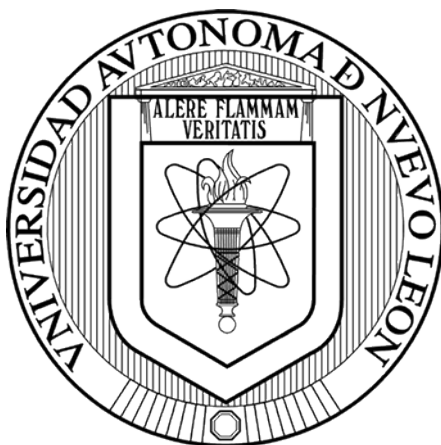


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PERSISTENCIA Y RECONSTITUCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS ALMACENADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* DESPUÉS
DE 40 AÑOS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Por

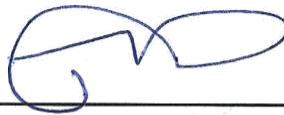
Q.B.P. DAVID DANIEL FERNÁNDEZ CHAPA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Enero, 2021

PERSISTENCIA Y RECONSTITUCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS ALMACENADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* DESPUÉS DE 40
AÑOS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*.

COMITÉ DE TESIS



Dr. Luis Jesús Galán Wong
Presidente



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Secretario



Dra. Verónica Almaguer Cantú
Vocal 1



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal 2



Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal



Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

PERSISTENCIA Y RECONSTITUCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS ALMACENADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* DESPUÉS
DE 40 AÑOS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*.

DIRECCIÓN DE TESIS



Dr. Luis Jesús Galán Wong
Director

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios por Brindarme la oportunidad de tomar este camino, así como cada logro obtenido. Muchas gracias al Dr. Galán Wong por darme su apoyo y abrirme sus puertas, así como también las valiosas enseñanzas y consejos tanto en lo académico, laboral y de vida. A la Dra. Graciela Diaz por su invaluable ayuda y por guiarme durante mi primer año de posgrado. A mi novia, la Dra. Claudia Plata, por ser mi principal soporte y compañía en cada momento, pero aún más por todo su amor. Un especial agradecimiento a mis padres, por ser mi principal motor en la vida, por su eterno e incondicional apoyo y amor en cada momento. Al Dr. Hugo Luna por aconsejarme y apoyarme en las dificultades, así como su valioso asesoramiento en mi proceso de formación académica. A mi amigo Luis Estrada por hacer más agradable y sobre llevadera mi estancia en el doctorado con su gran amistad y compañía.

DEDICATORIA

Dedico especialmente éste presente trabajo y tantos logros a mis padres por su gran apoyo y amor y a Dios por brindarme confianza, paz, fortaleza y sabiduría.

INDICE

| | |
|--|----|
| INDICE DE TABLAS | 6 |
| INDICE DE FIGURAS..... | 7 |
| LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS | 8 |
| RESUMEN..... | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 14 |
| 2.1 Control biológico..... | 14 |
| 2.2 Aspectos generales de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 14 |
| 2.2.1 Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> | 15 |
| 2.2.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry..... | 18 |
| 2.3 Aspectos generales del género <i>Aedes</i> | 20 |
| 2.3.1 Biología y ciclo del mosquito <i>Aedes aegypti</i> | 21 |
| 2.3.2 Distribución de <i>Aedes aegypti</i> | 26 |
| 2.3.3 <i>Aedes aegypti</i> como vector de enfermedades | 27 |
| 2.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> como control biológico. | 28 |
| 2.4.1 Sinergia de proteínas toxicas de <i>Bti</i> | 30 |
| 2.4.2 Resistencia a <i>Bti</i> | 31 |
| 2.5 Métodos y contribuciones de Howard T. Dulmage en <i>Bt</i> | 32 |
| 2.5.1 Extractos fermentados almacenados | 34 |
| 2.5.2 Colección de cepas HD de <i>Bti</i> | 35 |
| 2.6 Persistencia de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 36 |
| 3. JUSTIFICACION | 39 |
| 4. HIPOTESIS..... | 40 |
| 5. OBJETIVOS | 41 |
| Objetivo General | 41 |
| Objetivos específicos..... | 41 |
| 6. MATERIALES Y METODOS | 42 |
| 6.1 Clasificación y selección de cepas | 42 |
| 6.2 Aislamiento de cepas de bacilos a partir de muestras de suelo | 43 |

| | |
|---|----|
| 6.2.1 Muestras de tierra..... | 43 |
| 6.2.2 Aislamiento e identificación de nuevas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 43 |
| 6.3 Condiciones y mantenimiento de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> | 44 |
| 6.4 Reactivación de cepas a partir de extractos almacenados | 44 |
| 6.4.1 Recuperación y producción del complejo espora-cristal | 44 |
| 6.5. Preparación de tratamientos a base de <i>Bti</i> | 45 |
| 6.6 Bioensayos contra larvas del mosquito <i>Aedes Aegypti</i> | 46 |
| 6.6.1 Porcentaje (%) de pupas, adultos y toxicidad relativa | 47 |
| 6.6.2 Análisis de los datos | 48 |
| 6.7 Perfiles de proteínas | 48 |
| 7. RESULTADOS..... | 49 |
| 7.1 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Bacillus</i> spp esporuladas. | 49 |
| 7.2 Actividad Biológica de cepas aisladas contra <i>Aedes aegypti</i> | 49 |
| 7.3 Recuperación y producción del complejo espora-cristal de extractos almacenados | 50 |
| 7.4 Evaluación de la toxicidad de extractos HD de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra el mosquito <i>Aedes Aegypti</i> | 51 |
| 7.4.1 Tiempo de mortalidad de extractos HD de Bti contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> | 51 |
| 7.4.2 Porcentajes de mortalidad entre extractos de <i>Bti</i> reactivados y reconstituidos | 53 |
| 7.4.3 Determinación de la dosis letal media (DL50) aplicando el Método Estadístico Probit..... | 56 |
| 7.4.4 Actividad residual de extractos de <i>Bti</i> | 58 |
| 7.5 Perfiles de proteínas | 59 |
| 8. DISCUSIÓN | 60 |
| 9. CONCLUSIONES | 64 |
| 10. BIBLIOGRAFIA | 65 |
| 11. RESUMEN BIOGRÁFICO | 77 |

INDICE DE TABLAS

| N° | Título de tabla | Pagina |
|----|---|--------|
| 1 | Clasificación de toxinas Cry de acuerdo con la especificidad del insecto hospedero propuesto por Crickmore et al. (1998) | 16 |
| 2 | δ -endotoxinas de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Ben-Dov et al., 2014) | 31 |
| 3 | Factores ambientales que afectan la persistencia de <i>B. thuringiensis</i> en suelo | 36 |
| 4 | Extractos fermentados de <i>Bti</i> de la colección Dulmage por cepa, cantidad y año. Resguardados en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.) (Galán et al., 1998) | 42 |
| 5 | Concentraciones para el desarrollo de las soluciones madre y diluciones en serie | 46 |
| 6 | Determinación de la actividad toxica de las cepas aisladas contra <i>Aedes aegypti</i> . SP*: Sin presencia de microorganismos esporulados | 49 |
| 7 | Tiempo de mortalidad a distintas concentraciones de extractos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i> .; ** indica agua destilada. VA: Cepa de VectoBac recuperada; VC: Formulado de VectoBac comercial | 52 |
| 8 | Tiempo de Mortalidad en horas, de 25 larvas de <i>Aedes aegypti</i> por dosis. Se probaron cinco tratamientos diferentes * a partir de extractos reactivados de <i>Bti</i> | 53 |
| 9 | Toxicidad relativa de extractos reactivados e intervalos de confianza entre la LC ₅₀ y LC ₉₅ | 57 |
| 10 | Aspectos adicionales considerados después del tratamiento con extractos de <i>Bti</i> reactivados | 58 |

INDICE DE FIGURAS

| N° | Pie de figura | Pagina |
|----|---|--------|
| 1 | Actividad insecticida de las δ -endotoxinas Cry y Cyt contra los órdenes Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera e Hymenoptera | 17 |
| 2 | Mecanismo de acción de las proteínas Cry de acuerdo con el modelo de unión secuencial | 19 |
| 3 | Mecanismo de acción de las proteínas Cry de acuerdo con el modelo de vía de señalización | 20 |
| 4 | Fase larval del mosquito <i>Aedes aegypti</i> | 23 |
| 5 | Etapa de pupa del ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> | 24 |
| 6 | Composición del cuerpo de un mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto | 25 |
| 7 | Emergencia de mosquitos adultos mostrando sus 4 estadios de desarrollo | 26 |
| 8 | Esquema de trabajo con extractos HD de <i>Bti</i> almacenados | 47 |
| 9 | Cristales proteicos de extractos almacenados HD-500 de la colección Dulmage de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i> . Tinción Azul de Comassie. Objetivo: 100X | 50 |
| 10 | Visualización de endosporas del extracto 3260 reactivado de la colección Dulmage de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i> . Tinción Azul de Comassie. Objetivo: 100X | 51 |
| 11 | Toxicidad de los extractos de <i>Bti</i> almacenados a diferentes concentraciones contra <i>Aedes aegypti</i> | 54 |
| 12 | Porcentaje medio de mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> expuestas a diferentes concentraciones de extractos de <i>Bti</i> , bajo diferentes condiciones | 55 |
| 13 | Estimación de la LD ₅₀ y LD ₉₈ de los extractos almacenados 3501 y 3260 comparativamente con el control Vectobac | 56 |
| 14 | Gráfica comparativa entre los extractos HD almacenados y reactivados determinando la LC ₅₀ a diferentes concentraciones (ppm) | 57 |
| 15 | SDS-Page de perfiles proteicos de extractos almacenados (A) y reactivados (R) ® de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i> . Tinción con azul de comassie. M: Marcados de talla molecular (PageRuler®) | 59 |

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| aa | Aminoácidos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Bt | <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| Bti | <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> |
| °C | Grados centígrados |
| CL50 | Concentración letal media |
| Cry | Toxinas Crystal |
| Cyt | Toxinas Cytolíticas |
| g | Gramos |
| h | Hora |
| HD | Howard Dulmage |
| HCL | Ácido clorhídrico |
| kDa | Kilodalton |
| l | Litro |
| mg | Miligramos |
| Mg ²⁺ : | Magnesio |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| μl | Microlitros |
| ppm | Partes por millón |
| RNA | Ácido Ribonucleico |

| | |
|------|---------------------------------------|
| rpm | Revoluciones por minuto |
| UTI | Unidades internacionales de toxicidad |
| Vip | Proteínas insecticidas vegetativas |
| VA | Cepa de VectoBac recuperada |
| VC | Formulado de VectoBac comercial |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| Sip | Proteínas insecticidas secretadas |

RESUMEN

Bacillus thuringiensis serovar. *israelensis* (*Bti*) se utiliza cada vez más en todo el mundo para el control de mosquitos como una alternativa ambientalmente segura a los productos químicos. Su toxicidad hacia larvas de mosquitos se debe a un cristal compuesto, producido durante la esporulación que contiene cuatro toxinas principales: Cry (Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa) y Cyt (Cyt1Aa1). El mosquito *Aedes aegypti* representa una grave amenaza para la salud pública por su naturaleza hematófaga y capacidad vectorial, responsable de una alta morbilidad y mortalidad en millones de personas repartidas sobre la mayor parte del planeta. Actualmente, es difícil encontrar un bioinsecticida comercial que tenga una vida útil de más de dos años, y existe poca información sobre la viabilidad de estas proteínas comerciales en condiciones de almacenamiento prolongado. Este estudio tiene como objetivo determinar la persistencia y actividad biológica de los extractos de *Bti* después de más de tres décadas en almacenamiento, así como evaluar y comparar la toxicidad de sus endotoxinas reconstituidas contra larvas de *A. aegypti*. Se seleccionaron y reactivaron veinte extractos de fermentación almacenados HD-567 y HD-500, el complejo esporas-cristal fue obtenido y purificado por el método de coprecipitación lactosa-acetona. La actividad biológica de los extractos tanto almacenados como reconstituidos se evaluó de acuerdo con el protocolo de la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014. Todos los extractos almacenados probados presentaron toxicidad a la dosis más alta utilizada (1000 ppm) y los extractos 3260 y 3501 aún presentaron actividad larvicida en dosis tan bajas como 0.01 ppm. La cepa HD-500 recuperada del extracto 3260 fue el insecticida más eficaz (CL50 = 0,0014 mg / l) seguido de 3501 (CL50 = 0,0037 mg / l). Particularmente destacables estas cepas recuperadas que aumentaron su potencia larvicida 100 y 1000 veces respectivamente, siendo incluso más efectivas que la mayoría de los productos comerciales. Los perfiles de proteínas revelaron una menor presencia de toxinas sinérgicas Cyt en los extractos almacenados. Los datos obtenidos demuestran que cristales proteicos de *Bti* pueden prolongar su toxicidad durante la vida útil o en condiciones de campo bajo condiciones específicas.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis serovar. *israelensis* (*Bti*) is increasingly used worldwide for mosquito control as an environmentally safe alternative to chemicals. Its toxicity to mosquito larvae is due to a composite crystal produced during the sporulation and contains four major toxins Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa) and Cyt (Cyt1Aa1). The mosquito *Aedes aegypti* represent a serious threat to public health because of their hematophagous nature and vector capacity, responsible for high morbidity and mortality in millions of people spread over almost half of the planet. Nowadays, it is difficult to find a commercial biopesticide that has a shelf life of more than two years, and there is little information on the viability of this commercial proteins under prolonged storage conditions. This study aims to determine the persistence and biological activity of *Bti* extracts after more than three decades in storage, as well as to evaluate and compare the toxicity of their reconstituted endotoxins against *A. aegypti* larvae. Twenty stored fermentation extracts HD-567 and HD-500 were selected and reactivated, spore-crystal complex was obtained and purified by the lactose-acetone coprecipitation method. The biological activity of both stored and reconstituted extracts was evaluated according to the protocol of the Official Mexican Standard NOM-032-SSA2-2014. All tested stored extracts presented toxicity at the highest dose (1000 ppm) and extracts 3260 and 3501 still presented larvicidal activity at doses as low as 0.01 ppm. Recovered strain HD-500 from extract 3260 was the most effective insecticide (LC50 = 0.0014 mg/l) followed by 3501 (LC50 = 0.0037 mg/l). Particularly remarkable these recovered strains who increased their larvicide potency 100 and 1000-fold respectively, being even more powerful than most commercial products. Protein profiles revealed a lower presence of synergistic Cyt toxins in the stored extracts. This data indicate that *Bti* protein crystals can prolong their toxicity in shelf life or in field conditions under specific conditions.

1. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) es una bacteria formadora de esporas, ubicua, grampositiva. Durante su fase de esporulación, produce al menos cuatro proteínas cristalinas diferentes Cry (Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa) y Cyt (Cyt1Aa1) (Crickmore *et al.* 1998; Berry *et al.* 2002), que constituyen dos familias no relacionadas de delta-endotoxinas. Estas proteínas son particularmente tóxicas para dípteros, en particular diferentes especies de mosquitos, por ejemplo: *Aedes aegypti*, *Anopheles sp* y *Culex sp*, que son vectores de enfermedades humanas importantes, como la malaria, filariasis, dengue y fiebre amarilla, entre otras, causando millones de muertes cada año (Gad and Al-Dakhil, 2018). Desde su descubrimiento y descripción por Goldberg y Margalit (1977), *Bti* ha demostrado una eficacia notable en la eliminación de mosquitos, en contraste con su inocuidad para los humanos y otros mamíferos, vertebrados acuáticos, invertebrados y plantas. Debido a estas características, se han preparado formulaciones comerciales de estas bacterias para los programas de control de mosquitos (Watson y Kay 1998; Boyd y Kay 2000; Russell *et al.* 2003; Lacey 2007).

Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* son los larvicidas más utilizados en el mundo para el control de los mosquitos, debido principalmente a las combinaciones sinérgicas entre las toxinas específicas Cry y Cyt (Pérez *et al.* 2005; Cantón *et al.* 2011; Park *et al.* 2013). Como su actividad larvicida a menudo cambia rápidamente después de la aspersión, a menudo se dice que *B. thuringiensis* es de bajo nivel de persistencia en el campo (Sheeran y Fisher 1992; Lacey 2007). Cada una de estas toxinas específicas de *Bti* ha demostrado diferentes patrones de persistencia (Cry4> Cry11> Cyt) en el medio ambiente (Tetreau *et al.* 2012). Se sabe que los productos basados en moléculas naturales tienden a ser menos estables que los compuestos sintéticos, por lo tanto, no se conservan. La vida de los entomopatógenos es a menudo baja. Pocos estudios han evaluado la persistencia de la actividad tóxica de *Bacillus thuringiensis* en condiciones de almacenamiento prolongado, como los de Zafar *et al.* (2000) y Moustafa *et al.* (2018) donde no se encontró diferencia significativa en la toxicidad de extractos de *Bt* en almacenamiento después de 1 y 2 años respectivamente. La reconstitución y caracterización de las toxinas *Bti* nunca se ha evaluado después de

largos períodos en almacenamiento, ni así mismo, si retienen su capacidad genética y la misma actividad biológica después de su reactivación. La demanda de microorganismos entomopatógenos como remedio para insecticidas químicos está en aumento, pero a medida que el mercado mundial se expande, es necesario mejorar la eficiencia a largo plazo de los ingredientes activos para mejorar la vida útil de las formulaciones de *et i* con el fin de mejorar su rendimiento como estrategia para el manejo de plagas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Control biológico

El control biológico es un método para el control de plagas (insectos, ácaros, malezas, enfermedades de las plantas, etc.) que usa de manera directa o indirecta: depredadores, parásitos, herbívoros u otros medios naturales para controlar un organismo. Puede ser un componente importante del control integrado de plagas y es de gran importancia económica para la agricultura. Esto es una alternativa sustentable para reducir el impacto ecológico causado por las medidas tradicionales (Shea y Possingham 2000, Lacey *et al.* 2001). Las cepas del género *Bacillus* son utilizadas como agentes de control biológico por su introducción efectiva al agrosistema, induciendo sus mecanismos de control biológico sin riesgos a la bioseguridad mediante el desarrollo de bioplaguicidas, ya que el sustento científico de estos bioproductos sobre sus mecanismos de acción, implicaciones ecológicas, de bioseguridad y su formulación son determinantes para el desarrollo de una agricultura sustentable.

2.2 Aspectos generales de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria ubicua, grampositiva y en forma de bastón, que se ha aislado en todo el mundo de una gran diversidad de ecosistemas, incluidos el suelo, el agua, insectos muertos, polvo de los silos, hojas caídas de los árboles, las diversas coníferas y los mamíferos insectívoros (Hofte and Whiteley 1989; Knowles and Dow 1993; Roh *et al.* 2017), conocido por su capacidad de producir inclusiones cristalinas durante la esporulación que contienen proteínas insecticidas llamadas δ -endotoxinas (toxinas Cry). Las inclusiones cristalinas de *Bt* muestran una toxicidad bien documentada para una amplia variedad de plagas de insectos, como; lepidópteros, hemipteros coleópteros y dípteros (Estruch *et al.*, 1996), así como otras actividades biológicas como molusquicidas, nematocidas (parásitos humanos, animales, y de vida libre), acaricida e incluso contra células cancerosas humanas (Schnepf *et al.* 1998; Hofte and Whiteley 1989; Ohba *et al.*, 2009 Chougule and Bonning 2012; Van Frankenhuyzen 2013; Abd 2017)

El cristal de *B. thuringiensis* y las toxinas solubles secretadas son altamente específicas para sus huéspedes y han ganado importancia mundial como alternativa a los insecticidas químicos. Los bioinsecticidas a base de Bt se han aplicado al medio ambiente desde 1933 y comenzaron a usarse comercialmente en Francia en 1938 y en 1958 su uso se había extendido a los Estados Unidos. Las toxinas *Bt* han sido consideradas como el bioinsecticida más exitoso durante el siglo pasado. Actualmente, consta de más de 98 (424 millones de dólares) de pesticidas bacterianos pulverizables formulados (Lacey *et al.* 2015). Es el insecticida más amigable con el medio ambiente utilizado y es la base de más del 90% de los pesticidas disponibles en el mercado hoy (Cherif *et al.* 2007)

2.2.1 Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*

La principal diferencia entre *Bacillus thuringiensis* y otros bacilos estrechamente relacionados es la formación, durante el proceso de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de una naturaleza proteica adyacente a la espora. Algunos de estos cristales paraesporales conocidos como δ -endotoxinas (Cry y Cyt) confieren la capacidad patogénica contra las larvas de diferentes órdenes de insectos, principalmente lepidópteros, dípteros, coleópteros y, en algunos casos, contra especies de otros filos (Palma *et al.* 2014). Al sintetizar la inclusión cristalina parasporal durante la esporulación, la bacteria puede asegurar su supervivencia, ya que un insecto muerto puede proporcionar suficientes nutrientes que permiten que las esporas germinen (De Maagd 2001). Las cepas *B. thuringiensis* sintetizan las toxinas cristalinas (Cry) y citolíticas (Cyt) al inicio de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionaria como inclusiones cristalinas paraesporales. Además, los aislados de *Bt* también pueden sintetizar otras proteínas insecticidas durante la fase de crecimiento vegetativo; posteriormente se secretan en el medio de cultivo, las proteínas insecticidas vegetativas (Vip) (Estruch *et al.* 1996; Donovan *et al.* 2006) y las proteínas insecticidas secretadas (Sip).

A continuación, se muestra la nomenclatura utilizada por primera vez para los genes *cry* y posteriormente se explica la nomenclatura utilizada actualmente para los genes de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore *et al.* 1998) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de toxinas Cry de acuerdo con la especificidad del insecto hospedero propuesto por Crickmore et al. (Crickmore et al., 1998).

| Clases principales | Orden | Toxinas Cry |
|--------------------|----------------------------|--|
| Grupo 1 | Lepidoptera | Cry1, Cry9, and Cry15 |
| Grupo 2 | Lepidopteran and dipterous | Cry2 |
| Grupo 3 | Coleoptera | Cry3, Cry7, and Cry8 |
| Grupo 4 | Diptera | Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, and Cry20 |
| Grupo 5 | Lepidoptera and Coleoptera | Cry11 |
| Grupo 6 | Nematodes | Cry6 |

Sin embargo, esta nomenclatura no era ideal, ya que las nuevas toxinas tenían que ser probadas contra un número creciente de insectos para poder nombrar la toxina y el gen. Fue entonces cuando se creó el Comité de Nomenclatura de Toxinas de *Bacillus thuringiensis* en 1993 y propuso un nuevo sistema de clasificación (Crickmore *et al.* 1998) que consiste en dar a la nueva toxina un nombre de cuatro rangos dependiendo de su grado de identidad de aminoácidos por pares a las toxinas previamente nombradas, utilizando números arábigos para el primer y cuarto rango y letras mayúsculas y minúsculas para el segundo y tercer rango, respectivamente, por ejemplo; Vip1 y Vip2 si comparten menos del 45% de identidad por pares, Vip3A y Vip3C si comparten menos del 78% de identidad por pares, Vip3Aa y Vip3Ab si comparten menos del 95% de identidad por pares, y Vip3Aa1 y Vip3Aa2 si comparten más del 95% de identidad por pares (Palma *et al.* 2014) Según las secuencias de aminoácidos, hay 75 familias de proteínas Cry, con 800 genes *cry* diferentes (Sajid *et al.* 2018) mientras que las proteínas Cyt consisten en tres familias con 38 genes (Jouzani *et al.* 2017).

Se ha informado que las proteínas Cry son tóxicas para los lepidópteros, coleópteros, himenópteros, hemípteros, dípteros, ortópteros y mallophaga y también contra nematodos, ácaros y protozoos (Figura 1) (Ye *et al.* 2012). Algunas toxinas tienen un espectro de acción ampliado a dos o más órdenes o filos (Van Frankenhuyzen 2013). Por ejemplo, Cry1B es uno de los que presentan una actividad notable contra las larvas de lepidópteros, díptera y coleópteros. Entonces, la combinación de toxinas presentes en una cepa definirá

su espectro de acción (Roh *et al.* 2017). En contraste, las toxinas Cyt tienen actividad predominante contra los dípteros; sin embargo, tienen actividad tóxica contra algunos lepidópteros y coleópteros (Soberon *et al.* 2013) Además, algunas toxinas Cyt pueden establecer sinergia para la actividad insecticida con otras proteínas *Bt* como Cry o Vip3 y reducir los niveles de resistencia de las proteínas Cry hacia algunas especies de insectos de los órdenes Coleóptera y Díptera (Figura 1). La toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* es activo contra *Chrysomela scripta* y *Culex quinquefasciatus* y puede prevenir el desarrollo de resistencia a las proteínas Cry3Aa, Cry4 y Cry11Aa (Palma *et al.* 2014).

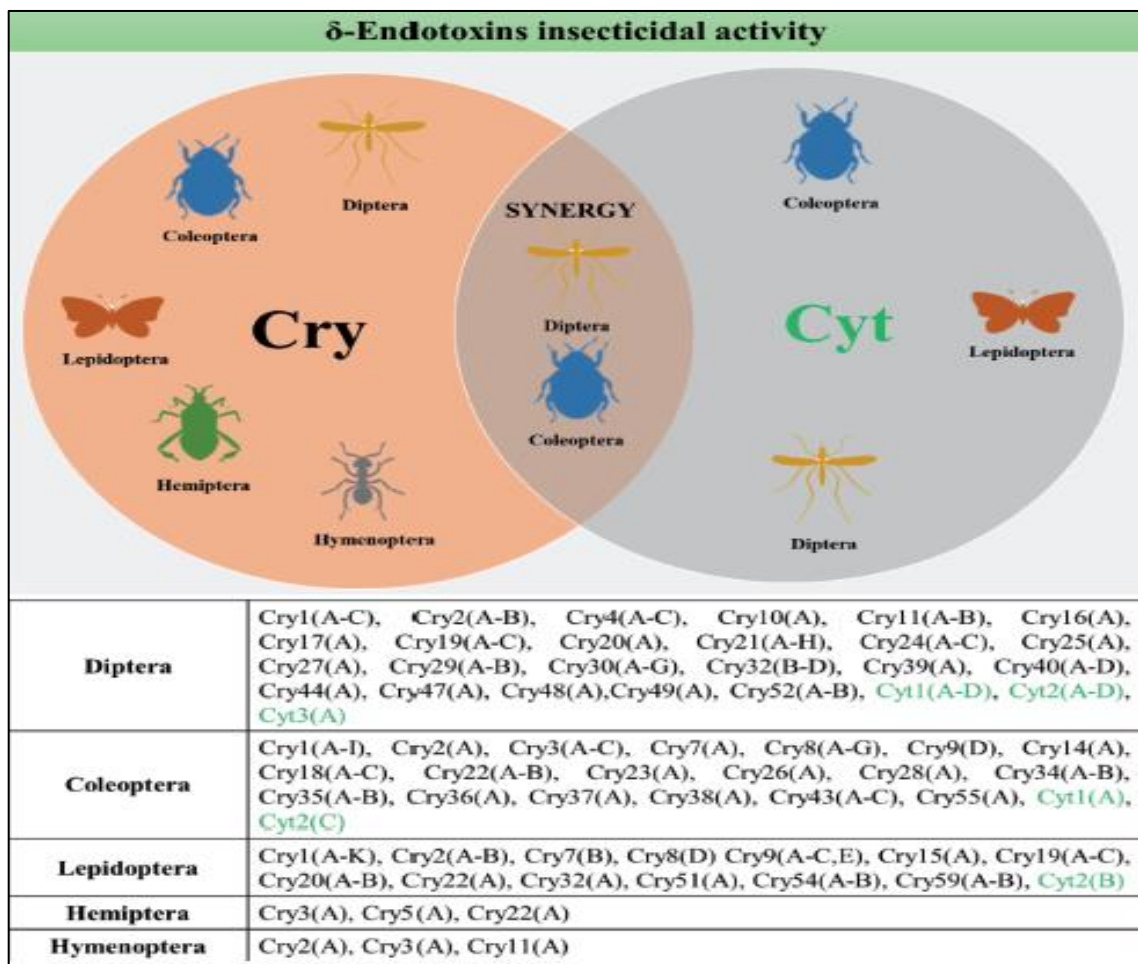


Figura 1. Actividad insecticida de las δ-endotoxinas Cry y Cyt contra los órdenes Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera e Hymenoptera.

2.2.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry

Aunque el mecanismo de acción de las toxinas Cry contra varios insectos ha sido ampliamente investigado, aún existen muchas controversias al respecto. Por lo tanto, actualmente hay diferentes modelos que la literatura que buscan explicarlo (Zhang *et al.* 2017). El modelo de unión secuencial se conoce como el mecanismo clásico. Se ha detallado en estudios con la proteína Cry1Ab en *Maduca sexta*. Esta postula que las propiedades tóxicas provienen de las inclusiones cristalinas producidas durante la esporulación de *Bt*. Los cristales y sus subunidades son protoxinas inertes y no son biológicamente activas. Su modo de acción se puede trazar de la siguiente manera: las δ -endotoxinas son ingeridas, los cristales se solubilizan por el pH alcalino del intestino, las protoxinas inactivas se digieren por proteasas del intestino medio que producen una toxina activa de aproximadamente 60 -70 kDa resistente a las proteasas, luego las toxinas Cry entran en contacto con los receptores de N-aminopeptidasa y cadherina en la superficie de la membrana. La afinidad entre las toxinas y ciertos tipos de receptores da como resultado la proteólisis de la proteína Cry que causa cambios estructurales en las cadenas y forma de oligómeros que funcionan como “pre-poros”. El receptor de N-aminopeptidasa ancla el pre-poro en la bicapa lipídica, la formación de poros afecta la integridad de la membrana y la evidencia electrofisiológica y la bioquímica sugieren que los poros causan un desequilibrio osmótico que causa la muerte celular y la lisis. El intestino se paraliza, el insecto deja de alimentarse, se presenta diarrea, p \acute{a} ralisis total y finalmente la muerte (Figura 2) (Land and Miljand 2014). El segundo mecanismo propuesto es llamado modelo de vía de señalización y tiene similitudes con el modelo anterior. Sin embargo, en esto se asignan otras causas de muerte celular. Según esta teor \acute{a} ya, las proteínas Cry afectan a la c \acute{e} lula de dos maneras: primero por la formación de poros en la membrana, como menciona el modelo de unión secuencial y, el segundo, por la producción de reacciones sucesivas que alteran el metabolismo celular. De acuerdo con esta hip \acute{o} tesis, las toxinas Cry se unen a los receptores de cadherina, que estimulan la prote \acute{i} na G heterotrim \acute{e} tica y la adenililciclase con un aumento en la producción de AMPc. El AMPc activa la prote \acute{i} na quinasa A, que estimula la apoptosis con una activación de los canales de Mg $^{2+}$ en la membrana plasmática. La apertura de estos canales provoca un movimiento anormal de los iones en el citosol, estimulando el proceso de apoptosis (Figura 3) (Knowles and Dow

1993; Adang *et al.* 2014). La germinación de las esporas también contribuye a la muerte del insecto, ya que las células vegetativas pueden replicarse dentro de la hemolinfa del huésped y causar septicemia. Sin embargo, las δ -endotoxinas por sí solas son suficientes para matar algunas especies de insectos si se producen en dosis altas. Esta característica ha sido explotada al expresar los genes de endotoxinas delta en bacterias que se adaptan mejor a un ambiente particular, así como su expresión en plantas genéticamente modificadas (Sanchis and Bourguet 2008; Raymond *et al.* 2010).

