray drying on activity of *B. thuringiensis* insecticidal activity in diet incorporation tests against *Helicoverpa zea*

Formulation(#) ¹	Slope (\pm SE)	LC ₅₀	95% CI	X ²
Technical only ²	2.195 (\pm 0.3323)	7.77	10.266-4.951	0.441
Citric (1)	2.482 (\pm 0.4243)	6.80	9.036-4.116	3.417
Lactic (2)	2.194 (\pm 0.4588)	4.06	7.047-1.856	4.062
Miragel (3)	2.33 (\pm 0.3622)	7.62	9.996-4.896	1.613
961 (4)	2.352 (\pm 0.4141)	6.32	8.641-3.580	2.223
10% Bt (8)	1.979 (\pm 0.4135)	4.22	6.746-1.513	1.334
Maseca 25 (11)	1.538 (\pm 0.2653)	6.52	9.740-3.141	3.285
Maseca 75 (12)	1.467 (\pm 0.2616)	5.82	9.065-2.527	2.639

¹Refer to Table 2

²Technical Bt only

Table 4. Effect of spray drying on activity of *B. thuringiensis* insecticidal activity in diet incorporation tests against *Trichoptusia ni*

Formulation(#) ¹	Slope (±SE)	LC ₅₀	95% CI	X ²
Technical only ²	1.583 (±0.2015)	1.23	1.697-0.7984	0.643
Citric (1)	1.241 (±0.2121)	0.44	0.796-0.154	0.720
Lactic (2)	0.870 (±0.2245)	0.09	0.335-0.0022	5.329
Miragel (3)	1.461 (±0.2148)	0.71	1.085-0.365	1.919
961 (4)	1.416 (±0.2405)	0.45	9.778-0.173	0.138
10% Bt (5)	1.176 (±0.2410)	0.27	0.579-0.0545	3.257
Maseca 25 (11)	1.048 (±0.1775)	0.55	1.010-0.189	3.070
Maseca 75 (12)	1.185 (±0.2044)	0.51	0.905-0.184	1.753

¹Refer to Table

²Technical Bt only

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Table 5. Effect of spray drying on activity of *B. thuringiensis* insecticidal activity in diet incorporation tests against *Heliothis virescens*

Formulation(#) ¹	Slope (\pm SE)	LC ₅₀	95% CI	X ²
Technical only ²	2.319 (\pm 0.3327)	8.72	11.165-5.968	0.545
Citric (1)	2.313 (\pm 0.3848)	6.86	9.222-4.115	1.201
Lactic (2)	1.922 (\pm 0.3993)	4.20	6.756-1.488	0.971
Miragel (3)	2.017 (\pm 0.3043)	8.00	10.699-5.001	0.204
961 (4)	2.409 (\pm 0.4046)	6.90	9.190-4.192	2.018
10% Bt (5)	1.997 (\pm 0.3903)	4.83	7.354-2.0416	1.027
Maseca 25 (11)	1.711 (\pm 0.3129)	5.01	7.789-2.129	0.272
Maseca 75 (12)	1.365 (\pm 0.2927)	3.47	1.365 \pm 0.292	0.605

¹Refer to Table

²Technical Bt only

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Table 6. Effect of spray drying on activity of *B. thuringiensis* insecticidal activity in diet incorporation tests against *Spodoptera exigua*.

Formulation(#) ¹	Slope (+SE)	LC ₅₀	95%CI	X ²
Technical only ²	2.72 (0.311)	13.93	11.30-16.47	0.0025
Citric Acid (1)	2.68 (0.397)	8.74	6.22-8.74	3.75
Lactic Acid (2)	2.08 (0.362)	5.68	2.92-8.16	0.70
Miragel (3)	2.26 (0.325)	8.43	5.64-10.91	1.26
Flour 961 (4)	2.47 (0.407)	7.18	4.50-9.43	2.25
10% Bt (5)	2.75 (0.388)	9.12	6.67-11.24	2.25
Maseca 25% (11)	1.63 (0.237)	11.52	7.54-15.23	7.56
Maseca 75% (12)	1.82 (0.244)	12.81	9.07-16.31	6.19

¹Refer to Table 2

²Technical Bt only

Table 7. Effect of acid type and ratio of nixtamalized flour to buffalo starch on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis* as measured by percentage mortality of *Ostrinia nubilalis* placed on treated cotton leaves

Formulation (#) ¹	Exposure of Leaf Surfaces		
	None	Rain	Solar
Citric Acid (1)	100.0	64.4	92.5
Lactic Acid (2)	99.0	59.4	91.8
25:75 (11)	98.0	19.5	76.2
75:25 (12)	100.0	27.0	78.0
Technical Bt only	59.0	10.4	36.1

Cotton leaves were treated with formulation, then exposed to simulated rainfall or sunlight, then fed to neonate *O. nubilalis*. $F=29.08$, $df=14, 126$, $P<0.001$; critical value (SE) for comparison 16.276 (8.225)

¹See Table 2 for formulation composition.

Table 8. Effect of modified starch type on activity of *Bacillus thuringiensis* as measured by percentage mortality of *Ostrinia nubilalis* placed on treated cotton leaves

Formulation (#) ¹	Exposure of Leaf Surfaces		
	None	Rain	Solar
Miragel (3)	94.0	17	66
Flour 961 (4)	94	35	80
Oxidized starch (5)	59	23	41
Potato Starch (6)	78	17	74
Enriched flour (7)	86	29	71
Technical Bt only	84	27	40

Cotton leaves were treated with formulation, then exposed to simulated rainfall or sunlight, then fed to neonate *Ostrinia nubilalis*. $F=16.00$, $df=20,180$, $P<0.001$; critical value (SE) for comparison 18.544 (9.398)

¹See Table 2 for formulation composition.

Table 9: Effect of relative amount of *Bacillus thuringiensis* and malachite green on insecticidal activity of formulations as measured by percentage mortality of *Ostrinia nubilalis* placed on treated cotton leaves

Formulation (#) ¹	Exposure of Leaf Surfaces		
	None	Rain	Solar
3% (2)	100.0	6.9	95.8
10% (8)	100.0	4.2	86.0
25% (9)	95.0	7.0	64.4
50% (10)	96.0	6.0	42.0
Without green (13)	100.0	20.5	91.0
Technical Bt only	49.3	15.1	19.2

Cotton leaves were treated with formulation, then exposed to simulated rainfall or sunlight, then fed to neonate *O. nubilalis*. $F=118.20$, $df=20,177$, $P<0.001$; critical value (SE) for comparison 10.23 (5.184)

¹See Table 2 for formulation composition.

Table 10: Effect of spray drying on activity of *Bacillus thuringiensis* as measured by percentage mortality of *Ostrinia nubilalis* placed on treated cotton leaves

Method ¹	Level of B. t	Exposure of Leaf Surfaces		
		None	Rain	Solar
Spray dry (1)	3%	100.0	10.1	90.0
Spray dry (10)	50%	83.8	5.0	25.2
Tank mix	3%	97.0	2.0	71.0
Tank mix	50%	69.8	3.0	32.5
Technical Bt only		53.6	24.8	32.7

Cotton leaves were treated with formulation, then exposed to simulated rainfall or sunlight, then fed to neonate *O. nubilalis*. $F=68.7$, $df=15,159$, $P<0.001$. LSD Critical value for comparison = 12.28

¹Refer to Table 2

For: **Southwestern Entomologist**

Send Correspondence to:

Patricia Tamez-Guerra

Dpto. de Microbiología

Fac. de Ciencias Biológicas, UANL

Ave. Pedro de Alba y Manuel Barragán Sur

Cd. Universitaria. A. P. 414.

San Nicolás de los Garza, N. L. Méx. 66450

(8) 352-24-22, 376-45-37.



***Bacillus thuringiensis* microencapsulated formulation for control of the coleopteran
Epilachna varivestis Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae)**

Patricia Tamez-Guerra^{1,4}, Hiram Medrano-Roldán², Luis J. Galán-Wong¹, and Cipriano
García-Gutiérrez³

¹ Dpto. de Microbiología. Fac. de Ciencias Biológicas, UANL. Ave. Pedro de
Alba y Manuel Barragán Sur. Cd. Universitaria. A. P. 414. San Nicolás de los
Garza, N. L. Méx. 66450. (8) 352-24-22, 376-45-37.

² Dpto. de Biotecnología. Instituto Tecnológica de Durango. Durango, Dgo,
México

³ Dpto. de Entomología. Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional. IPN. Vicente Guerrero. Dgo, Mexico

⁴ To whom reprint requests should be directed.