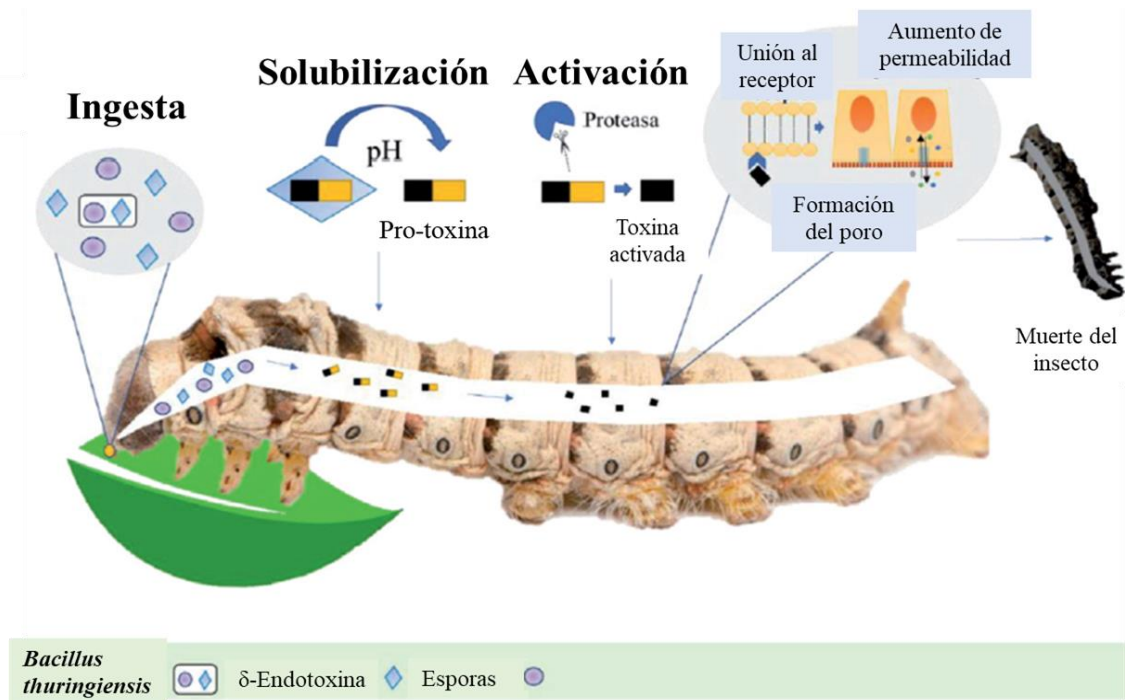


Figura 2. Mecanismo de acción de las proteínas Cry de acuerdo con el modelo de unión secuencial.

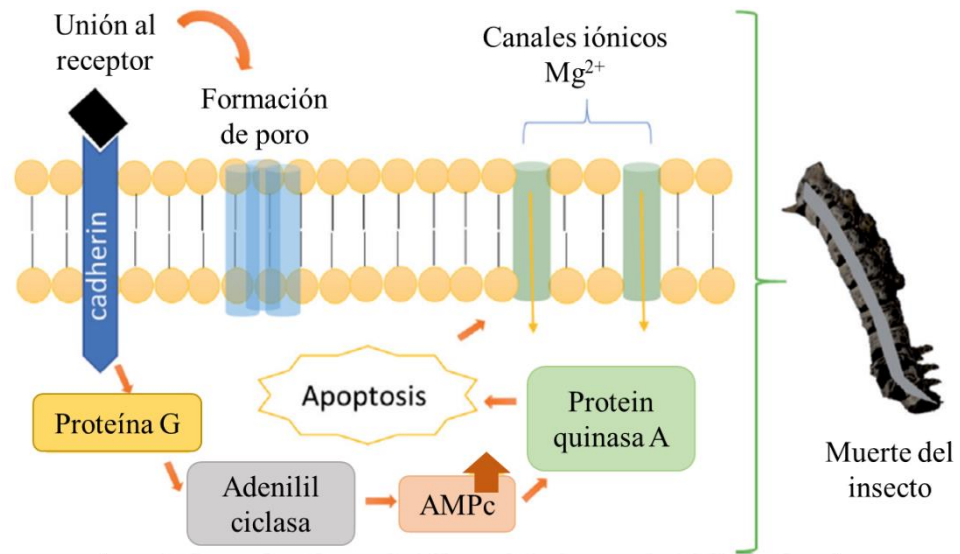


Figura 3. Mecanismo de acción de las proteínas Cry de acuerdo con el modelo de vía de señalización.

2.3 Aspectos generales del género *Aedes*

Los mosquitos son uno de los grupos más importantes de insectos, debido a su importancia para los humanos y los animales como vectores de algunas de las enfermedades más peligrosas. Son pequeños insectos de dos alas y se encuentran principalmente viviendo en los trópicos y subtropicales húmedos. Los investigadores indagan ampliamente sobre los mosquitos porque actúan como vectores de una variedad de patógenos y parásitos, incluidos virus, bacterias, protozoos y nematodos. Los mosquitos se colocan en la familia *Culicidae*, suborden Nematocera del orden Diptera (las moscas de dos alas o moscas verdaderas). La familia *Culicidae* contiene más de 3,200 especies y se divide en 3 subfamilias: *Anophelinae*, *Culicinae* y *Toxorhynchitinae*. Las culicinas son los principales vectores de arbovirus y filariasis. Los géneros médicamente más importantes en la subfamilia *Culicinae* son *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*, *Haemagogus* y *Sabethes* (Kettle, 1984).

El género *Aedes* se subdivide en varios subgéneros que comprenden más de 900 especies de mosquitos (orden Díptera), algunos de los cuales son graves molestias por morder y

son vectores de enfermedades que a veces transmiten patógenos potencialmente mortales a humanos y otros animales. Las diferentes especies de mosquitos *Aedes* son nativas de hábitats templados y tropicales en todo el mundo. Sin embargo, algunas especies se han extendido más allá de sus áreas de distribución nativas, ya sea como resultado de haber sido introducidas en nuevas áreas por humanos o como resultado de influencias ambientales cambiantes. De particular importancia ha sido la expansión a las Américas de *A. aegypti* de África y *A. albopictus* de Asia, lo que ha facilitado la propagación de ciertas enfermedades infecciosas debilitantes, especialmente la fiebre chikungunya, el dengue y la fiebre del Zika (Dickson *et al.* 2014).

Los mosquitos *Aedes* adultos se distinguen de otros tipos de mosquitos por su cuerpo estrecho y típicamente negro, patrones únicos de escamas claras y oscuras en el abdomen y el tórax, y bandas alternas claras y oscuras en las piernas. Las hembras se distinguen aún más por la forma del abdomen, que generalmente llega a un punto en su punta, y por sus palpos maxilares (estructuras sensoriales asociadas con las piezas bucales), que son más cortas que la trompa. Se alimentan durante el día, con actividad máxima al amanecer y al anochecer. Tienden a alimentarse agresivamente de humanos y de más de una persona. Aunque muchas especies parecen preferir alimentarse y reproducirse al aire libre, otras viven en estrecha asociación con los humanos y ponen sus huevos en el interior.

2.3.1 Biología y ciclo del mosquito *Aedes aegypti*

Los mosquitos *Aedes aegypti* son insectos de metamorfosis completa (holometabolía). Durante su desarrollo ontogénico pasan por los estados de huevo, larva, pupa y adulto.

Huevos

Huevos de *A. aegypti* son largos, lisos, de forma más o menos ovoide y de aproximadamente 1 mm de largo. Son de color blanco cuando están recién colocadas, pero se vuelven negras como resultado de la melanización aproximadamente dos horas después de la oviposición (este cambio de color no es exclusivo de las especies de mosquitos *Aedes*) (Nelson 1986; Service 2012). Las hembras de *Aedes* ponen huevos individuales en

colecciones artificiales de agua, a menudo colocadas a diferentes distancias de la línea de flotación. Además, una hembra preferiblemente no depositará el embrague completo en un solo sitio, sino que extenderá los huevos en dos o más sitios en una práctica conocida como "oviposición de omisión". Por lo tanto, los huevos tienen una mejor oportunidad de supervivencia (Mogi y Mokry 1980; Chadee 1997; Harrington y Edmann 2001; Foster y Walker 2002). Se observó que los huevos se pueden poner en sucesivas ocasiones en el mismo sitio (Gillet 1962) o en diferentes sitios (Fay y Perry 1965; Chadee y Corbet 1987). La práctica de la oviposición omitida indica la tendencia de una hembra a evitar la colocación en superficies que ya tienen sus propios huevos o los de los conespecíficos (Chadee, Corbet y Greenwood 1990). Los huevos son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa en 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido, pero puede prolongarse hasta cinco días con temperaturas más bajas. Eclosionan en un lapso de 2 a 3 días. Los huevos de *A. aegypti* pueden secarse, sobrevivir a la desecación, permanecer intactos durante varios meses y eclosionar cuando se sumergen con agua.

Larvas

Las larvas de *A. aegypti* se parecen a otras larvas de mosquito en su morfología; en general, tienen una cabeza ovoide, tórax y abdomen de nueve segmentos. El segmento posterior (anal) tiene cuatro branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón corto en forma de barril con un solo par de mechones subventrales para respirar en la superficie del agua (Figura 4) (Nelson 1986; Clements 2000; Service 2012). Las características morfológicas adicionales incluyen al menos tres pares de setas en el cepillo ventral, antenas que no están muy aplanadas y la falta de setas enormes en el tórax. Estas características son suficientes para distinguir las larvas de *Aedes* de la mayoría de las otras pertenecientes a la familia *Culicidae* y la subfamilia *Culicinae* (Service 2012).

La posición de descanso en la superficie del agua también es diferente entre las diversas especies de mosquitos: las larvas de *Aedes* cuelgan casi verticalmente (Figura 4). Las larvas pasan a través de cuatro estadios (I, II, III y IV respectivamente) con crecimiento y cambios en la forma y el tamaño que ocurren durante su desarrollo. El primer estadio la larva de *A. aegypti* tiene solo 1 mm de longitud, mientras que en la etapa del cuarto estadio

alcanza una longitud de aproximadamente 8 mm (Schaper y Hernández-Chavarria 2006; Bar y Andrew 2013a). El crecimiento y desarrollo de los estadios larvarios depende de la temperatura, sin embargo, las interacciones complejas con otros factores como la disponibilidad de recursos y la densidad intraespecífica también contribuyen a la variación en la tasa de desarrollo (Couret y Benedict 2014).



Figura 4. Fase larval del mosquito *Aedes aegypti*.

Las características más distintivas que facilitan la diferenciación de las larvas de *A. aegypti* de muchas otras especies del género *Aedes* son las 2 espinas laterales a cada lado del tórax y la fila recta de 7 a 12 escamas en peine en el octavo segmento abdominal. *A. aegypti* exhibe una columna medial con espinas gruesas y subapicales que están ausentes en *A. albopictus* (Nelson, 1986).

A temperaturas ambientales frías (alrededor de 15 ° C), las larvas de *A. aegypti* pueden permanecer en un estadio particular durante meses, siempre que el suministro de agua sea suficiente (Foster y Walker 2002; Bar y Andrew 2013a; Brady *et al.* 2013). Son fotosensibles (sensibles a la luz), desplazándose hacia el fondo del recipiente, aun cuando son perturbados. La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimentos y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, con temperaturas de 25 a 29°C, el período desde la eclosión hasta la pupación puede ser de 5 a 7 días, pero comúnmente dura de 7 a 14 días.

Pupas (dimorfismo sexual)

La pupa es la etapa del ciclo de vida de los mosquitos que sigue al último estadio larval y precede a la etapa adulta. Las pupas tienen forma de coma, se componen de dos secciones principales, cefalotórax (cabeza y tórax fusionados) y abdomen (Nelson 1986; Service 2012). En la base del cefalotórax de la pupa hay un par de tubos de respiración o "trompetas" que perforan la superficie del agua para permitir la respiración (Nelson 1986). En la punta del abdomen hay un par de remos o paletas para nadar, que en la hembra (Figura 5) son más anchas y superpuestas, pero en el macho son estrechas y separadas (Vargas, 1968). Otra diferencia morfológica entre las pupas femeninas y masculinas es su tamaño general, siendo la hembra generalmente más grande que el macho. Dado que el rango de tamaño corporal entre las pupas femeninas y masculinas se superpone considerablemente y puede verse afectado por bióticos y abióticos, incluidos factores ambientales como la dieta, la temperatura, las condiciones de crianza, el hacinamiento, se considera necesario seleccionar características sexuales dimorfas adicionales como diferencias en las paletas para determinar el sexo de las pupas (Vargas, 1968).

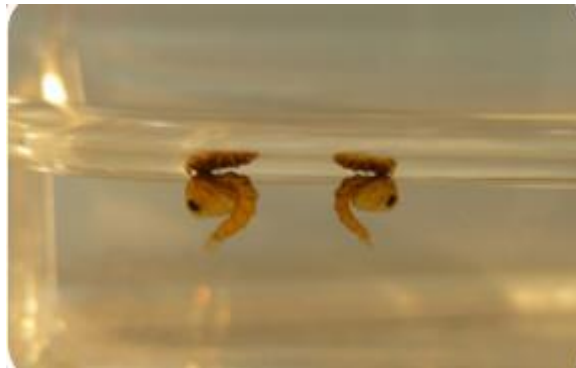


Figura 5. Etapa de pupa del ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

El período pupal dura de 1 a 3 días en condiciones favorables, con temperaturas entre 28 y 32°C. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período.