ABSTRACT

The process for microencapsulating a strain *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (C-9), for the biocontrol of *Epilachna varivestis* Mulsant, a bean pest, is discussed. This strain was isolated from a dead *E. varivestis* from a bean (*Phaseolus vulgaris*) field in Durango, Mexico. The bioinsecticide activity of this microcapsulated strain had an LD₅₀ of 397 µg/ml against coleopteran larvae in bioassays with plants, and an LD₅₀ of 219.35 µg/ml against *Trichoplusia ni* larvae using artificial diets. The formulation was prepared with equal parts of corn starch and corn nixtamalized flour as a formulation matrix, as well as vegetable oil, powdered sugar, isopropanol, malachite green (photoprotector), and formaldehyde (antioxidant). This mixture was microencapsulated using the spray dry technique. Residual activity of the original formulation was observed 15 days after exposure to environmental conditions on plants, and after six months and two years in storage. A field test under dry conditions, using a sprayable formulation at 3% of the active ingredient, showed mortality of 75 and 16%, eight and fifteen days after application respectively of the C-9 microcapsules. If it rained after application, the activity fell to 14% in one week. This study shows the possibility of using *Bt* microencapsulated material for pest control in bean.

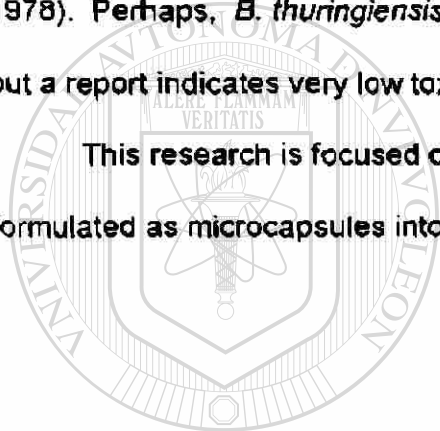
KEY WORDS: coleopteran, *Epilachna varivestis*, microencapsulated formulations, *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis used against insects as a biocontrol agent has received considerable attention in recent years. The field experiments have been directed toward protection of *B. thuringiensis* spores and crystals from noxious environmental factors. Good results were obtained with granulated formulations employing corn meal bait (Creighton *et al*, 1961; Cannerday *et al*, 1975); and optimum conditions of dispersion, residuality and application in the field (Dunkle & Shasha, 1988). The research on formulation technology for *B. thuringiensis* principally includes UV-protectants, adherents, and phagostimulants (Angus & Lüthy, 1971; Dunkle & Shasha, 1989; Liu *et al*, 1993; McGuire *et al*, 1989, McGuire *et al*, 1990). Recently, different materials were used for preparing granulated matrices or microcapsules, depending on the type of crop and application. In general, the granulated formulations are used in crops where retention on the leaf is possible (corn, cotton, grass, etc.) (Dunkle & Shasha, 1988). In field crops most microbial applications, both experimentally and operationally, are foliar sprays (Couch, 1978). Currently, sprayable formulations are used more extensively than granular formulations (McGuire & Shasha, 1990).

Microencapsulated *B. thuringiensis* formulations have been used successfully against the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) (Zehnder *et al*, 1992). The Mexican bean beetle *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), is an important pest in bean, soybean and lima bean crops (Kogan, 1971), causing serious economic loss, especially in irrigated crops (Valdez & Alvarez, 1991). This

pest is distributed from Panama to southern Canada (Kogan & Pitre, 1980). In Durango, Mexico, 10-100% of the bean foliage is consumed by this pest every year, especially in irrigated crops. Current control techniques include chemical insecticides and, more recently, occasional introductions of a parasitoid wasp *Pediobius foveolatus* Crawford (Hymenoptera: Eulophidae). However, the parasitoid just attacks pupae, and the damaging larvae are not controlled (Carrillo-Sanchez, 1971; Bernhardt & Shepard, 1978). Perhaps, *B. thuringiensis* could be used in several crops against *E. varivestis*, but a report indicates very low toxicity (Keller & Langenbruch, 1993).

This research is focused on the possibility of introducing *B. thuringiensis* formulated as microcapsules into bean crops as a bioinsecticide against *E. varivestis*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Materials and Methods

Strain production. The strain used was C-9 (subsp. *kumamotoensis*) obtained from the International Collection of *Bacillus* Entomopathogens located at the Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon. This strain was isolated from a dead *E. varivestis* in Durango, Mex. Spores and crystals were produced using a fermentation process in a fermentor (Microferm New Brunswick MF-214). The fermentation media contained: molasses, 20.0 g; soy flour, 20.0 g; corn liquor, 10.0 g; CaCO₃, 2.0 g; tap water, 1000 ml; at pH - 7.2 ± 0.2. The fermentation conditions were automatically maintained. They included agitation at 700 rpm; temperature, 30°C ±5°C; pH 7.0 ± 1.0. Oxygen saturation was 90-100% initially and oxygen was supplied at 1 v.v.m. (air volume/ media volume/minute). The process was followed with microscopic examinations every two hours until ca. 90% of spores and crystals were liberated. The spore-crystal complex was obtained following coprecipitation with lactose (Dulmage et al, 1970).

Bioassays. The strain was tested against first instar larvae of the coleopteran *E. varivestis* with bean leaves and the lepidopteran *Trichoplusia ni* with an artificial diet under laboratory conditions. For *E. varivestis*, bean leaves were inoculated with 100 µl of each concentration on a marked area of 33 cm² and allowed to dry. The concentrations employed were 10, 25, 50, 100, and 250 mg/50 ml of spore-crystal complex or active ingredient of the microencapsulated formulation. A disk was cut from

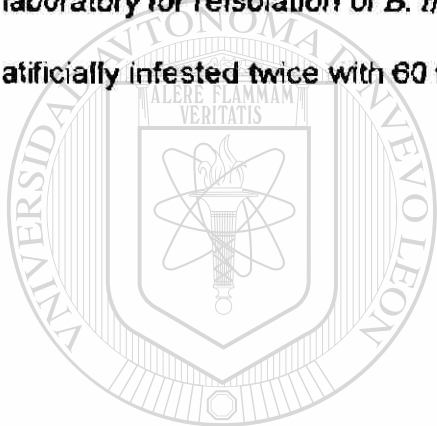
each leaf and put in a plastic dish. Each disk was infested with three larvae, using five repetitions by treatment, and one negative control. The dishes were maintained in a room at $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, and $65\% \pm 5\%$ relative humidity (RH) for five days and supplied with one untreated leaf each third day. The LD_{50} was obtained using the Probit statistical method (SAS, 1989). Bioassays with the lepidopteran *T. ni* were done using first instar larvae and artificial media (modified Shorei diet) (Castro-Franco *et al*, 1995). The concentrations employed were 5, 10, 13, 15, 25, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with three repetitions and 25 larvae/repetition; one larva per container. Each treatment was maintained at $28^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, and $65\% \pm 5\%$ of RH, for one week. The LD_{50} was obtained in the same way as for the coleopteran larvae.

Encapsulating agents. Two different materials were used for matrix encapsulation at three concentrations: 0.0, 50.0, and 100.0 g cornstarch (MaizenaTM) and (0.0, 50.0, and 100.0 g) nixtamalized corn flour (MasecaTM). Vegetable oil (CapulloTM) was also assayed in several portions (5.0, 10.0, 20.0, 40.0 and 50.0 ml) for polar coating. The other materials used were: isopropanol (CapulloTM), 120.0 ml; powdered sugar (Valle VerdeTM) 100.0 g; malachite green and its oxalate salts (MerckTM), 0.1 g; as a solar protectant, and formaldehyde (BakerTM), 0.5 ml, as an antioxidant (Castro-Franco, 1994). The different mixtures were subjected to the following rheological assays: viscosity, shear rate, and fluid type, following the methodology of Rao (1992). The viscosimeter was a Brookfield RVF and employed a correction factor of a sucrose standard at 60%. The viscosity measurements were at 20°C , 30 min. and 2 h after initial mixing.

Microencapsulation procedures. The microencapsulating technique employed a spray dryer with an Apex SSE (Niro atomizer). The conditions for microencapsulation were: feed source, 10 ml/min; air temperature in, 130°C; air temperature out, 60°C; air pressure 4 Kilopounds (Kp); (Saucedo-Mendiola, 1990). Moisture content of the microencapsulated formulation has measured immediately, six months and two years after preparation. Moisture content was obtained by determining dry weight (Lynch et al, 1972). Texture, particle size, percent dissolved solids were also tested. The insecticidal activity (% mortality) was measured the same way as described above, but using only two concentrations of active ingredient in the formulate product: 500 and 50 µg/ml. This test also was done against *T. ni* larvae immediately after preparation and after six months and two years of storage, and with *E. varivestis* after six months and two years of storage.

Adherence of formulations to leaf surface. The different formulations were assayed on bean plant leaf surface grown in greenhouse conditions. The bean, *Phaseolus vulgaris var peruano*, was planted in plastic pots (25 cm diameter), with 25-30 plants per pot; and the plants were used approximately 3 wk later when 2-4 true leaves had expanded on each plant. The formulation was mixed with water (100.0 g in 500.0 ml) and was sprayed on bean plants with a plastic manual sprayer of 1000 ml, approximately 10 ml/plant. The plastic pots were placed in a greenhouse without rain. Other pots were left under environmental conditions, and were natural rained on two hour after spraying. Leaf surfaces were examined grossly and microscopically every 1-2 d to obtain the percent of original material remaining.

Persistence assays. Three different materials were assayed with the strain to determine residual insecticidal activity of *B. thuringiensis* on a bean crop naturally infested by *E. varivestis* in Vicente Guerrero, Dgo, Mex. Plot size was 3 m by 1.5 m with 15-20 bean plants/plot. The microencapsulated formulation containing 4% w/w of *B. thuringiensis* was sprayed at a rate of 100 liter/hectar, (2 kg/hectar of the formulation). Live and dead larvae were counted each week and taken to the laboratory for reisolation of *B. thuringiensis*. When no larvae were found, the crop was artificially infested twice with 60 first and second instar larvae.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Results

Strains production. The fermentation behavior was as follows: 200 ml antifoam consumed; 200 ml 20% HCl consumed; 20 ml 20% NaCl consumed; sporulation occurred in about 18 h; total fermentation time was 30 h. The rate of active ingredient production (spore-crystal complex) was 13.1 g/l employing the lactose coprecipitation method. The results of bioassays were expressed as % mortality and they are shown in Table 1.

Rheological Properties of Encapsulating Materials. The first encapsulating material assayed was corn starch . One hundred grams was manually mixed with 20 ml of vegetable oil . This was added to 280 ml of warm water (60-70°C) and a dough formed, and 100 g pulverized sugar was then added. At this moment, the mixture behaved like a liquid as a result of the decrease in water activity giving a low rate of viscosity (11.264 centipoises (cp), Table 2). When the nixtamalized corn flour was substituted for the cornstarch, the viscosity value was greatly increased (1,434.353 cp). A third assay with equal parts of both (50 g each), obtained a viscosity value of 49.28 cp. The viscosity measurement was taken immediately and again two hours after mixing, with variable velocity, to determine the fluid type (Newtonian or non-Newtonian). The viscosimeter is most accurate between 20 and 500 cp. Non-Newtonian fluids give unequal values at different times and velocities. It was found that using only nixtamalized corn produced a non-Newtonian pseudoplastic fluid type (Table 2). There were also assays of different amounts of vegetable oil, whose function as a

phagostimulant and nonpolar coat of microcapsules is very important. Low quantities (5-10 ml), did not give a good coat and it appeared that the material dissolved very fast. Large amounts (40-50 ml) caused clumping of the microcapsules. The most suitable quantity was 20.0 ml. The viscosity values with starch and nixtamalized matrixes and variable quantities of vegetable oil were: 5.0 ml = 4.2 cp; 10.0 = 5.5 cp; 40.0 ml = 12.0 cp; and 50.0 ml = 14.2 cp. The shear rate and fluid type is also shown in Table 2.

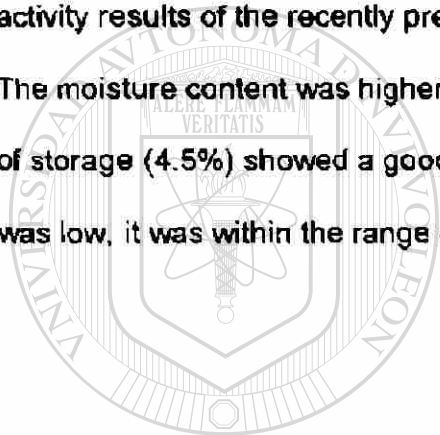
Microencapsulation characteristics. The microencapsulated formulations presented several characteristics. There were more large particles when only nixtamalized corn was added. The other formulations were suitable for spraying. The mixture of nixtamalized corn with corn starch and corn starch alone had lower solubilities and remained in suspension longer. There were no significant differences in moisture content. We found that the moisture content was approximately 4.5% after two years (Table 4).

Adherence to Leaves. The different formulations showed variable adherence to bean leaves. All of them displayed a certain degree of agglutination, and nixtamalized corn was most likely to obstruct the spray nozzle. The small particles were retained more efficiently than the larger sizes. 65% of the microcapsules were retained up to 12 days in dry conditions, but were easily washed off by rain. Microscopically, we observed the aggregation of materials after spraying on a glass slide, but the aggregates were easily washed off.

Persistence assays. Microcapsulates were applied to bean crops naturally *E. varivestis* infested. Larvae were in different instars at the time of application. Seven

days after applying the *B. thuringiensis*-microcapsules, we found only living pupae. No larvae were present. A few pupae showing softness or blackness were collected and re-isolation of *B. thuringiensis* was reisolated. Mortality rate after artificial infestation was 65% at 8 d and 16% at 15 d after application. When the pots were exposed to rain, the mortality fell to 13% after one week (Table 3).

Microcapsulation stability and shelf life. The moisture content and toxic activity results of the recently prepared and stored formulations are shown in Table 4. The moisture content was higher in the older formulations, but the value after two years of storage (4.5%) showed a good shelf life. Although the toxic activity after two years was low, it was within the range of most *B. thuringiensis* formulations.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Discussion

The toxicity of *B. thuringiensis* against coleopteran has been studied relatively recently (Krieg, 1989) by investigators using *B. thuringiensis* serovar. *tenebrionis*. Subsequently, a few strains active against these insects have been reported, but the toxicity of each strain is variable against different coleopteran species (Herrnstadt *et al*, 1986). Reports indicate slight toxicity against the *E. varivestis* by *B. thuringiensis* (Keeler & Langenbruch, 1993). Using bioassays we confirmed these findings. In the field test, the application of this formulation reduced the number of larvae, but the natural mortality of these larvae is 60% for first instar and 35% for the second instar (Bernhardt & Shepard, 1978). This work shows the same as was mentioned by Keeler and Langenbruch (1993) that the economic control of *E. varivestis* with *B. thuringiensis* seems unlikely. In addition to the δ -endotoxin, the β -exotoxin has been reported as toxic to *E. varivestis* (Cantwell *et al*, 1985, cited by Keeler & Langenbruch, 1993), and we observed a cytotoxic effect likely be caused by β -exotoxin in mice.

Since the 1960's, encapsulation as a protection system for *B. thuringiensis* formulations has been studied (Creighton *et al*, 1961; Angus & Lüthy, 1971). Angus and Lüthy, (1971) suggested encapsulation of spores and crystals of bacilli by a method similar to that used in producing smudge-proof carbon paper. They used a matrix that was a phagostimulant and less sensitive to sunlight while toxicity was unaffected. Zehnder *et al* (1992) found that the success of *B. thuringiensis* against

coleopterans depended on using a microencapsulated formulation. An interesting observation that should be followed up is that in the bioassays, the larvae would not eat the treated parts of the leaf. Instead they fed on the untreated edge of the disks. This lack of palatability may explain the seeming nonsusceptibility of coleopteran larvae to the effects of *B. thuringiensis* toxin.

When we tested the sprayable formulation of corn starch, we found increased water solubility (Chinachoti, 1993). Low water solubility is desirable to reduce the loss of active ingredients from the microcapsules. On the other hand, when nixtamalized corn flour was used as encapsulating materials it produced good results in large granule formulations (Castro-Franco, 1994). The nixtamalization process in Mexico includes both heat and alkaline treatment after which 80-90% of the molecules are pregelatinized forming a meshlike matrix (Collison, 1968). Employing only nixtamalized corn as an encapsulating matrix, we found the particle size was too large and unsprayable. Smaller particles also remain in suspension longer. We think that the matrix based on corn starch and nixtamalized flour is a material suitable for spraying. This formulation gives adequate solar protection to *B. thuringiensis*, but lacks the ability to adhere to the leaves. These results were comparable to others obtained with the same formulation prepared with the HD-1 strain in artificial conditions tested against *Ostrinia nubilalis* on cotton plants using a solar lamp and simulated rain as reported in a previous paper (Tamez-Guerra *et al*, unpublished).

Although we found no difference in bean yield between the control and treated plots, we feel it was because of a later attack by *Esigmene acrea* (Lepidoptera:

Arctiidae) on both treated and control plots in the first year. The second year we found that *E. varivestis* did not infest either the control plots or the treated plots in high numbers.

Our studies show that the toxic activity is conserved for two years in storage in conditions below 28°C. Although higher than the freshly prepared material, the moisture content of the stored formulation (4.5%) showed it has a good shelf life. With this formulation we have the possibility of using *B. thuringiensis* strains for *E. varivestis* pest control on beans. Moreover, we show that preparation of these materials is economical and accessible to the manufacturer and may be applied by spraying. It may be possible to use this methodology for bioinsecticide production, but to use this process successfully, we need to look for another adherent material suitable for use in the spray dry technique and that maintains the shelf life of the product.