Adultos

El cuerpo de un mosquito adulto de *A. aegypti* está compuesto de cabeza, tórax y abdomen (Figura 6). Los machos y las hembras *A. aegypti* son similares en apariencia, excepto por

las diferencias en tamaño y forma de las antenas (los machos tienen antenas plumosas), palpos maxilares (las hembras tienen palpos más cortos), abdomen, garras y marcas de escala (Bar y Andrew 2013b). Estas diferencias se describen en detalle a continuación.

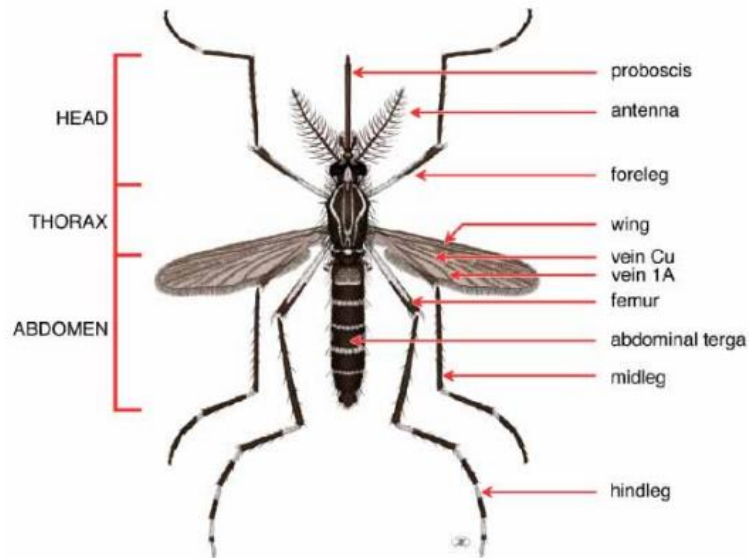


Figura 6. Composición del cuerpo de un mosquito *Aedes aegypti* adulto

Al emerger de la pupa, el insecto adulto permanece en reposo permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y las alas. Dentro de las 24 hrs siguientes a la emergencia pueden aparearse iniciándose la etapa reproductora del insecto.

Las hembras también se alimentan de jugos de plantas. Generalmente, después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de huevos, pero si el mosquito es perturbado antes de estar completamente lleno de sangre puede alimentarse con sangre más de una vez entre cada postura. Si una hembra completa su alimentación (2 o 3 ml de sangre) desarrollará y pondrá aproximadamente 200 huevos, dispersos en distintos lugares. La hembra tiende a depositar sus huevos en varios lugares y no en un solo lugar. Hay un umbral de distensión del estómago que estimula el desarrollo de los ovarios, por eso el período entre alimentación sanguínea y postura es de 3 días en condiciones óptimas de temperatura; la hembra puede alimentarse de sangre nuevamente el mismo día que pone el huevo.

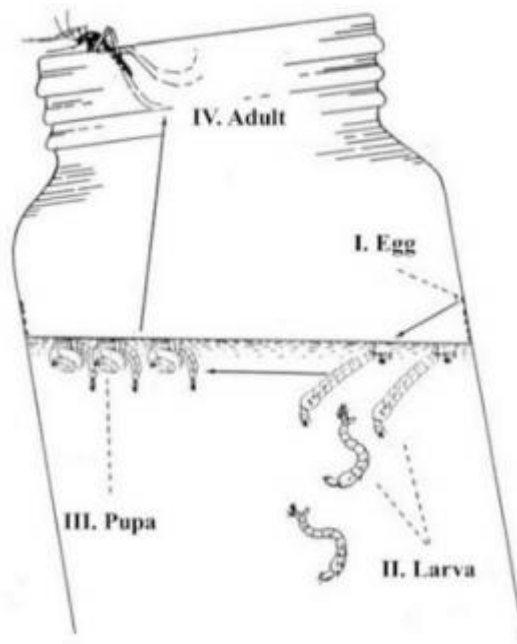


Figura 7. Emergencia de mosquitos adultos mostrando sus 4 estadios de desarrollo.

La distribución de los huevos en varios recipientes asegura la viabilidad de la especie. La posición de los huevos a pocos mm de la superficie del agua permite que éstos maduren, y en la próxima lluvia, al subir el nivel de agua del recipiente, los huevos eclosionan en el momento de contacto con el líquido (Harrington y Edmann 2001).

2.3.2 Distribución de *Aedes aegypti*

El origen probable de *A. aegypti* es la región etíope del cinturón tropical en África, desde donde se ha extendido a regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo en asociación con humanos (Nelson, 1986; Powell y Tabachnick, 2013). *A. aegypti* probablemente fue llevado a otros continentes a través de barcos comerciales y de transporte que se abastecían en puertos africanos durante el siglo XV hasta el final del XVII (Christophers, 1960; Reiter, 1998). Estos barcos llevaban depósitos de agua dulce a bordo y podían mantener colonias reproductoras de *A. aegypti* (Christophers, 1960), por lo que es probable que la especie se haya introducido al resto del mundo por este medio (Tabachnick, 1991). Hasta la fecha, *A. aegypti* es una especie tropical invasiva en todo el

mundo con un hábitat cosmopolita de 40 ° N a 40 ° S de latitud (un rango que se extiende por todo o la mayor parte del mundo en hábitats apropiados). *A. aegypti* suele ser tolerante a temperaturas que oscilan entre 14 ° C y 30 ° C (Hemme *et al.*, 2010; Brady *et al.*, 2013, 2014). En condiciones óptimas de temperatura y humedad, el embrión necesita dos o tres días para el desarrollo completo desde la oviposición hasta la siguiente etapa del ciclo de vida. La definición de parámetros fisiológicos embrionarios dentro de este rango de temperatura se correlaciona con la presencia de *A. aegypti* en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Farnesi *et al.* 2009). Desarrollo larvario en *A. aegypti* es una función de la temperatura, y estos efectos han sido bien estudiados. La temperatura también afecta el tamaño del adulto, el peso seco y el número de ovarios, todos los cuales disminuyen a medida que aumenta la temperatura (Christophers 1960; Rueda *et al.* 1990). Es poco probable que las altas temperaturas extremas (> 40°C) limiten la especie, pero las bajas temperaturas son un factor limitante. Por debajo de 15°C, mosquitos adultos de *A. aegypti* se vuelven tórpidos, incapaces de volar y pueden mover sus extremidades lentamente (Christophers 1960; Rowley y Graham 1968; Yang *et al.* 2009). Las temperaturas más bajas pueden retrasar el desarrollo a tal grado (donde los ciclos de huevo a adulto son más largos que 45 días) que se impide que la especie se establezca en el medio ambiente, aunque las habitaciones humanas pueden brindar alguna protección estacional. La cantidad y frecuencia de la lluvia (nivel de precipitación) es otro factor que, combinado con la temperatura, afecta el establecimiento sostenible de la especie en un área determinada. Las colecciones históricas mundiales y los experimentos de laboratorio en este vector bien estudiado han sugerido que su distribución está limitada por la isoterma de invierno de 10°C (Christophers 1960), mientras que un análisis del modelo de dinámica de población estocástica más reciente y complejo sugiere que el valor límite de la temperatura sea mayor hacia la isoterma anual de 15°C (Otero, Solari y Schweigmann 2006).

2.3.3 *Aedes aegypti* como vector de enfermedades

La competencia del vector (VC) se define como la permisividad intrínseca de un vector de artrópodos para la infección, diseminación y transmisión de un patógeno (Black *et al.*

2002; Dickson *et al.* 2014). La competencia total de un vector está determinada no solo por su capacidad de infectarse, sino también por su capacidad de transmitir un patógeno. La competencia del vector en *A. aegypti* es un elemento de importancia primordial para tener en cuenta debido al impacto en la salud pública de este mosquito como principal transmisor potencial de virus del dengue, fiebre amarilla, zika y chikungunya. Solo de dengue se reportaron más de 120,000 casos en el año 2018 (OMS, 2018) y más de 324,000 casos de Chikungunya hasta enero del 2017 (OMS 2016). En algunas áreas restringidas, *A. aegypti* también es un vector de *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*, que causan filariasis o elefantiasis linfática (Service 2012; Powell y Tabachnick 2013). *A. aegypti* se infecta con una enfermedad viral, por ejemplo; el dengue, cuando el mosquito pica y adquiere una comida de sangre de un humano infectado con el virus del dengue (DENV), el principal huésped del virus. La infección por mosquitos depende de factores como la virulencia del DENV, las barreras físicas y la inmunidad innata que pueden conferir resistencia o susceptibilidad. Las relaciones entre DENV y su vector artrópodo *A. aegypti* son cruciales, y un análisis de las respuestas de las células huésped a la infección por flavivirus de los vectores de mosquitos es muy importante para comprender el mantenimiento y la transmisión de la enfermedad. Las poblaciones de mosquitos difieren en su susceptibilidad al desarrollo de flavivirus, lo que refleja las diferentes barreras encontradas por el virus desde su entrada en el mosquito hasta su liberación en la saliva. Factores como los receptores específicos de células epiteliales de mosquito, así como la replicación viral diferencial en el mosquito, son críticos, al igual que otros genes exhibidos por estudios de loci de rasgos cuantitativos (QTL) (Gomez-Machorro, Bennett y Muñoz 2004).

2.4 *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* como control biológico.

Se sabe que varias especies de mosquitos son vectores importantes de enfermedades (Boisvert 2007). Los mosquitos también pueden ser una molestia, así como una plaga para humanos y animales. En consecuencia, se han hecho muchos intentos para controlar la abundancia de mosquitos utilizando diversos métodos. En 1976, se aisló por primera vez la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* (Bti) y resultó ser tóxica para las larvas

de mosquito (Goldberg y Margalit 1977), y desde principios de la década de 1980, los insecticidas a base de *Bti* han estado disponibles comercialmente (Boisvert 2007). En 2011, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Serotype H-14, Cepa AM65-52, se incluyó en el Anexo I de la directiva de la UE 98/8 / EC sobre la comercialización de biocidas.

B. thuringiensis var *israelensis* generalmente se considera un insecticida eficaz y específico para el objetivo. La especificidad ha sido explicada por el modo de acción de *Bti*, que generalmente se acepta como un proceso de varias etapas (Ramírez-Lepe y Ramírez-Suero 2012). Las propiedades tóxicas de *Bti* se originan en inclusiones cristalinas producidas durante la esporulación. Los cristales y sus subunidades son protoxinas inertes y no son biológicamente activas. Sin embargo, se activan cuando son ingeridas por las larvas de mosquito, y el modo de acción se puede describir de la siguiente manera: (i) ingestión de proteína Cry por las larvas; (ii) solubilización de los cristales en el intestino medio alcalino (pH > 10); (iii) activación proteolítica de la proteína insecticida solubilizada; (iv) la toxina se une a los receptores ubicados en las membranas celulares del intestino medio; (v) un cambio en la conformación de la toxina permite la inserción de la toxina en la membrana; (vi) la evidencia electrofisiológica y bioquímica, sugiere que las toxinas generan poros en la membrana celular, lo que altera el equilibrio osmótico y hace que las células se hinchen y lisen; (vii) el intestino se paraliza y el insecto deja de alimentarse. La mayoría de las larvas de mosquito mueren a las pocas horas de la ingestión. *Bti* no tiene ningún efecto sobre los huevos de mosquito, las pupas o los adultos. Los productos basados en *Bti* se han utilizado en más de 25 países en todos los continentes (Boisvert 2007).

La eficacia del tratamiento con *Bti* en organismos diana se ha estudiado a fondo y se ha demostrado que es muy alta. Los efectos directos sobre especies no objetivo se han estudiado ampliamente, y el grupo no objetivo más grande susceptible a *Bti* son las quironómidas. Debido a su modo de acción, *Bti* se considera seguro para peces, aves y mamíferos, incluidos ganado y mascotas.

2.4.1 Sinergia de proteínas tóxicas de *Bti*

Durante la esporulación, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) produce diferentes tipos de toxinas insecticidas como las toxinas Cry y Cyt que se han utilizado comercialmente en todo el mundo para controlar diferentes plagas de insectos (James 2015). Estas endotoxinas se han caracterizado como toxinas formadoras de poros (PFT) (Parker y Feil 2005; Ben-Dov, 2014). A diferencia de la estructura de las toxinas Cry, la proteína citolítica Cyt1A es de un único dominio a / b que comprende dos capas externas de horquillas α -hélice envueltas alrededor de una lámina b (Cohen *et al.* 2011). No requiere receptores específicos en las células del intestino medio diana. De hecho, interactúan directamente con los lípidos de membrana no saturados, entran y luego forman poros (Promdonkoy y Ellar 2000, 2005).

Las altas propiedades larvicidas y específicas de las δ -endotoxinas de *Bti* contra mosquitos, se atribuyen a interacciones complejas entre seis proteínas, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba, que difieren en los niveles de toxicidad contra diferentes especies de mosquitos (Tabla 2) (Delecluse *et al.* 1988; Crickmore *et al.* 1995; Wirth *et al.* 2005; Otieno *et al.* 2008). La toxicidad de cada una de las cuatro proteínas Cry es mayor que las de Cyt, pero la alta actividad de todo el cristal produce sinergias entre ellos (Delecluse *et al.* 1988; Wirth *et al.* 2005; Wirth *et al.* 2009). Las combinaciones de Cry4Aa y Cry4Ba, de Cry4Aa y Cry11Aa, o de las tres Cry's, son sinérgicas contra las larvas de *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* (Ben-Dov *et al.* 1995; Crickmore *et al.* 1995; Otieno *et al.* 2008), mientras que Cry4Ba y Cry11Aa son sinérgicos contra *Ae. aegypti* (Crickmore *et al.* 1995). Dos toxinas cristalinas menores, Cry10Aa y Cyt2Ba contribuyen a la actividad insecticida de *Bti* mediante interacciones sinérgicas: Cry11Aa con Cyt1Aa contra *Ae. Aegypti* al actuar como un receptor funcional para Cry11Aa proporcionando una formación eficiente de estructura oligomérica pre-poro (Pérez *et al.*, 2005, 2007), con Cry4Ba contra *Cx. Pipiens* (Delecluse *et al.*, 1988) y Cyt2Ba con Cry4Aa contra *Ae. Aegypti* (Manasherob *et al.* 2006). A pesar de las bajas toxicidades de Cyt1Aa y de Cyt2Aa de *Bt kyushuensis* contra las larvas expuestas, son altamente sinérgicas con las toxinas Cry de *Bti* y sus combinaciones (Crickmore *et al.* 1995; Khasdan *et al.* 2001; Wirth *et al.* 2005).

| Toxin | Activated form (kDa) | Toxicity | Synergistic with |
|------------------|----------------------|--------------|--|
| Cry4Aa (134 kDa) | 20 and 45 | Cx > An ≥ Ae | Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba |
| Cry4Ba (128 kDa) | 18 and 45 | An ≥ Ae > Cx | Cry4Aa, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt2Aa |
| Cry11Aa (72 kDa) | 30–33 and 34–38 | Ae ≥ Cx > An | Cry4Aa, Cry4Ba, Cyt1Aa, Cyt2Ba |
| Cyt1Aa (27 kDa) | 22–25 | Cx ≥ Ae > An | Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa |
| Cry10Aa (78 kDa) | 58–68 | Ae > Cx | Cyt1Aa, Cry4Ba |
| Cyt2Ba (29 kDa) | 22.5 | Cx ≥ Ae > An | Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa |
| Cyt1Ca (57 kDa) | ND | ND | ND |

Tabla 2. δ-endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Ben-Dov *et al.*, 2014)

2.4.2 Resistencia a *Bti*

Bti fue introducido por primera vez para el control de los simúlidos, y su utilización se extendió posteriormente a él género *Aedes*. Los programas a largo plazo realizados en muchos países han demostrado su eficacia en condiciones de campo (Becker *et al.* 1997; Guidi *et al.* 2011; Guillet *et al.* 1990).

Los insectos como los mosquitos se vuelven resistentes debido a la amplia utilización de diversos insecticidas en todo el mundo (Chandre *et al.* 1999). La resistencia a la *B. thuringiensis* var *israelensis* es debido a la reducción de unión de estos agentes en el revestimiento epitelial del lumen en el intestino del insecto (Escriche *et al.*, 1995) o por la acción de proteasas del intestino que mejoran el proceso de digestión de los insecticidas. La resistencia contra *Bti* fue documentada en las poblaciones de campo de *Ae. aegypti* y *Ae. vexans* (Goldman *et al.* 1986; Becker y Ludwig 1993).

Teniendo en cuenta que Europa ya ha tomado la decisión de hacer *Bti* el único insecticida aprobado para el control de mosquitos, y que otros países no europeos son propensos a seguir, la resistencia el manejo de *Bti* se convertirá en un importante reto en un futuro próximo en lo que respecta al control de la propagación de mosquitos transmisores de enfermedades. Durante la esporulación *Bti* produce cuatro principales toxinas insecticidas específicas a dípteros: Cry4A, Cry4B y Cry11A, y una toxina citolítica Cyt (Cyt1A) (Schnepf *et al.* 1998; Crickmore *et al.*, 1998). Las toxinas Cry son proteínas cristalinas que matan a los insectos mediante la unión a un específico sitio diana de membrana del intestino e interrumpiendo la integridad de membrana (Ferré y Van Rie 2002; Bravo *et al.* 2007), mientras que la toxina citolítica parece actuar sinérgicamente con las toxinas Cry, presumiblemente como un receptor alternativo de membrana no específico (Butko 2003;

Manceva *et al* 2005). La mezcla de cuatro toxinas sinérgicas con diferentes modos de acción es una de las principales ventajas de este insecticida que retrasa la aparición y evolución de la resistencia. De hecho, sólo niveles moderados de resistencia a la combinación de cuatro toxinas se han reportado después de largos períodos de tratamiento en poblaciones naturales o después de la selección intensiva de laboratorio (Goldman *et al.* 1986; Becker y Ludwig 1993; Georghiou y Wirth 1997; Saleh *et al.* 2003). Por el contrario, se demostró que la resistencia a las toxinas Cry individuales aparecieron rápidamente. Este fue el caso, por ejemplo, para las plagas de lepidópteros resistentes a los cultivos transgénicos que expresan Cry genes de la toxina (Ferré y Van Rie 2002; Griffiths y Aroian 2005), o para los mosquitos seleccionados con sólo uno o un subconjunto de las cuatro toxinas de *Bti* (Georghiou y Wirth 1997). Además, estudios recientes sugieren que la resistencia a las toxinas de *Bti* podría aparecer en las poblaciones naturales de mosquitos (Paul *et al.* 2005; Boyer *et al.* 2007; Paris *et al.* 2010). Por lo tanto, la evolución de resistencia es una preocupación primordial en lo que respecta al uso a largo plazo de este Bacterio-insecticida.

Existen diferentes métodos para contrarrestar la resistencia de los insectos a las toxinas *Bt*: mutación asistida con luz UV; la evolución continúa asistida por fagos (PACE); la combinación de toxinas *Bt* con otras toxinas. Como ejemplo, las proteínas de *Bacillus sphaericus* y formulaciones con extractos de plantas. Colectivamente, estos métodos establecen un enfoque para superar la resistencia a la toxina *Bt*.

2.5 Métodos y contribuciones de Howard T. Dulmage en *Bt*

Howard T. Dulmage fue un microbiólogo que estableció su línea de investigación en el estudio de insectos patógenos bacterianos (Granados, 1996) y es considerado uno de los pioneros más importantes en el desarrollo de tecnologías para la implementación de *Bt* como agente de control de plagas biológicas (Galan, 2017). Trabajando en el Departamento de Agricultura de EE. UU., en el Servicio de Investigación Agrícola (USDA-ARS), en Brownsville, Texas, Howard T. Dulmage aisló del gusano rosado, *Pectinophora gossypiellia*, una cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*, en 1969, que es 200 veces más activo en pruebas de laboratorio contra el gusano rosado,

Pectinophora gossypiella; el gusano del tabaco, *Heliothis virescens*; y el looper de col, *Trichoplusia ni*, más alto que el del cepas conocidas, que se comercializa como "Dipel" por la empresa Estados Unidos de América (Dulmage 1970b; Dulmage 1973; Couch and Ross 1980).

La cepa HD-1 es una de las cepas mejor estudiadas, ya que se caracteriza por llevar una variedad de genes *cry* anti-lepidópteros, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab y Cry1Ia, y desde su descubrimiento, las perspectivas para productos basados en *Bt* se ha expandido y sigue siendo el éxito más comercial del control microbiano de plagas (Ponce 1996; Roh *et al.* 2017),

H. Dulmage establece las bases para los procedimientos de fermentación y formulación de los extractos de cultivo de *Bt* para su comercialización (Dulmage *et al.* 1970). Estableció diversas metodologías para la formulación de productos de producción en masa y la estandarización de su potencial (Galán *et al.* 2017). A principios de la década de 1970, Dulmage obtuvo dos grandes avances, el primero se basó en la recuperación del complejo de esporas y cristales mediante precipitación con lactosa-acetona para producir polvos y humectantes, que se desarrolló y adaptó rápidamente en industria. El segundo fue la adopción de un sistema estandarizado para calibrar la potencia de las diferentes preparaciones de *Bt* y el establecimiento de unidades internacionales de toxicidad (ITU) / mg, que permitieron la comparación de los diferentes productos desarrollados (Galán *et al.* 1998; Realpe *et al.* 1998) La ecuación propuesta por Dulmage (1983) es la siguiente:

$$\text{Prueba de potencial de extractos (ITU/mg)} = \frac{\text{LC}_{50} \text{ estándar [potencial estándar (ITU/mg)]}}{\text{Prueba de extracto LC}_{50}}$$

Dulmage estableció mejores métodos de bioensayo para evaluar la efectividad de los extractos en polvo (Dulmage *et al.* 1970; Dulmage *et al.* 1973) En 1984, Dulmage participó en el establecimiento de un protocolo de bioensayo para la evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en polvo. Este protocolo difiere del

sugerido anteriormente por la OMS en las Directrices para la Producción de *Bti* con respecto a los siguientes aspectos:

- Especifica una taza estándar para la exposición larval a extractos de *Bti*.
- Establece un número de 20 larvas por taza y tres repeticiones para las concentraciones analizadas.
- Si se prueba un mínimo de seis concentraciones de extracto, se requiere una repetición del ensayo.
- Se requiere un análisis computacional probit para evaluar la toxicidad como LC_{50} .
- Una mortalidad o pupación superior al 5% en el control invalida el bioensayo.

Además, el estudio sugirió un coeficiente de variabilidad de menos del 20% para cada repetición. Dulmage, junto con un equipo de colegas, probó la validez de este protocolo y sugirió algunas consideraciones para el manejo de cepas estándar de referencia y para el establecimiento de nuevas.

2.5.1 Extractos fermentados almacenados

De 1970 a 1988, Howard T. Dulmage estableció la mayor colección de *Bt* en America y recolectó más de 800 aislados que fueron nombrados usando su código HD, pertenecientes a 21 serovariedades. De estos 800 aislamientos, 17 pertenecían a la serovariedad H-14, correspondiente a *Bti*. Realizó una serie de experimentos de fermentación con *Bt* para optimizar la producción y evaluar la efectividad del polvo. Se generaron cientos de extractos de fermentación y algunos de ellos fueron donados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos en 1989 a la colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México que tiene aproximadamente 4,000 extractos de fermentación almacenados de los cuales 3,000 corresponden a cepas de HD, y actualmente los extractos de encuentran en forma de polvo seco con diferentes tiempos de almacenamiento (Ponce 1996).

2.5.2 Colección de cepas HD de *Bti*

En la década de 1970, Dulmage continuó con el control de las larvas de mosquitos transmisoras de enfermedades mediante el uso de aislados activos con lepidópteros que tenían alguna actividad reportada contra dípteros. Cuando Dulmage se dio cuenta del descubrimiento de una nueva subespecie *Bt* capaz de atacar a las larvas de dípteros, especialmente a los simuláidos (*Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*) (*Bti*), rápidamente percibió el gran valor de este descubrimiento, debido a la posibilidad de controlar enfermedades humanas peligrosas transmitidas por vectores, y comenzó a participar en estudios sobre *Bti* como agente de biocontrol contra dípteros.

Una de las mayores contribuciones de Dulmage a la investigación de *Bti* fue la compilación de una guía de protocolo para la producción local de serovariedad *Bt* H-14. Esta guía fue una extensión de los procedimientos desarrollados por él para la producción, formulación y estandarización de serovariedades específicas de lepidópteros. Estas directrices fueron presentadas y discutidas en la consulta informal sobre la producción local de H-14 *Bt*, en Ginebra, Suiza, en octubre de 1982.

En 1985, Dulmage y un grupo de investigación probaron que la cepa probada era *Bti* HD-968-S-1983, que resultó ser 4,74 veces más potente que el uso estándar (IPS-78); la potencia asignada fue de 4740 ± 398 ITU / mg. Recomendaron el uso de esta cepa como el estándar de referencia de potencia para la comparación con cualquier formulación de *Bti*. Veinte muestras de las cepas HD-500 y HD-567 de extractos de fermentación *Bti* de la colección de Dulmage (Galán *et al.* 2017) recuperados por co-precipitación de lactosa-acetona durante el período de 1978 a 1983 mantuvieron su actividad tóxica residual contra el mosquito *Aedes aegypti*. Todos los extractos evaluados presentaron toxicidad con las dosis probadas más altas (1,000 ppm) y dos de los extractos almacenados (3260 y 3501) mostraron LD50 de 0.12 y 1.16 ppm, respectivamente (Dulmage *et al.* 1970). Los cristales de proteína *Bti* de los extractos de fermentación mostraron persistencia de la actividad tóxica de los extractos de fermentación después de más de tres décadas. Esto abre la posibilidad de mejorar el uso de cepas especiales y formulaciones mejoradas para controlar los insectos vectores de enfermedades.

2.6 Persistencia de *Bacillus thuringiensis*

Los productos insecticidas a base de *B. thuringiensis* tienen un uso limitado en la agricultura por su corta persistencia en campo, esto debido a la inactivación de sus componentes activos (toxinas y esporas) por diferentes factores medioambientales, entre ellos: la temperatura, radiación ultravioleta (luz UV), precipitaciones, pH y la degradación microbiana (Tabla 3) (He *et al.* 2017; Sauka y Benintende 2008; Rosas 2008).

Se sabe por experimentos en campo y laboratorio que las esporas y toxinas de *Bt* disminuyen rápidamente en el suelo, siendo el cristal el componente que desaparece más rápidamente del ambiente. Sin embargo, pueden permanecer detectables en concentraciones bajas por semanas o meses, siendo estas dosis insuficientes para generar mortalidad en los insectos blanco. Por lo que, la persistencia de estos componentes en el suelo puede tener consecuencias importantes, como la exposición de los insectos a dosis no letales, lo que aceleraría la adquisición de resistencia por parte de estos (Hung *et al.* 2016; He *et al.* 2017).

Tabla 3. Factores ambientales que afectan la persistencia de *B. thuringiensis* en suelo.

| Factor ambiental | Efecto | Referencia |
|------------------------|---|---|
| Temperatura | Disminución rápida de las toxinas de 45-50 °C. | He <i>et al.</i> 2017; |
| | Temperaturas bajas prolongan la persistencia. | Icoz y Stotzky 2008. |
| Luz UV | La longitud de onda de 290-400 nm es la más destructiva. | Rosas 2008 |
| Precipitación | Puede remover físicamente las esporas y toxinas. | Tamez <i>et al.</i> 2000. |
| pH | Las proteínas Cry parecen persistir por más tiempo en suelos ácidos. | Icoz y Stotzky 2008. |
| Degradación microbiana | Las toxinas y esporas pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo o los epifíticos autóctonos. | Sauka y Benintende 2008; Sánchez y Peña 2000. |

La persistencia de las toxinas de *Bt* puede disminuir rápidamente a una temperatura de 45-50 °C (He *et al.* 2017). La temperatura de la hoja y la deficiencia en la presión de vapor afectan la viabilidad y patogenicidad de la espora (Rosas 2008). La radiación ultravioleta es uno de los factores más importantes que afectan la estabilidad de esporas y toxinas de *Bt*. Siendo la vida media de esta especie expuesta a la luz solar menor a 3 días. Algunos estudios, sugieren que la presencia del peróxido de hidrógeno, resultante de la fotooxidación de uno o más aminoácidos causada por la luz UV, reduce la viabilidad y la patogenicidad de este agente biológico, siendo el intervalo de la longitud de onda entre 290-400 nm el factor más destructivo (Rosas 2008). La sensibilidad de las esporas de *B. thuringiensis* está asociada con los plásmidos que codifican para la síntesis de las δ -endotoxinas, las cuales causan cambios en la composición química de la cubierta de la espora y reducen su tolerancia a factores físicos del ambiente. Las esporas de *Bt* germinan y se multiplican en la hemolinfa de los insectos blanco, de esta manera contribuyen a la mortalidad de las larvas. Por lo que la protección de las esporas de la inactivación solar debe ser anticipada para aumentar la toxicidad (Saxena *et al.* 2002).

La lluvia puede remover físicamente las esporas y toxinas del follaje, reduciendo la actividad insecticida residual de los formulados de *Bt* (Tamez *et al.* 2000). Behle *et al.* (1997) determinaron el efecto de la lluvia simulada en la actividad insecticida residual de formulados de *Btk* aplicados sobre un cultivo de col, encontrando que la lluvia redujo en 20% la actividad insecticida de todos los tratamientos evaluados.

Las toxinas y esporas de *Bt* también pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo o los epifíticos autóctonos. En diferentes estudios se ha observado que, en suelos no esterilizados, las esporas de *Bt* pierden rápidamente su viabilidad por la actividad competitiva y depredadora de los microorganismos nativos (Sauka y Benintende 2008; Sánchez y Peña 2000). La degradación y persistencia de las proteínas Cry en el suelo depende de la actividad microbiana, la cual varía dependiendo del tipo de suelo, la temperatura y el pH, así como otras características fisicoquímicas y biológicas del suelo. En los suelos con composición orgánica y mineral las proteínas Cry son rápidamente absorbidas, uniéndose fuertemente a los minerales de la fracción de arcilla del suelo, como la montmorillonita y caolinita; así como en los ácidos húmicos.