Literature cited

Angus, T. A., and P. Lüthy. 1971. Formulation of microbial insecticides. In: Microbial control of insects and mites. H. D. Burges, and N. W. Hussey -ed. Academic Press. London, N. Y. 623-637.

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

Cannerday, T. D., H. Womack, C. Boone, J. McKeown, O. L. Brooks, and C. Perry. 1975. Cotton insect investigations in Georgia. Report for 28th Annual Cotton Insect Research and Control Conference. 15 p.

Carrillo Sanchez, J. L. 1977. Control biológico de la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Mulsant en México. *Agric. Tec. Mex.* 4: 63-71.

Castro-Franco, R. 1994. Desarrollo de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* y extracto de *Agave lechuguilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith). Doctoral thesis. FCB, UANL. Monterrey, N. L. México. pp 35-36

Castro-Franco, R., J. S. García-Alvarado, L. J. Galán-Wong, and A. Gallegos-del Trejo. 1995. Efecto sinérgico de extractos de bagazo de *Agave lechuguilla* Torr. en la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith). *PHYTON.* 57: 113-119.

Chinacoti, P. 1993. Water mobility and its relation to functionality of sucrose-containing food systems. *Food technology.* pp:134-140.

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

Dulmage, H. T.; Correa, J. A., and A. J. Martinez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Path.* 15:15-20.

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

Keeler B., and G. A. Langenbruch. 1993. Control of coleopteran pests by *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs. John Wiley & Sons Ltd. 171-191 p.

Kogan, M. 1971. Feeding and nutrition of insects associated with soybean: 1. Growth and development of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*, on artificial media. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 64: 1044-1050.

Lynch, M. J., S. S. Raphael, L. D. Mellor, P. D. Spare, and M. J. H. Inwood. 1972. *Métodos de Laboratorio*. Editorial Interamericana, S. A. México, D. F. 52-64 p.

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

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

SAS Institute. 1989. SAS user's guide: statistics SAS Institute. Cary, N. C., USA.

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

Sparks, R. E. 1981 Microencapsulation, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemistry and Technology*. Vol 15. 3ed ed., Grayson, M. & David, E., Eds., John Wiley & Sons. New York. pp 470.

Taylor, A. H. 1985. Encapsulation systems and their applications in the flavor industry. *Food Flav. Ingrid. Packg. Proc.* 5: 48-49, 51-52.

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

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

Table 1. Percent mortality of *Epilachna varivestis* and *Trichoplusia ni* larvae using leaves and artificial diet respectively treated with strain C-9.

<i>Epilachna varivestis</i> ¹		<i>Trichoplusia ni</i> ²	
Dose (µg/50ml)	Percentage mortality	Dose (µg/ml)	Percentage mortality
25	0/15	5	3/75
50	1/15	10	17/75
100	4/15	13	17/75
250	7/15	15	22/75
500	10/15	25	31/75
1000	14/15	50	38/75
Control	0/15	100	42/75
		Control	1/75

1. Bioassays on bean leaves, $LD_{50} = 397 \mu\text{g/ml}$. Slope 95% $264 - 2.3 \times 10^5$

2. Bioassays on artificial diet, $LD_{50} = 219.35 \mu\text{g/ml}$. Slope 95% 156-668.

Probit stadistic method (SAS, 1989).

Table 2. Rheological properties of encapsulating agents.¹

	Corn flour	Corn Starch	Both (50-50)
Viscosity (cp) ²	1434.179	11.264	49.28
Reading	43.0	3.2	8.0
rpm ³	2	20	20
correction factor	33.353	3.52	6.25
Fluid type	non-Newtonian ⁴	Newtonian	non-Newtonian
Share rate	high	low	medium

1. With 20 ml of vegetable oil

2. Centipoises

3. Revolutions per minute

4. Pseudoplastic

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

Table 3. Toxic activity persistency of a sprayable *B. thuringiensis* formulation in bean field infested both naturally and artificially with Mexican bean beetle.¹

	Number of larvae naturally infesting		Number of larvae artificially infested ²		
	Initial	After 8 days	Initial	After 8 days	After 15 days
Without rain	80	>10 (88%)	60	21 (65%)	51 (16%)
With rain	80	72 (14%)	60	52 (13%)	N. D.

1. The number in the parenthesis indicates the mortality percent. Average of three replications.

2. Artificial infestation was done each week after the first application.

Table 4. Moisture content and toxic activity vs *E. varivestis* and *T. ni*, of microcapsulated C-9 *B. thuringiensis* strain

	Immediately	Six month later	Two years later
Moisture content	1.2	2.8	4.5
Insect	Percent mortality (500 µg/ml)		
<i>E. varivestis</i> ¹	64	48	52
<i>T. ni</i> ²	88	72	66

1. Bioassays on bean leaves, average of five replications, three larvae per replication
 2. Bioassays on artificial diet, average of three replications, 25 larvae per replication

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





ACADEMIC
PRESS

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

C/FG

21 March 1996

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

Dear Dr Tamez-Guerra and Dr Galan-Wong

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

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

Yours sincerely

Francesca Georgiou
Contracts Department

Enc.

TABLE OF CONTENTS

III Bacteria

3 Bioassay of *Bacillus thuringiensis* against Lepidopteran larvae

A. Introduction

B. Diet-based bioassays

1. Cup preparation

2. Sample preparations

a. Concentrations

b. Making the dilutions

3. Infestation, incubation and evaluation

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

1. Laboratory bioassays

a. *B. thuringiensis* extraction

b. Bioassays of extracted *B. thuringiensis*

2. Greenhouse bioassays

a. Application and infestation

b. Incubation and evaluation

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

1. Application of *B. thuringiensis*

a. Track sprayer

b. Spreading

c. Leaf dipping

2. Concentration of *B. thuringiensis*

3. Disk bioassay

a. Removal of leaf disk

b. Addition of insects

c. Incubation and evaluation

4. Measuring solar stability of foliar deposits of *B. thuringiensis*

a. Solar simulators

b. Treatment of leaves

c. Exposure

5. Measuring rainfastness of foliar deposits of *B. thuringiensis*

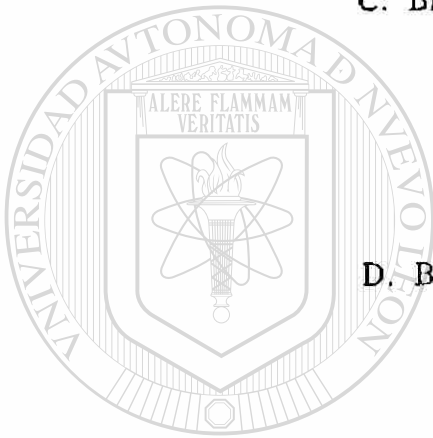
a. Rain simulator

b. Preparation of plants

c. Rain application

E. Conclusions

F. References



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Bioassay of *Bacillus thuringiensis* Against Lepidopteran Larvae

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

A. Introduction

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

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

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

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

B. Diet Based Bioassays

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

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

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

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

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

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

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

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

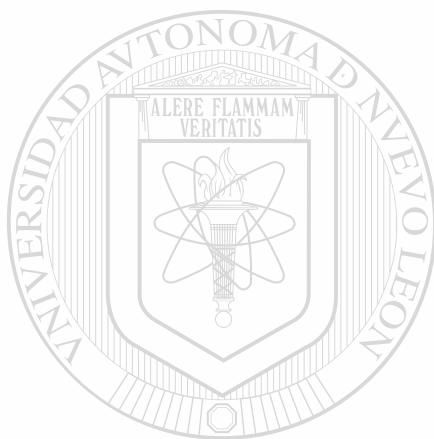
ii) Each suspension is homogenized with a vortex mixer just prior to making the next dilution in the series and again just before adding it to the diet.