Las toxinas unidas a este tipo de material permiten retener sus propiedades insecticidas. La temperatura también puede influir en la biodegradación de las toxinas Cry, con el aumento de 10 °C en la temperatura del suelo se incrementa la actividad microbiana, por lo tanto, se acelera la degradación. Mientras que a temperaturas bajas la actividad insecticida residual se puede prolongar, debido a una menor tasa de degradación microbiana. Así mismo, existen estudios que sugieren que la actividad microbiana en suelo, no juega un papel fundamental en la degradación de proteínas tóxicas de *Bt*, contrario a esto, con mayor probabilidad debido a cambios conformacionales de la proteína, inducidos por interacciones con superficies organominerales de suelos (Hung., 2016). En cuanto al pH, las proteínas parecen persistir por más tiempo en suelos ácidos, como resultado de la solubilización por pH alcalino, así como la disminución de la actividad microbiana por el pH bajo (Hung *et al.* 2016; Tapp y Stotzky 1998; Wang *et al.* 2006; Icoz y Stotzky 2008).

La persistencia de *Bti* en el campo generalmente se considera baja (Lacey 2007). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que puede persistir durante mucho tiempo y sugieren que puede reciclarse bajo condiciones específicas en el medio ambiente. Existen crecientes reportes que resaltan la duración de la actividad biológica de las toxinas ya sea bajo almacenamiento o en campo (Vettori *et al.* 2003; Hung *et al.* 2016; Galán *et al.* 2017; Moustafa *et al.* 2018). Actualmente existen muy pocos estudios sobre la persistencia de las toxinas proteicas de *Bti* en condiciones de almacenamiento, Zafar *et al.* (2000) y Moustafa *et al.*, (2018) evaluaron la vida de anaquel de extractos de *Bti* después de 1-2 años de resguardo, no presentando diferencia significativa en su toxicidad.

3. JUSTIFICACION

El mosquito *Aedes aegypti*, representa una grave amenaza para la salud pública debido a su naturaleza hematófaga y su capacidad de vector como principal transmisor potencial del virus del dengue, fiebre amarilla, zika y chikungunya. Es responsable de la alta morbilidad y mortalidad en miles de millones de personas repartidas en casi la mitad del planeta. Las toxinas de *Bacillus thuringiensis israelensis* han demostrado un gran potencial para erradicar los mosquitos, este efecto insecticida es producido por cuatro toxinas conocidas como Cry4A, Cry4B, Cry11Aa y Cyt1A. Aunque se sabe que la persistencia en campo de *Bti* y sus formulados es baja, hay estudios que sugieren que pueden persistir durante mucho tiempo bajo condiciones específicas. Por lo tanto, para comprender mejor y durante cuánto tiempo persisten las proteínas tóxicas de *Bt* en estas condiciones, es esencial caracterizar su comportamiento y evaluar su capacidad para matar mosquitos en condiciones de laboratorio. Esto puede llevar a la selección de una cepa que perdure largo tiempo en almacenamiento y poco en campo para aumentar su rendimiento y evitar resistencia.

4. HIPOTESIS

Las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, presentaran persistencia en su actividad biológica contra larvas del mosquito *Aedes aegypti*, después de largo periodo en almacenamiento.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar y determinar la viabilidad de las proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* después de largos periodos de almacenamiento contra larvas de *Aedes aegypti*.

Objetivos específicos

1. Aislar y determinar la actividad biológica de cepas de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo contra larvas de *Aedes aegypti*.
2. Determinar la CL₅₀ de extractos almacenados HD de la colección Dulmage de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* contra dípteros *Aedes aegypti*.
3. Producir y aislar el complejo espóra-cristal de cepas reactivadas de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* de extractos almacenados.
4. Determinar la CL₅₀ de cepas reactivadas de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* contra dípteros *Aedes aegypti*.
5. Determinar el perfil de proteínas presente en cepas almacenadas y reactivadas de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Clasificación y selección de cepas

Se seleccionarán 20 extractos de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando la colección donada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 1989 a la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Nuevo León, México, que contiene aproximadamente 4000 extractos de fermentación almacenados de los cuales 3000 corresponden a cepas de HD, actualmente los extractos se encuentran en forma de polvo seco, con diferentes tiempos de almacenamiento (1978 a 1983), en un espacio seco y oscuro a 25 ± 3 ° C en frascos estériles y herméticos.

Tabla 4. Extractos fermentados de *Bti* de la colección Dulmage por cepa, cantidad y año. Resguardados en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.) (Galán *et al.*, 1998).

| Cepas | Número de extractos | Año | Cepas | Número de extractos | Año |
|--------|---------------------|---------|---------|---------------------|---------|
| HD-522 | 3 | 1979-82 | HD-789 | 1 | 1983 |
| HD-563 | 4 | 1979-82 | HD-790 | 1 | 1980 |
| HD-567 | 25 | 1979-87 | HD-792 | 2 | 1981-83 |
| HD-500 | 24 | 1978-79 | HD-793 | 1 | 1983 |
| HD-654 | 3 | 1980 | HD-794 | 1 | 1983 |
| HD-653 | 3 | 1980-82 | HD-795 | 1 | 1984 |
| HD-648 | 1 | 1982 | HD-796 | 1 | 1984 |
| HD-649 | 1 | 1982 | HD-798 | 1 | 1984 |
| HD-656 | 3 | 1980-82 | HD-799 | 1 | 1984 |
| HD-655 | 3 | 1980-82 | HD-800 | 2 | 1981-84 |
| HD-657 | 2 | 1980-81 | HD-816 | 1 | 1981 |
| HD-658 | 2 | 1980-81 | HD-916 | 2 | 1984-87 |
| HD-756 | 1 | ? | HD-917 | 2 | 1983 |
| HD-659 | 2 | 1980-81 | HD-918 | 1 | 1984 |
| HD-814 | 1 | 1981 | HD-919 | 1 | 1983 |
| HD-815 | 1 | 1981 | HD-920 | 1 | 1984 |
| HD-785 | 1 | 1983 | HD-1006 | 1 | 1987 |

6.2 Aislamiento de cepas de bacilos a partir de muestras de suelo

6.2.1 Muestras de tierra

Las muestras de suelos se recolectaron en prospecciones de campo realizadas en diferentes partes de México (Nuevo León, Oaxaca y Querétaro), así como en otros países (Emiratos Árabes, Estados Unidos y Panamá). Se tomaron muestras tanto de suelos de hábitats naturales como de suelos cultivados, incluyendo los diferentes estratos de vegetación presentes, con un total de 10 muestras diferentes de suelo obtenidas. En cada punto de muestreo se recolecto suelo de 5 hasta 10 cm de profundidad. se tomaron 5 submuestras, en una superficie de 0,10 m² cada una aproximadamente, que se mezclaron, para obtener 1 kilogramo de suelo, que posteriormente fue acondicionado y tamizado.

6.2.2 Aislamiento e identificación de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Las muestras de suelo (10 g) se suspendieron individualmente en 100 ml de agua estéril y se homogeneizaron con un agitador magnético durante 10 minutos. Se hicieron diluciones seriadas en diez veces hasta 10⁵ y las diluciones se calentaron a 80 ° C durante 15 minutos en baño de agua maría equipado con un agitador para destruir los formadores sin esporas y las células vegetativas de *Bacillus*. Alícuotas seriadas de suelo de 0,1 ml se colocaron individualmente en placas con agar nutritivo y se incubaron aeróbicamente a 28°C durante 48-72 horas. Tras la incubación se examinaron las colonias crecidas, seleccionándolas por su aspecto y morfología a simple vista. Las colonias de *B. thuringiensis*, se distinguen por su contorno irregular, color blanco con cierta tonalidad grisácea y textura lisa y cerosa en el centro y más mate en los bordes. Esta identificación preliminar de las colonias fue confirmada por observación de células usando la tinción azul de coomassie al microscopio óptico y definitivamente seleccionadas por la presencia de un cristal paraesporal. De cada aislado identificado se obtuvo una mezcla de esporas y cristales que fueron congeladas a -20°C en glicerol al 50 % para su conservación.

6.3 Condiciones y mantenimiento de las poblaciones de *Aedes aegypti*

Las larvas de los estadios tercero y cuarto de *A. aegypti* utilizados en estos experimentos se obtuvieron del insectario del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Biología de la UANL. Esta colonia de mosquitos se mantiene permanentemente en condiciones libres de patógenos a 28 a 30 ° C con una humedad relativa del 60 al 80% y ciclos de luz / oscuridad de 12 h. En estas condiciones, el ciclo de huevo a adulto se completa en tres a cuatro semanas. Las larvas fueron alimentadas diariamente con comida para perros pre-esterilizada finamente molida (marca Pedigree). Las pupas se retiraron diariamente para controlar la edad del mosquito y se colocaron en un recipiente que se introdujo en una jaula durante 48 h para la aparición de mosquitos adultos. Se utilizaron jaulas de diferentes tamaños de acuerdo con la magnitud de la población de mosquitos, que se alimentó diariamente con una solución de glucosa al 10% empapada en hisopos de algodón y cada día con una fuente de sangre durante 10 minutos. La oviposición de las hembras se estimuló con una ovitrampa que consiste en un recipiente de agua cubierto con papel marrón. Los huevos recolectados se transfirieron a bandejas para perpetuar el ciclo de tal manera que las larvas utilizadas en todos los experimentos estuvieran disponibles.

6.4 Reactivación de cepas a partir de extractos almacenados

Para cada extracto de *Bt*, se disolvieron 20 mg de polvo y se homogenizaron en un vórtex en tubos Eppendorf con 1 ml de agua destilada estéril, se reactivaron en placas de Petri y se incubaron en agar nutritivo BD Bioxon durante 48 horas a 30 ° C. Posteriormente se realizó una tinción simple con azul de coomassie para determinar mediante microscopia óptica la presencia y características de los cristales.

6.4.1 Recuperación y producción del complejo espora-cristal

Las colonias se inocularon en matraces de 50 ml que contenían 10 ml de caldo nutritivo (NB, Difco) como medio de cultivo durante 12 a 30 ° C en una incubadora con agitador (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) funcionando a 150 rpm. Después, 1 ml de cada uno de los cultivos en la fase de crecimiento logarítmico medio se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml del mismo medio durante 72 a 30

° C en el mismo agitador funcionando a 150 rpm hasta observar un 80% de esporulación y la mayoría de las esporas y cristales fueron liberados. Luego se extrajo el complejo de esporas y cristales, usando el método de coprecipitación de lactosa-acetona (Dulmage 1970).

6.5. Preparación de tratamientos a base de *Bti*

Se llevo a cabo la prepararon de suspensiones madre del producto solido de cada extracto y añadiendo agua destilada, para realizar posteriores diluciones en frascos de vidrio de 500ml. Para el seguimiento y realización del bioensayo, se prepararon soluciones estándar para determinar el nivel de toxicidad de cada extracto, a una concentración de 1000mg/l, 100mg/l, 10mg/l, 1mg/l, 0.1mg/l y 0.01mg/l. A partir de las suspensiones madre, se prepararon las diluciones posteriores necesarias (tabla 5). Los bioensayos se realizaron utilizando una amplia gama de concentraciones del producto para determinar su toxicidad aproximada. Los resultados se utilizan para determinar una más estrecha y más refinada gama de concentraciones para un bioensayo preciso.

Tabla 5. Concentraciones para desarrollar las soluciones madres y diluciones en serie

| Initial solution | | Aliquot (ml) ^a | Final concentration (PPM) in 100 ml |
|------------------|----------|---------------------------|-------------------------------------|
| % | PPM | | |
| 1.0 | 10 000.0 | 1.0 | 100.0 |
| | | 0.5 | 50.0 |
| | | 0.1 | 10.0 |
| 0.1 | 1 000.0 | 1.0 | 10.0 |
| | | 0.5 | 5.0 |
| | | 0.1 | 1.0 |
| 0.01 | 100.0 | 1.0 | 1.0 |
| | | 0.5 | 0.5 |
| | | 0.1 | 0.1 |
| 0.001 | 10.0 | 1.0 | 0.1 |
| | | 0.5 | 0.05 |
| | | 0.1 | 0.01 |
| 0.0001 | 1.0 | 1.0 | 0.01 |
| | | 0.5 | 0.005 |
| | | 0.1 | 0.001 |
| 0.00001 | 0.1 | 1.0 | 0.001 |
| | | 0.5 | 0.0005 |
| | | 0.1 | 0.0001 |

^a For 200 ml double the volume of aliquots.

6.6 Bioensayos contra larvas del mosquito *Aedes Aegypti*

Se siguieron las pautas de la Organización Mundial de la Salud para la elaboración de bioensayos de laboratorio con larvicidas bacterianos (OMS 2005). Se utilizaron vasos de plástico transparente con capacidad de 250 ml con 150 ml por recipiente y se agregaron 25 larvas de la tercer estadio tardío o cuarto temprano (Figura 8). Para calcular la CL50 de los extractos de fermentación, se prepararon tres suspensiones de 10%, 50% y 98%. El control positivo se realizó en cuadruplicado con el estándar primario. Los resultados se tabularon según la dosis con 4 repeticiones por tratamiento realizado, tomando lectura de larvas vivas y muertas cada 24 horas, realizando cada bioensayo por triplicado. Todas las pruebas se llevaron a cabo a 25 a 28 ° C, con un fotoperiodo 12L: 12D.

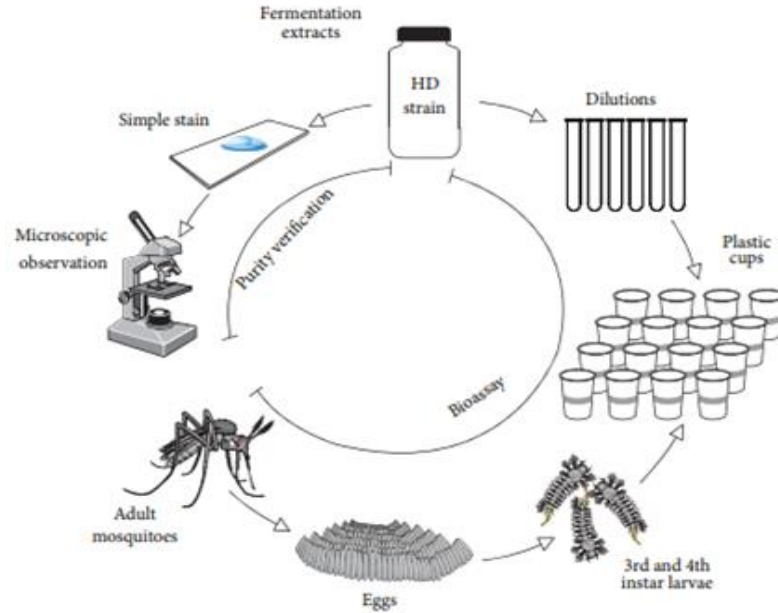


Figura 8. Esquema de trabajo con extractos HD de *Bti* almacenados.

6.6.1 Porcentaje (%) de pupas, adultos y toxicidad relativa

Porcentajes de mortalidad, pupación y aparición de mosquitos se corrigieron cuando fue necesario de acuerdo con la fórmula de Abbott (Abbott 1925). Se ha utilizado las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ pupacion} = [\text{Número de pupas} / \text{Número total de larvas}] \cdot 100$$

$$\% \text{ emergencia} = [\text{Número de adultos} / \text{Número total de larvas}] \cdot 100$$

Índice de toxicidad (Sun 1950) = (LC50 del compuesto eficiente / LC50 del otro compuesto) · 100.

6.6.2 Análisis de los datos

Los resultados se tabularon según dosis, considerando el número de larvas vivas y muertas con 4 repeticiones por tratamiento, realizadas por triplicado a las 24 y 48 hrs. Los valores de concentración letal al 50% (CL₅₀) así como los límites de confianza se obtuvieron mediante análisis probit (Finney 1971). Se realizaron medidas repetidas ANOVA y medidas post-hoc de Tukey-Kramer para comparar las medias entre los diferentes tratamientos de extractos en diferentes condiciones, utilizando el software estadístico NCSS (2019).

6.7 Perfiles de proteínas

Los perfiles de proteínas de las toxinas de cristal de esporas *Bt* se analizarán mediante SDS-PAGE. Se solubilizará un total de 1 mg de cristal y esporas de cada cepa *Bti* en 100 µl de agua nanopura. Fraccionado por tampón de proteína (2-mercaptoetanol al 5%, Tris-HCL 60 mM pH 6,8, glicerol al 25%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,1%), calentado (95 ° C por 5 minutos) y luego analizado por dodecil sulfato de sodio al 12% electroforesis en gel de polimacrilamida (SDS-PAGE). Luego, las proteínas se visualizarán mediante tinción azul Comassie (Sambrook *et al.* 2001).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus* spp esporuladas.

Las muestras de suelo obtenidas fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Graciela Díaz y el Dr. Gerardo Carrión del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas en el 2016. La identificación de las muestras (ID) fue llevada a cabo proporcionando una clave derivada del lugar de muestreo. Las muestras provenían de 4 países diferentes y se aislaron más de 40 cepas de *Bacillus*, de las cuales se observaron cristales parasporales en 24 de ellas.

7.2 Actividad Biológica de cepas aisladas contra *Aedes aegypti*

Las concentraciones utilizadas para determinar su actividad larvicida contra el mosquito *Aedes aegypti* (Tabla 6) estuvieron en el intervalo desde las 40 ppm hasta las 200 ppm, de

Tabla 6. Determinación de la actividad toxica de las cepas aisladas contra *Aedes aegypti*. SP*: Sin presencia de microorganismos esporulados

| N° | ID muestra | Lugar de muestreo | País | Cepas Aisladas | Cepas con presencia de cristales | Tóxicas contra <i>Aedes aegypti</i> | Minima Concentración probada |
|----|------------|---------------------|--------|----------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 1 | DL10 | Cleveland | USA | 2 | 2 | 1 | 40ppm |
| 2 | PC6L10 | Parque de country | MX | 5 | 4 | - | 200ppm |
| 3 | O1L10 | Oaxaca | MX | 6 | 3 | - | 200ppm |
| 4 | CC7L10 | Cerro de las mitras | MX | 3 | 3 | - | 200ppm |
| 5 | VC9L10 | Villa de Juárez | MX | 2 | 1 | - | 200ppm |
| 6 | SC3L10 | Santiago | MX | 4 | 4 | - | 125ppm |
| 7 | P10L10 | Panamá | Panamá | 3 | 2 | - | 125ppm |
| 8 | Q13L10 | Querétaro | MX | 6 | 2 | 1 | 125ppm |
| 9 | VAC6L10 | Valle Alto | MX | 5 | 3 | - | 125ppm |
| 10 | DuL10 | Dubai | Dubai | 0 | - | - | SP |

las cuales en ninguna cepa de las 27 probadas se observó actividad biológica significativa, a excepción de la cepa DL10, teniendo una mortalidad del 90% a la concentración mínima probada.

7.3 Recuperación y producción del complejo espora-cristal de extractos almacenados

Para continuar con el estudio se evaluó la viabilidad de cristales proteicos de extractos almacenados HD de la colección Dulmage de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Para ello se observó la presencia de los cristales a través de microscopía óptica y tinción con azul de Coomassie (Figura 9).

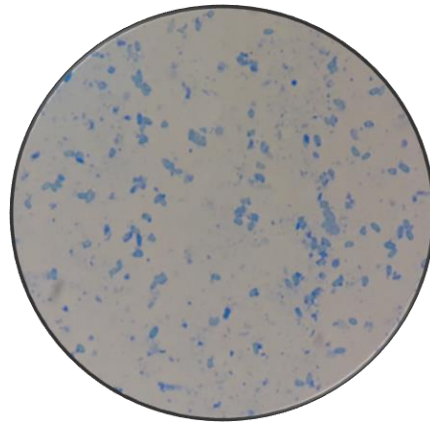


Figura 9. Cristales proteicos de extractos almacenados HD-500 de la colección Dulmage de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Tinción Azul de Coomassie. Objetivo: 100X.

Posteriormente, se procedió a la reactivación de los extractos almacenados con mejor actividad biológica. Las cepas reactivadas de los extractos almacenados fueron la: 3260, 3756, 3501, 3696 y 3691. Se reactivó a través de la siembra en placa y el crecimiento en caldo nutritivo. Mediante la técnica de coprecipitación lactosa-acetona se logró recuperar el complejo espora-cristal de las cinco cepas almacenadas y reactivadas. Se visualizó la presencia de endosporas y cristales a través de cristal violeta y azul de comassie, respectivamente (Figura 10).

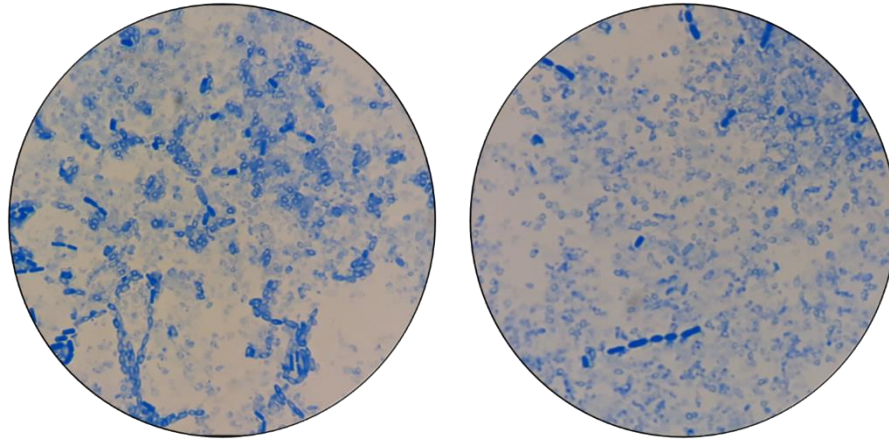


Figura 10. a) Visualización de endosporas del extracto 3260 reactivado de la colección Dulmage de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Tinción Azul de Comassie. Objetivo: 100X.

7.4 Evaluación de la toxicidad de extractos HD de *Bacillus thuringiensis* contra el mosquito *Aedes Aegypti*

La actividad larvicida contra larvas del tercer estadio del díptero *Aedes aegypti* fue evaluada en los extractos almacenados seleccionados (3260, 3756, 3501, 3696 y 3691) así como en los mismos una vez reconstituidos. Se realizaron bioensayos a diferentes tiempos y concentraciones.

7.4.1 Tiempo de mortalidad de extractos HD de Bti contra larvas de *Aedes aegypti*

Los menores tiempos de mortalidad observados en larvas de *A. aegypti* en los extractos almacenados fueron principalmente obtenidos por 3691, 3756, 3696 y 3501 reportando una actividad efectiva a las 0.1 ppm después de 18 – 24 h de tratamiento. A su vez, el extracto 3260 almacenado obtuvo valores cercanos a los controles Vectobac, teniendo actividad efectiva a concentración de 0.01 ppm, después de 18 – 24 h de tratamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Tiempo de mortalidad a distintas concentraciones de extractos de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*.; ** indica agua destilada. VA: Cepa de VectoBac recuperada; VC: Formulado de VectoBac comercial.

| Tratamiento | Concentración (ppm)/ Tiempo (h) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------------------------|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 0.01 | | | | | 0.1 | | | | | 1.0 | | | | | 10 | | | | | 100 | | | | | 1000 | | | | | | | | | |
| | 1 | 6 | 12 | 18 | 24 | 1 | 6 | 12 | 18 | 24 | 1 | 6 | 12 | 18 | 24 | 1 | 6 | 12 | 18 | 24 | 1 | 6 | 12 | 18 | 24 | 1 | 6 | 12 | 18 | 24 | | | | | |
| Control (-) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2858 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3826 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3859 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3350 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | |
| 3549 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 |
| 3553 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| 3356 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 6 |
| 3824 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 6 |
| 3552 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 6 |
| 3825 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 5 |
| 3299 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 8 | 14 |
| 3779 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 11 | 17 |
| 3353 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 15 | 22 |
| 3691 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 8 |
| 3505 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| 3857 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14 | 24 |
| 3756 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 3696 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| 3501 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 8 |
| 3260 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 10 |
| VA | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| VC | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |

Las cepas reactivadas de los extractos almacenados fueron las 3260, 3756, 3501, 3696 y 3691. Se determinó la mortalidad de los extractos en el rango de concentraciones 0.001 – 10 mg/l, además se evaluó la mortalidad cada 12 horas posterior a la exposición. Las cepas 3260 y 3756 presentaron la mejor actividad biológica presentando mortalidad hasta la concentración mínima de 0.001 mg/l. Le siguió el extracto 3691 en la concentración 0.1 mg/l. Mientras que los extractos 3501 y 3696 donde se observó la mejor actividad

larvicida a 1 mg/l. El tiempo de exposición fue efectivo desde la primera hora, no observando diferencias entre la mortalidad a las 12 horas y las 48 horas (Tabla 8)

Tabla 8. Tiempo de Mortalidad en horas, de 25 larvas de *Aedes aegypti* por dosis. Se probaron cinco tratamientos diferentes * a partir de extractos reactivados de *Bti*.

| Tiempo (h) | Lavas muertas / Dosis (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|------|----|----|----|----|-----|---|
| | 3262 | | | | | 3756 | | | | | 3501 | | | | | 3696 | | | | | 3691 | | | | | VB* | |
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T1 | |
| 1 | 25 | 25 | 12 | 1 | 0 | 25 | 8 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 25 | 25 | 25 | 15 | 4 | 25 | 20 | 24 | 13 | 0 | 10 | 1 | 3 | 0 | 0 | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 |
| 24 | 25 | 25 | 25 | 24 | 9 | 25 | 25 | 25 | 20 | 0 | 18 | 4 | 0 | 0 | 0 | 15 | 5 | 0 | 0 | 0 | 17 | 5 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 |
| 36 | 25 | 25 | 25 | 25 | 12 | 25 | 25 | 25 | 23 | 1 | 22 | 11 | 2 | 0 | 0 | 18 | 7 | 2 | 0 | 0 | 22 | 9 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 |
| 48 | 25 | 25 | 25 | 25 | 14 | 25 | 25 | 25 | 24 | 3 | 23 | 18 | 5 | 1 | 0 | 20 | 9 | 2 | 0 | 0 | 22 | 13 | 1 | 0 | 0 | 25 | 0 |

†Dosis (mg/l): T1= 0.1 mg/l; T2= 0.05 mg/l; T3= 0.01 mg/l; T4= 0.005 mg/l; T5= 0.001 mg/l
‡VectoBac 3000 UTI/mg (control)

7.4.2 Porcentajes de mortalidad entre extractos de *Bti* reactivados y reconstituidos

Los ensayos de mortalidad de extractos almacenados de HD en las larvas se llevaron a cabo utilizando rangos de concentración desde 0.01 ppm – 1,000 ppm. Observando una mortalidad significativa en los extractos 3260, 3501, 3691 y 3696. Siendo la cepa 3260 la que proporcionó resultados más efectivos a las mismas concentraciones que el control comercial Vectobac 0.1 ppm (Figura 11). Estas cinco cepas fueron seleccionadas para ser reconstituidas y determinar su actividad biológica contra *Aedes aegypti*.

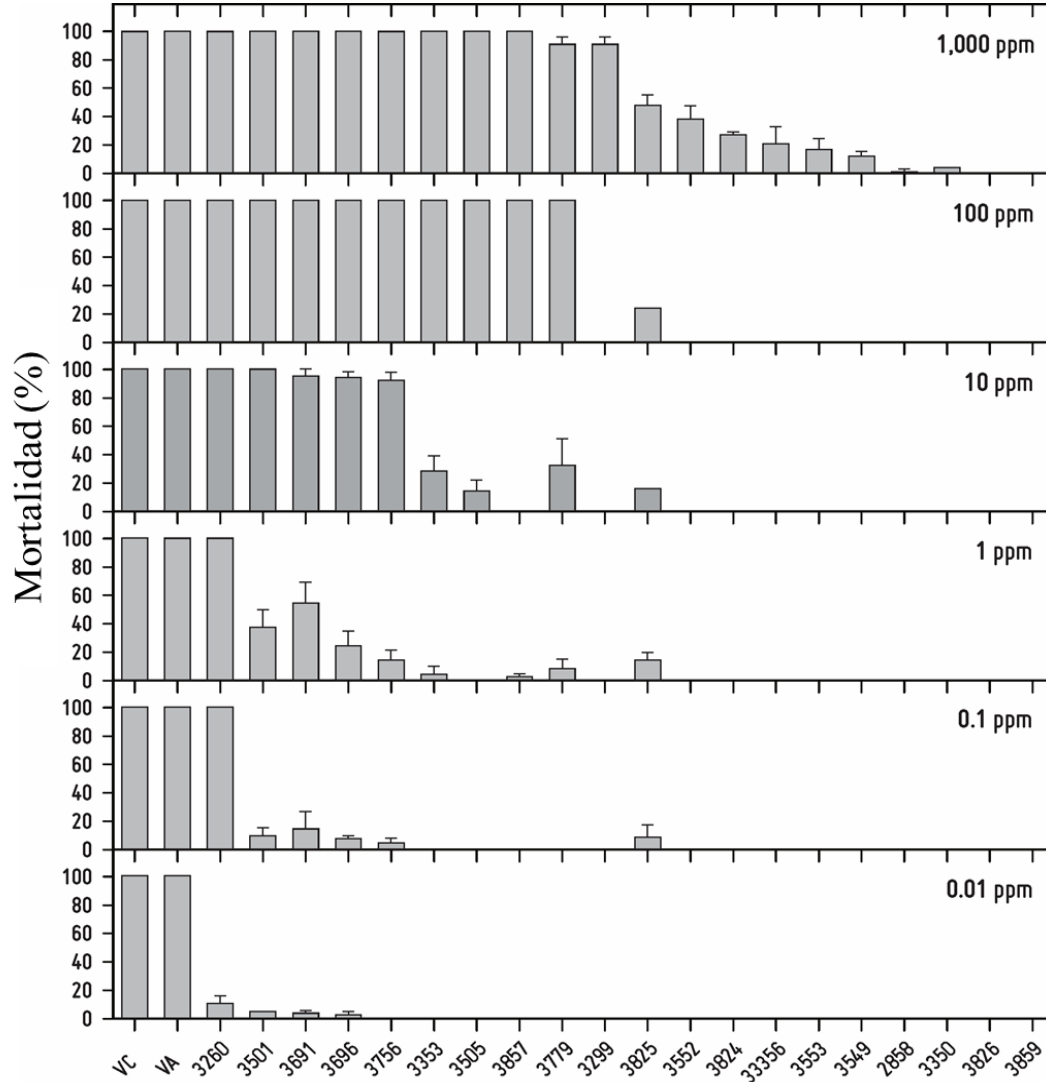


Figura 11. Toxicidad de los extractos de Bti almacenados a diferentes concentraciones contra *Aedes aegypti*.