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

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

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

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

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

Therefore the *B. thuringiensis* must be extracted from the granule to determine its activity in a laboratory setting.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

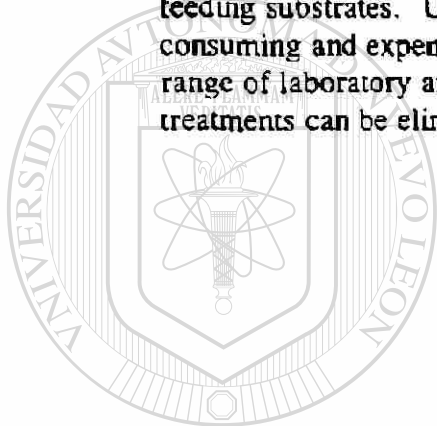
b. Preparation of plants. After plants are treated with *B. thuringiensis* and allowed to dry thoroughly, they can be placed in the rain simulator. It is important that the plants be placed in the center of the simulator at a distance of about 1 m from the spray nozzle. And 0.5 m from the ends of the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

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

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

E. Conclusions

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

F. References

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267

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

Dulmage, H. D., Boering, O. P., Rehnborg, C. S., and Hansen, D. G. (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. *J. Invert. Pathol.* 81, 240-245

Gillespie, R. L., McGuire, M. R., and Shasha, B. S. (1994) Palatability of flour granular formulations to European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 452-457

McGuire, M. R., Shasha, B. S., Eastman, C. E., and Oloumi-Sadeghi, H. (In press). Effect of starch and flour based formulations on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*

McGuire, M. R., Shasha, B. S., Lewis, L. C., and Nelsen, T. C. (1994). Residual activity of granular starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 87, 631-637

Robertson, J. L. and Priesler, H. K. (1992). "Pesticide Bioassays with Arthropods" CRC Press, Boca Raton. 144 pp.

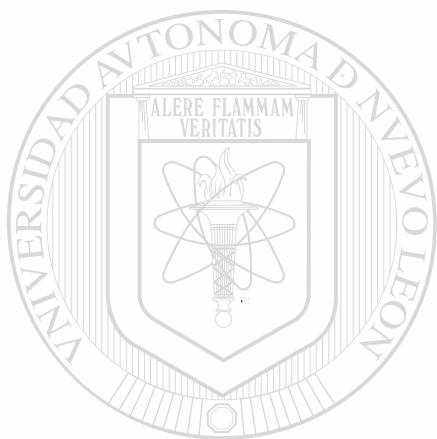
Table 1. Diet used for rearing and bioassay of lepidopteran insects

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

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

^b DW = distilled water.

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figure Legends

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ON[®]

Fig. III-3-1

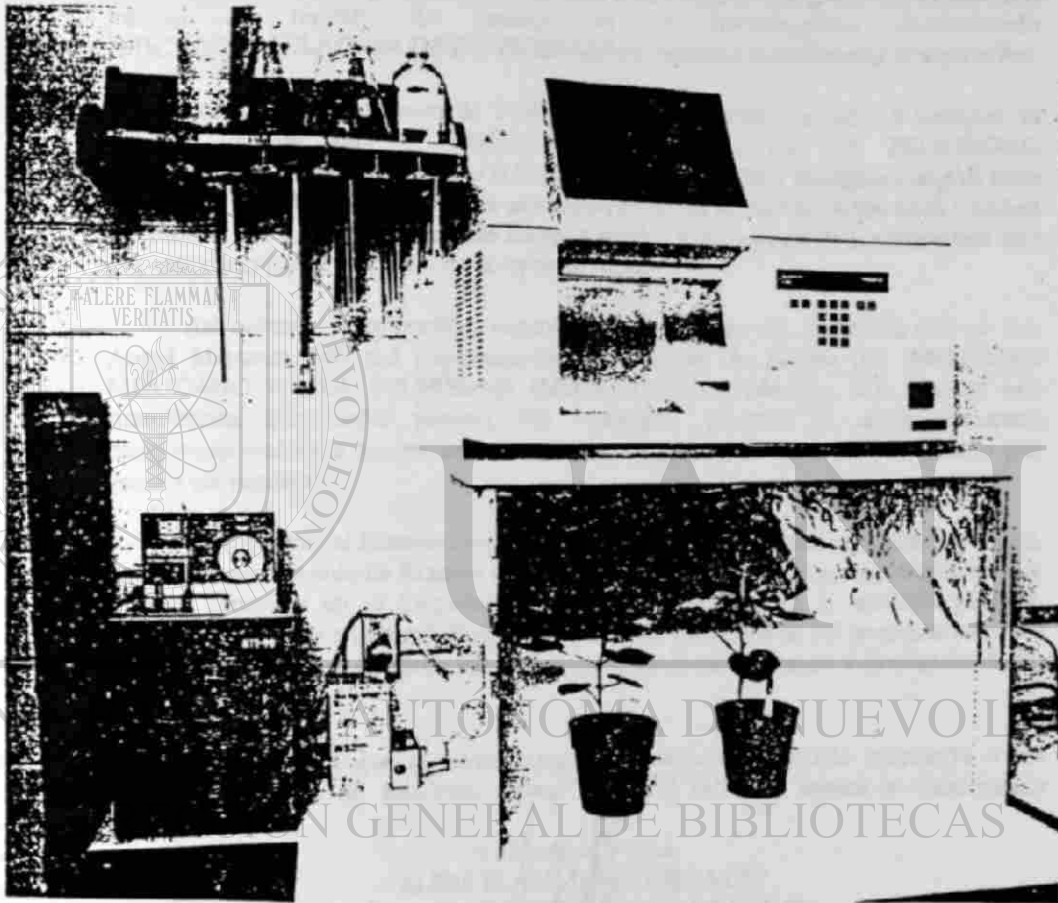


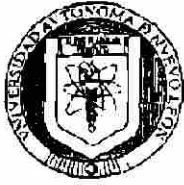
Fig. III-3-2



Fig. III-3-3







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DEPARTAMENTO JURIDICO

DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA
Presente.-

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

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

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

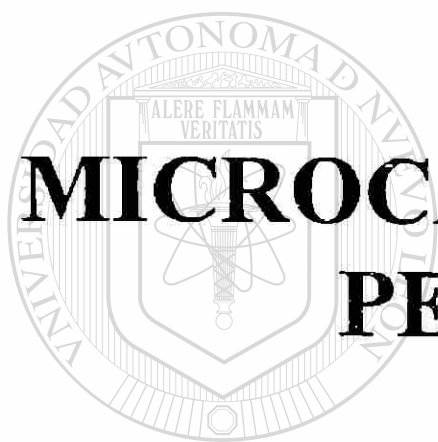
Con respecto al Examen de fondo, nos comunicamos con el Ing. Oscar Ochoa, Jefe del Departamento de Examen de Fondo en la capital del país, manifestándonos que ya contaban en su Departamento con la papelería de la aludida patente, comprometiéndose a que más tardar en el mes de Noviembre del presente año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

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

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

LIC. JESUS ALBERTO CERDA PEREZ.

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



MICROCAPSULACIÓN DE PESTICIDAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN [®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROPIETARIO DE LA INVENCION

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

INVENTORES

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

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

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

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

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

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

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

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

¹ centipoises.

* revoluciones por minuto

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

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

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

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

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

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

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

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

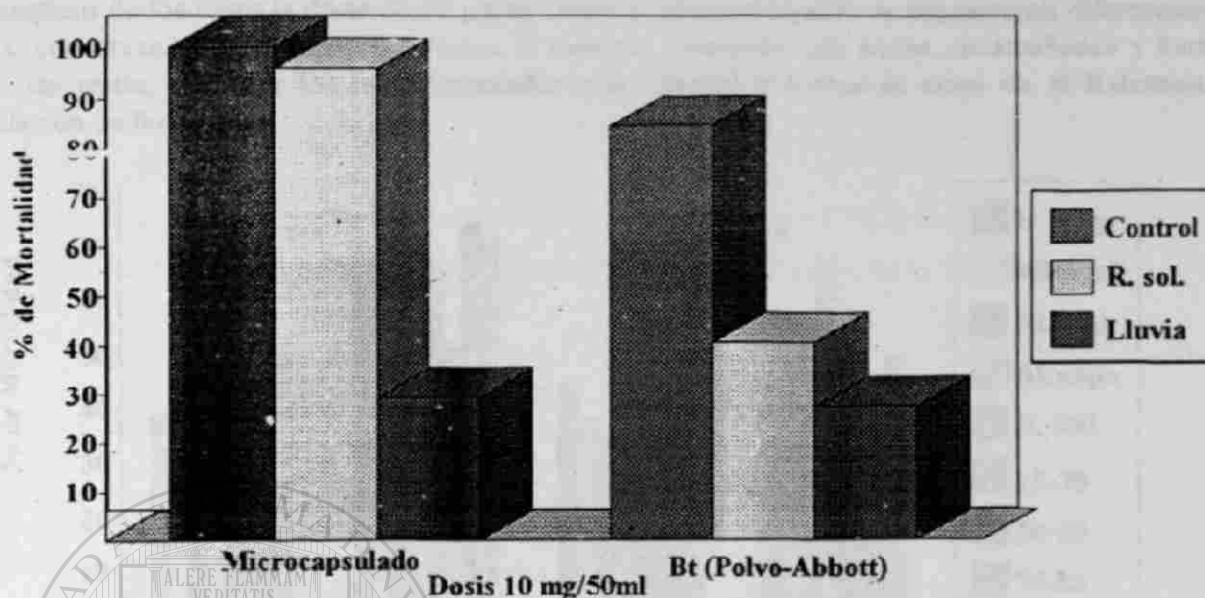


Fig. 1.- Protección del IA a factores ambientales al quedar microcapsulado

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

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

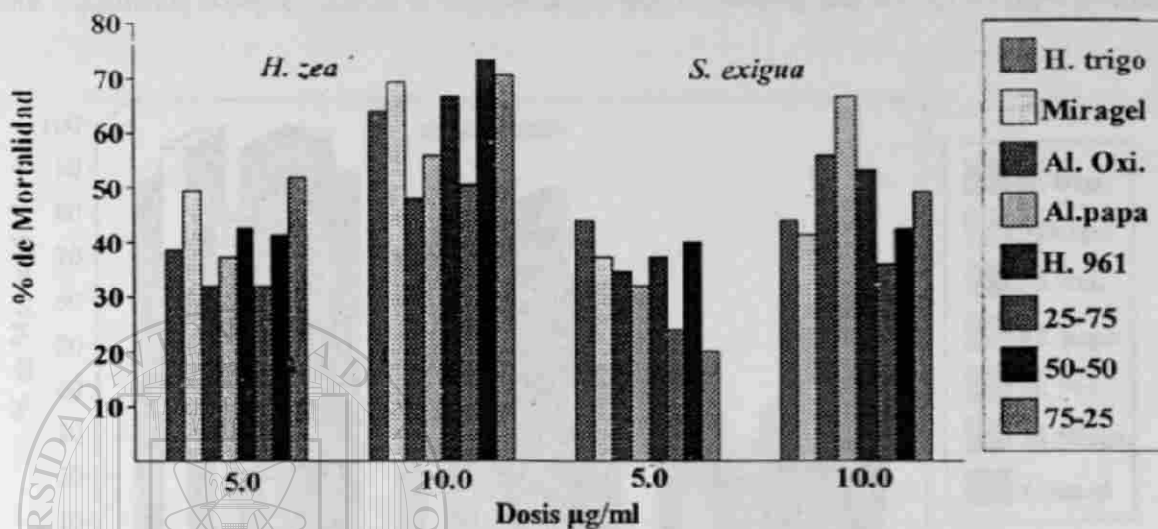


Fig. 2.- Actividad tóxica del microcapsulado procesado con diferentes materiales a insectos lepidópteros.

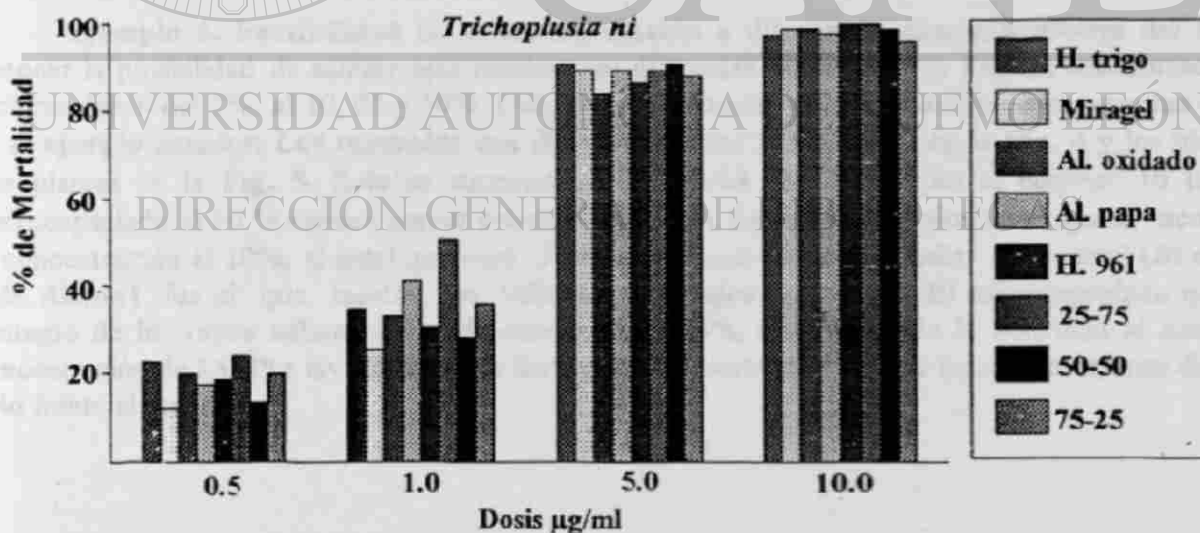


Fig. 2.- Actividad tóxica del microcapsulado procesado con diferentes materiales (cont.)

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

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

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

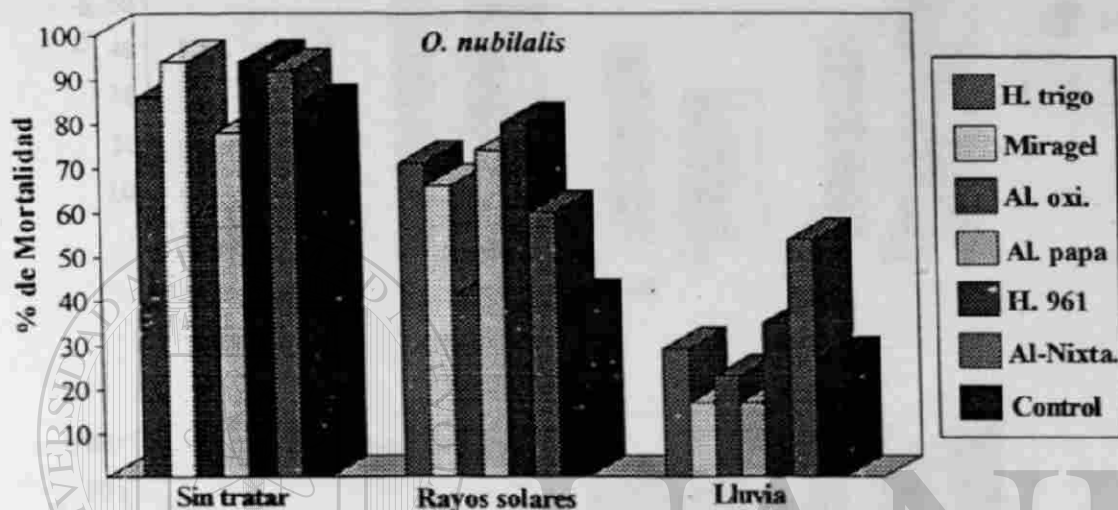


Fig. 3.- Toxicidad de capsulados procesados con diferentes materiales a gusano europeo

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

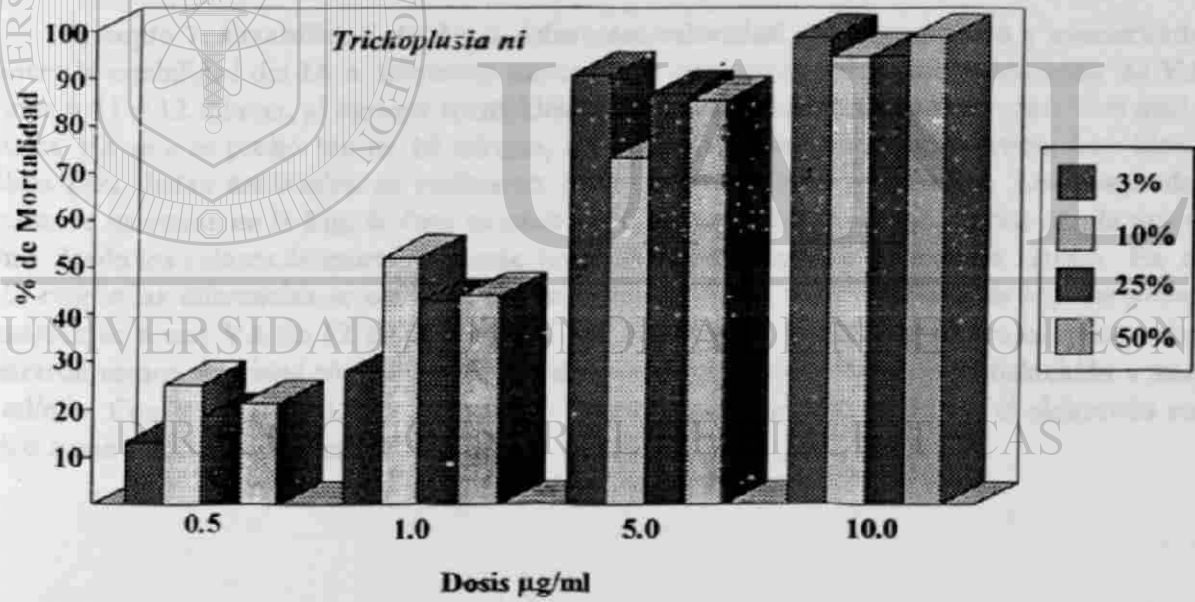
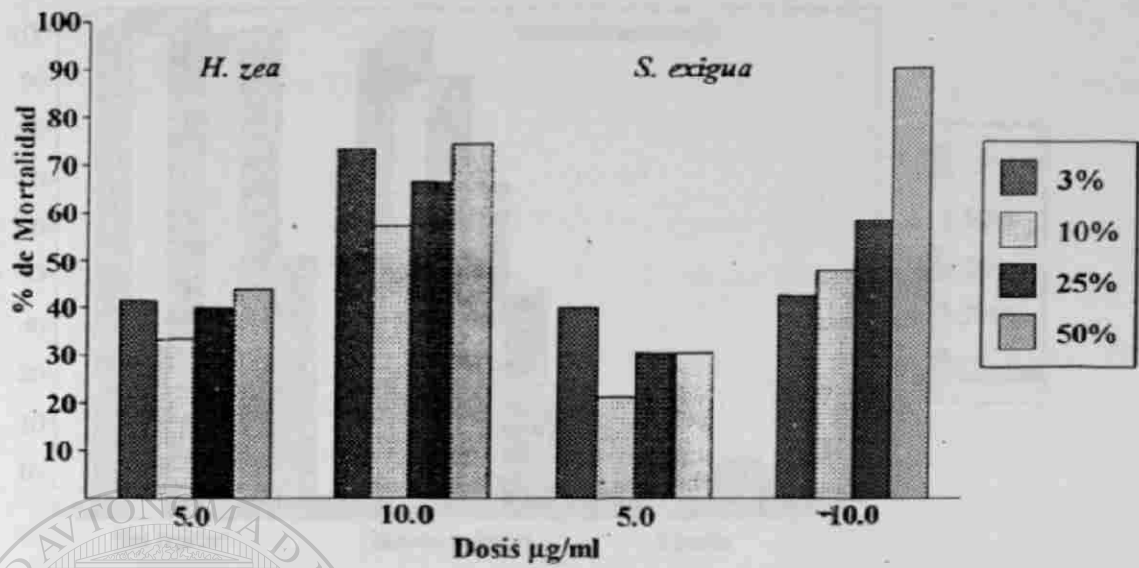


Fig. 4.- Actividad tóxica del microcapsulado a diferente proporción de IA

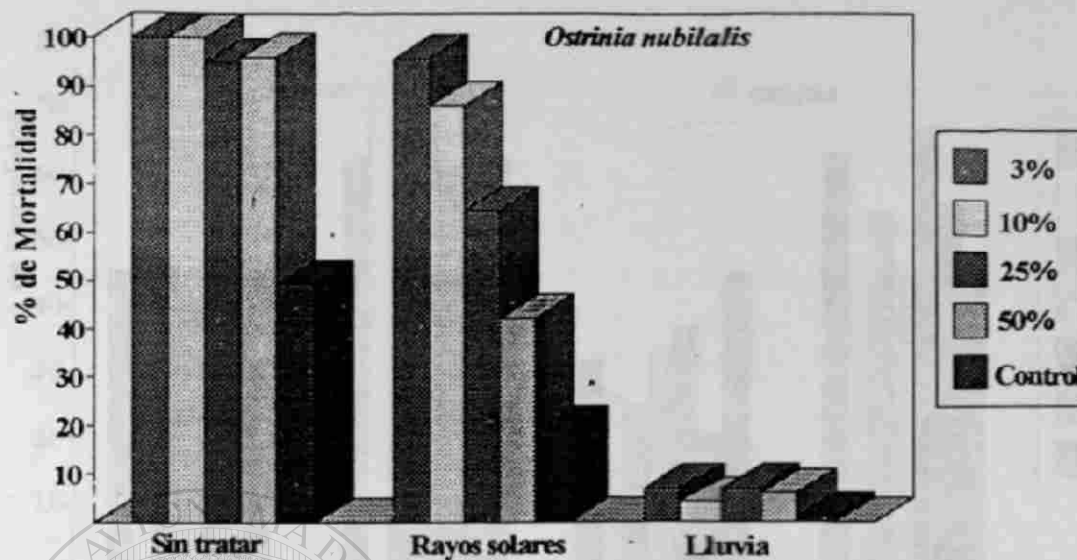


Fig. 5.- Actividad tóxica del microcapsulado a diferentes concentraciones de IA

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

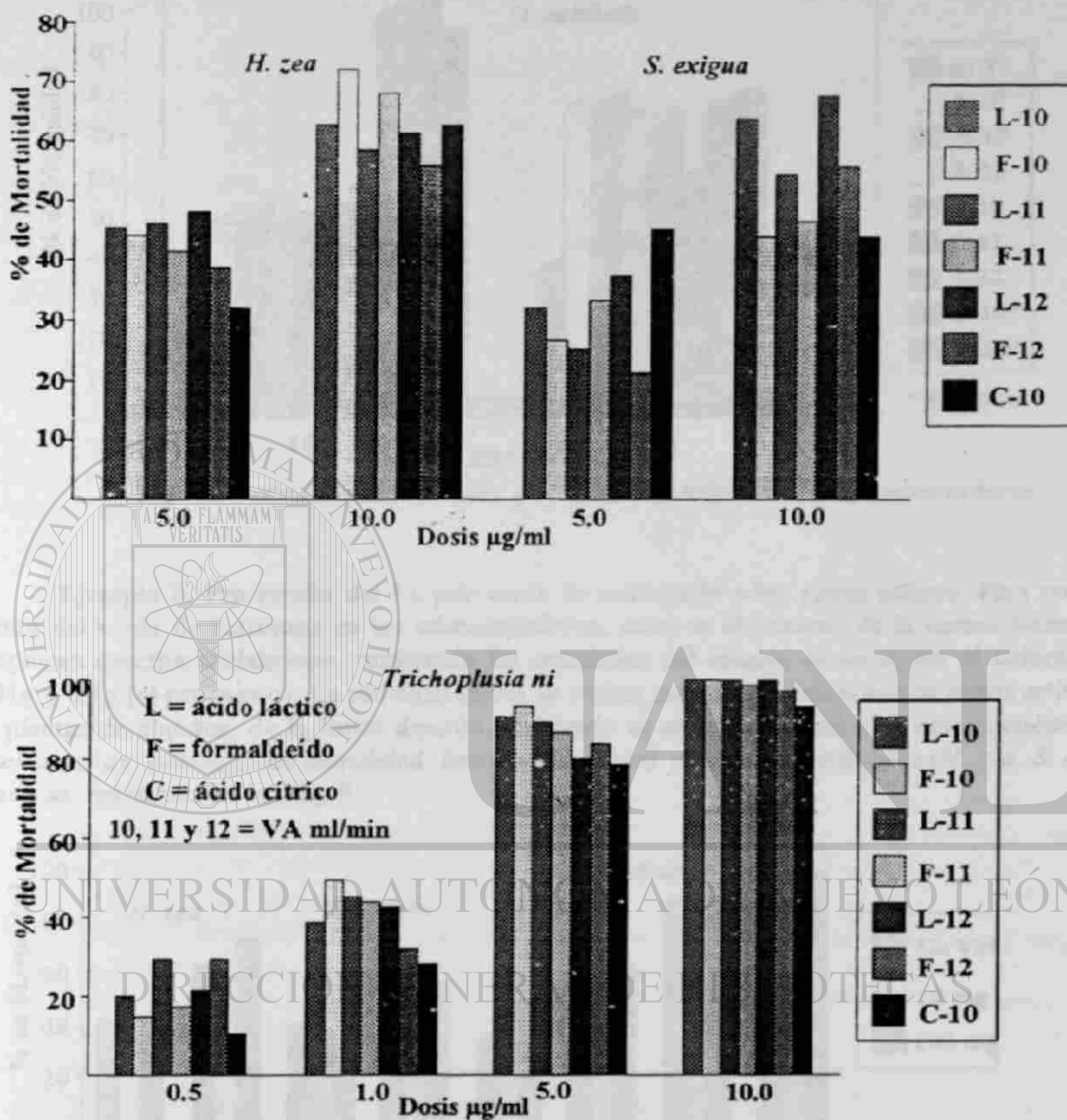


Fig. 6.- Toxicidad del capsulado procesado a diferentes VA, con varios conservadores

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

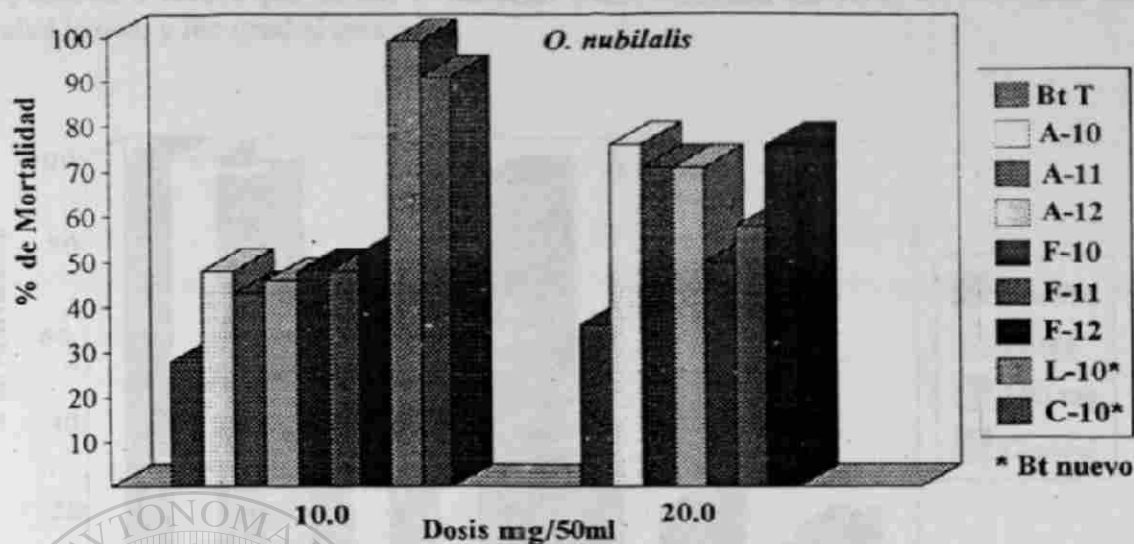


Fig. 7.- Toxicidad del capsulado procesado con diferentes VA y conservadores

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

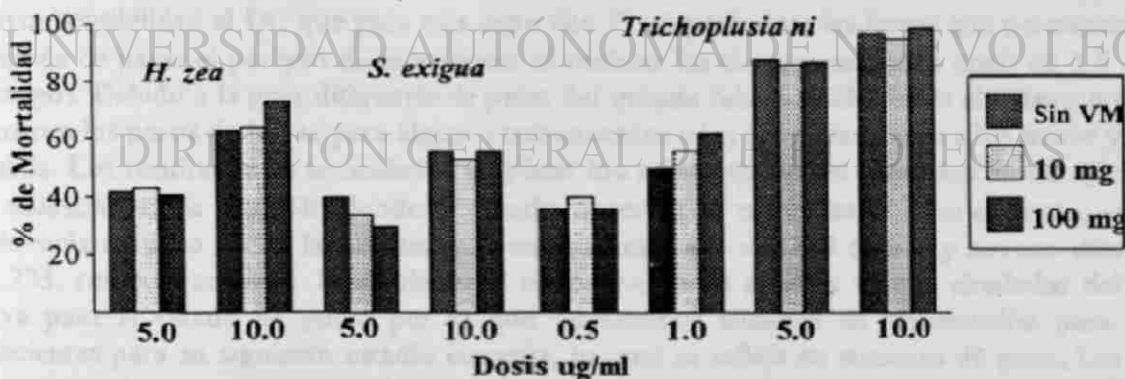


Fig. 8.- Toxicidad del capsulado a diferentes proporciones de IA

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

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

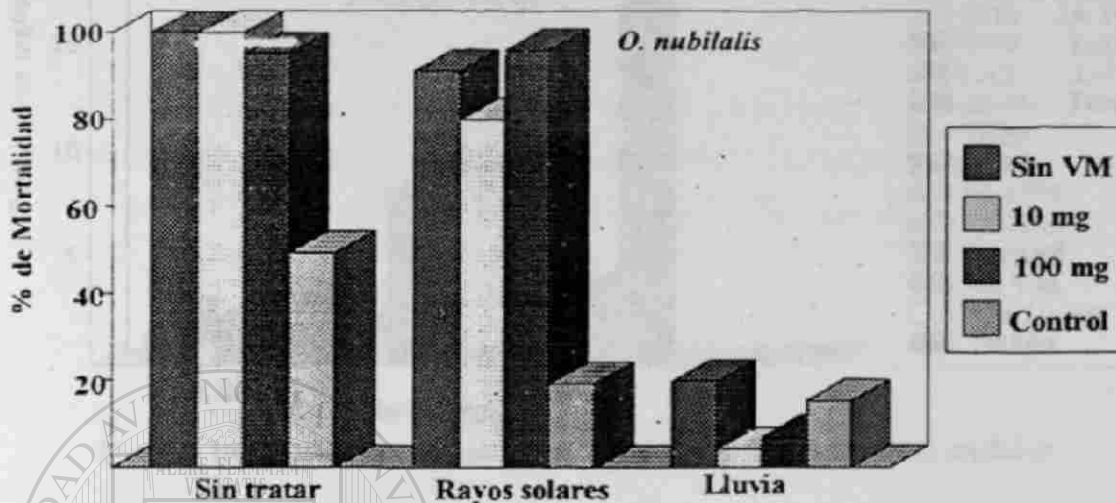


Fig. 9.- Protección del IA por verde de malaquita a factores ambientales

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

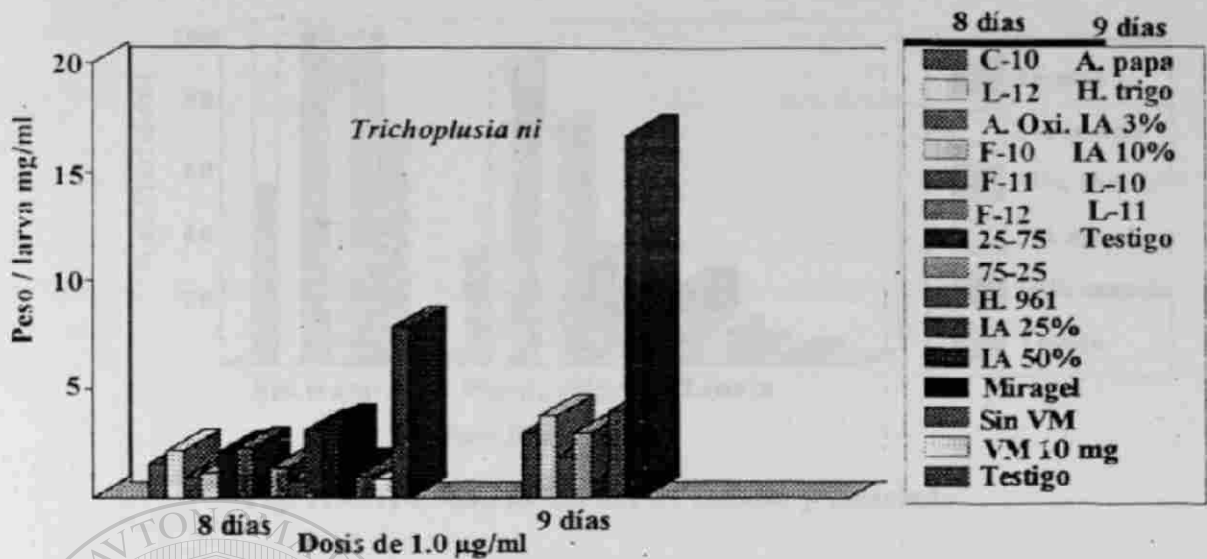


Fig. 10.- Dosis inhibitoria de microcapsulados contra gusano falso medidor

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

Formulación	Rayos Solares 8 h	Simulador de Lluvia 61 mm
Control	1.00	1.00
Algodón inoculado	1.07	1.11
Algodón de papa	1.44	1.80
Miragel	1.16	1.40
Secado por aspersión	1.40	1.40
Secado por aspersión 3.0 µg	1.40	1.40
Relación 75-25	1.40	1.40
Relación 7-21	1.30	1.40
IA 50% 10 µg/ml	1.61	1.40

* Agente de Insectos 1000



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

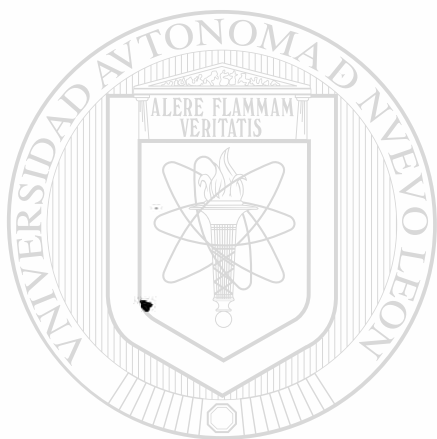
Ejemplo 11. Viabilidad de almacenamiento para su comercialización. Para tener una idea de la vida de anaquel del producto, a los microcapsulados obtenidos se les midió el porcentaje de humedad empleando un analizador de humedad Mark 2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. En estos resultados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

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

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

* Analizador de humedad Mark 2

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REIVINDICACIONES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMEN

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

REFERENCIAS

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

DISCUSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSIONES

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

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

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

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

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

LITERATURA CONSULTADA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