Los resultados de las cinco cepas reactivadas probadas en bioensayos contra el 3° y 4° estadios de larvas de *A. aegypti* mostraron diferencias significativas en la actividad biológica, en comparación con los extractos almacenados. Como se muestra en la Figura 12, presentaron actividad tóxica a concentraciones tan bajas como 0.001 y 0.005 mg / l, como en el caso de los extractos 3260 y 3756, respectivamente, que presentaron mayor actividad biológica que los demás extractos reconstituidos probados después de 40 años en almacenamiento.

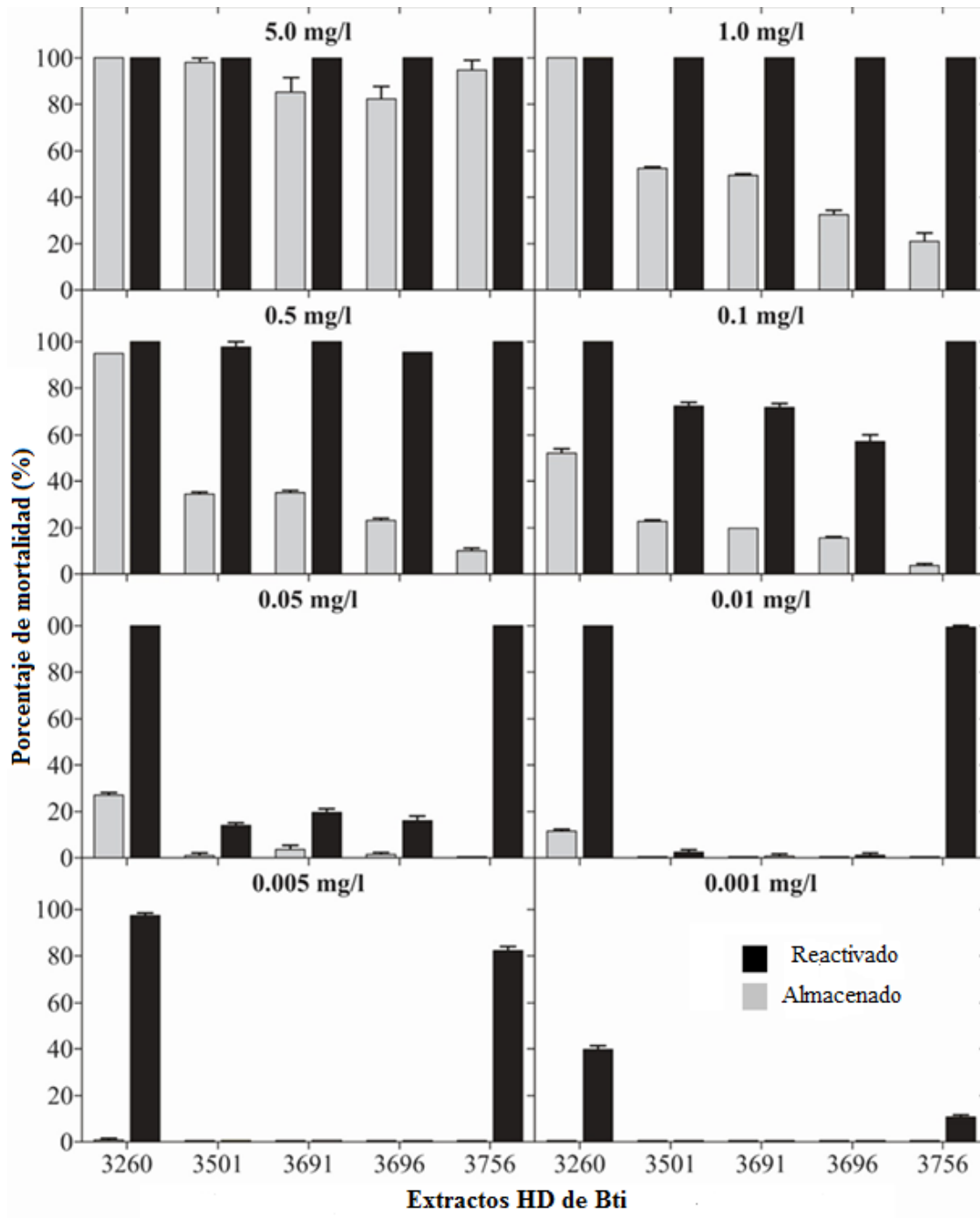


Figura 12. Porcentaje medio de mortalidad de larvas de *A. aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de extractos de *Bti*, bajo diferentes condiciones.

7.4.3 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) aplicando el Método Estadístico Probit

En la estimación de la LD₅₀ se determinó la supervivencia y la mortalidad de la población de larvas de cada uno de los extractos comparándose con el control (Vectobac). Observando una LD₅₀= 0.01 ± 0.0 ppm, LD₉₈= 0.11 ± 0.01 ppm en Vectobac. El extracto 3260 presentó un LD₅₀= 0.12 ± 0.0 ppm, LD₉₈= 1.07 ± 0.09 ppm, mientras que el extracto 3501 presentó un LD₅₀= 0.16 ± 0.02 ppm, LD₉₈= 3.6 ± 0.14 ppm. Estos presentaron la mejor actividad larvicida (Figura 13).

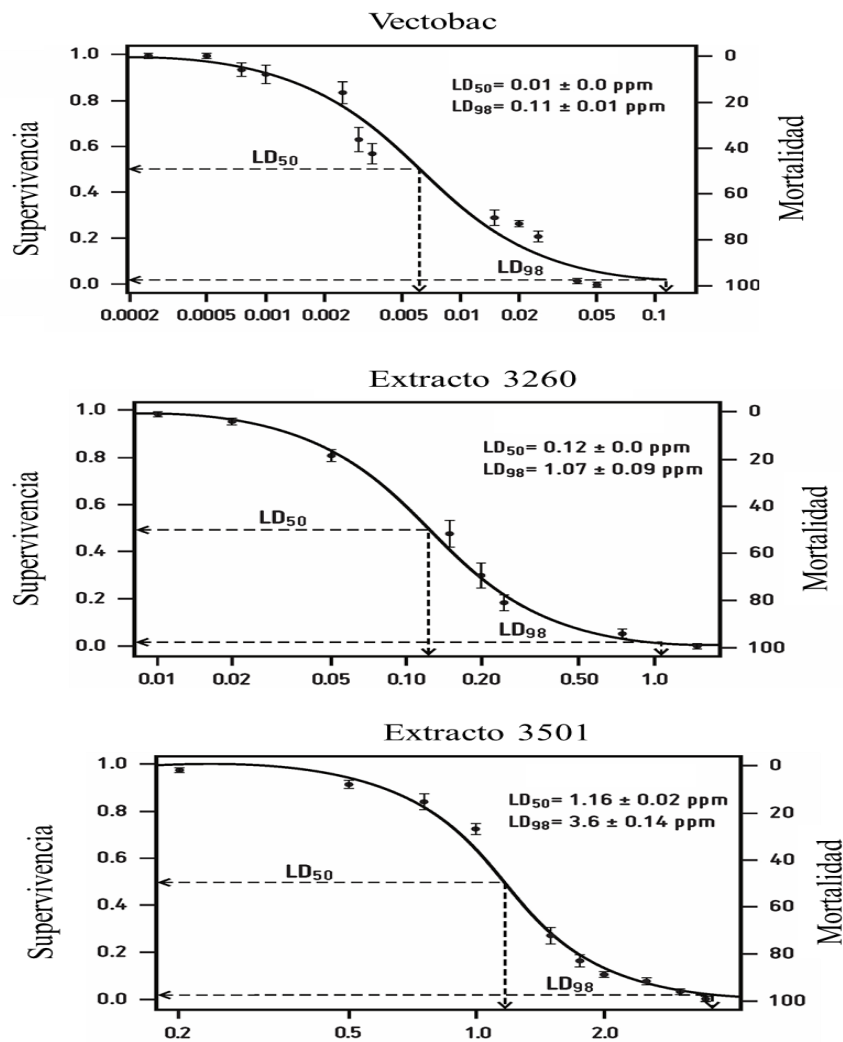


Figura 13. Estimación de la LD₅₀ y LD₉₈ de los extractos almacenados 3501 y 3260 comparativamente con el control Vectobac.

Dentro del análisis comparativo entre los extractos almacenados y reactivados, se observó una LC₅₀ a menor concentración en los extractos reconstituidos, destacando el extracto 3260 y 3756 quienes tuvieron un aumento 100 y 1000 veces mayor en su potencia toxica respectivamente (Figura 14) (Tabla 9).

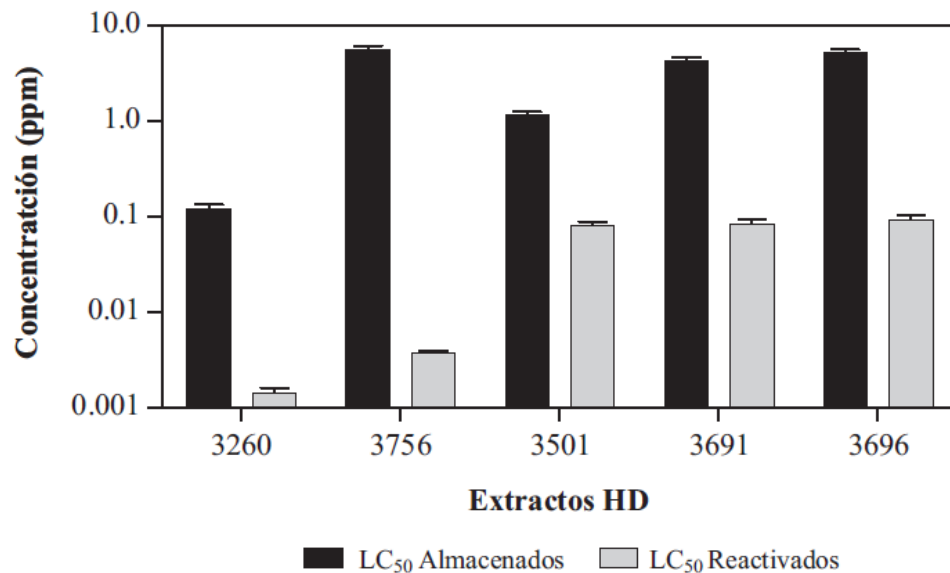


Figura 14. Gráfica comparativa entre los extractos HD almacenados y reactivados determinando la LC₅₀ a diferentes concentraciones (ppm).

Tabla 9. Toxicidad relativa de extractos reactivados e intervalos de confianza entre las LC₅₀ y LC₉₅.

| Cepas <i>Bti</i> | LC ₅₀ (mg/l) 24Hrs (RE) | Intervalo confianza 95% | | LC ₅₀ (mg/l) 24Hrs (SE) | Toxicidad relativa de SE |
|------------------|---------------------------------------|-------------------------|--------|---------------------------------------|-----------------------------|
| | | Menor | Mayor | | |
| 3260 | 0.0014 ± 0.0001 | 0.0012 | 0.0016 | 0.12 ± 0.01 | 1.16 |
| 3756 | 0.0037 ± 0.0002 | 0.0035 | 0.0039 | 5.52 ± 0.19 | 0.06 |
| 3501 | 0.0852 ± 0.0026 | 0.0764 | 0.0940 | 1.16 ± 0.03 | 7.34 |
| 3691 | 0.0840 ± 0.0029 | 0.0757 | 0.0923 | 4.21 ± 0.15 | 1.99 |
| 3696 | 0.0924 ± 0.0053 | 0.0813 | 0.1035 | 5.2 ± 0.11 | 1.77 |

7.4.4 Actividad residual de extractos de *Bti*

Se determino la actividad residual que presentaron las cepas recuperadas de los extractos almacenados, en un promedio de 3 diferentes concentraciones, todos los tratamientos tuvieron presentaron una notable afectación en el desarrollo larval, en especial los extractos 3260, 3756 y 3691 evitando el desarrollo y emergencia del mosquito adulto en la mayoría de las concentraciones (Tabla 10).

Tabla 10. Aspectos adicionales considerados después del tratamiento con extractos de *Bti* reactivados.

| Tratamiento (mg/l) | Duración Larval | Pupación (%) | Emergencia de adultos (%) | Mudas (24Hrs) |
|---------------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------|
| 3260 | | | | |
| 0.0009 | 3.23 ± 0.13 | 40 ± 0.31 | 33 ± 0.12 | 8 |
| 0.0017 | 2.11 ± 0.07 | 28 ± 33 | 17 ± 35 | 3 |
| 0.0037 | 0.92 ± 0.15 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0 |
| Control | 3.39 ± 0.15 | 94 ± 0.65 | 96 ± 0.62 | 12 |
| 3756 | | | | |
| 0.004 | 3.37 ± 0.53 | 40 ± 0.51 | 39 ± 0.12 | 7 |
| 0.005 | 2.45 ± 0.24 | 31.0 ± 22 | 44 ± 0.0 | 2 |
| 0.007 | 0.99 ± 0.09 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0 |
| Control | 3.20 ± 0.17 | 97 ± 0.23 | 93 ± 0.40 | 14 |
| 3501 | | | | |
| 0.075 | 4.55 ± 0.33 | 42 ± 0.16 | 33 ± 0.12 | 7 |
| 0.18 | 3.96 ± 0.48 | 35 ± 0.0 | 49 ± 0.0 | 3 |
| 0.9 | 1.23 ± 0.19 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 2 |
| Control | 3.44 ± 0.25 | 98 ± 0.18 | 93 ± 0.65 | 12 |
| 3696 | | | | |
| 0.06 | 4.70 ± 0.28 | 44 ± 0.22 | 33 ± 0.12 | 9 |
| 0.15 | 2.91 ± 0.36 | 40 ± 0.0 | 51 ± 0.0 | 4 |
| 0.95 | 1.26 ± 0.15 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 1 |
| Control | 3.26 ± 0.1 | 96 ± 0.44 | 98 ± 0.48 | 15 |
| 3691 | | | | |
| 0.075 | 3.81 ± 0.60 | 38 ± 0.35 | 33 ± 0.12 | 6 |
| 0.10 | 1.91 ± 0.32 | 29 ± 0.0 | 39 ± 0.0 | 3 |
| 0.4 | 1.12 ± 0.05 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0 |
| Control | 3.40 ± 0.1 | 95 ± 0.66 | 96 ± 0.56 | 14 |

7.5 Perfiles de proteínas

Dentro de la caracterización de los extractos, se realizó un perfil proteico a través de SDS-PAGE. Donde se comparó el patrón de bandas presentes en los extractos almacenados y los reactivados. Esto evidenció un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a Cry y Cyt en cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de los extractos reactivados (Figura 15).

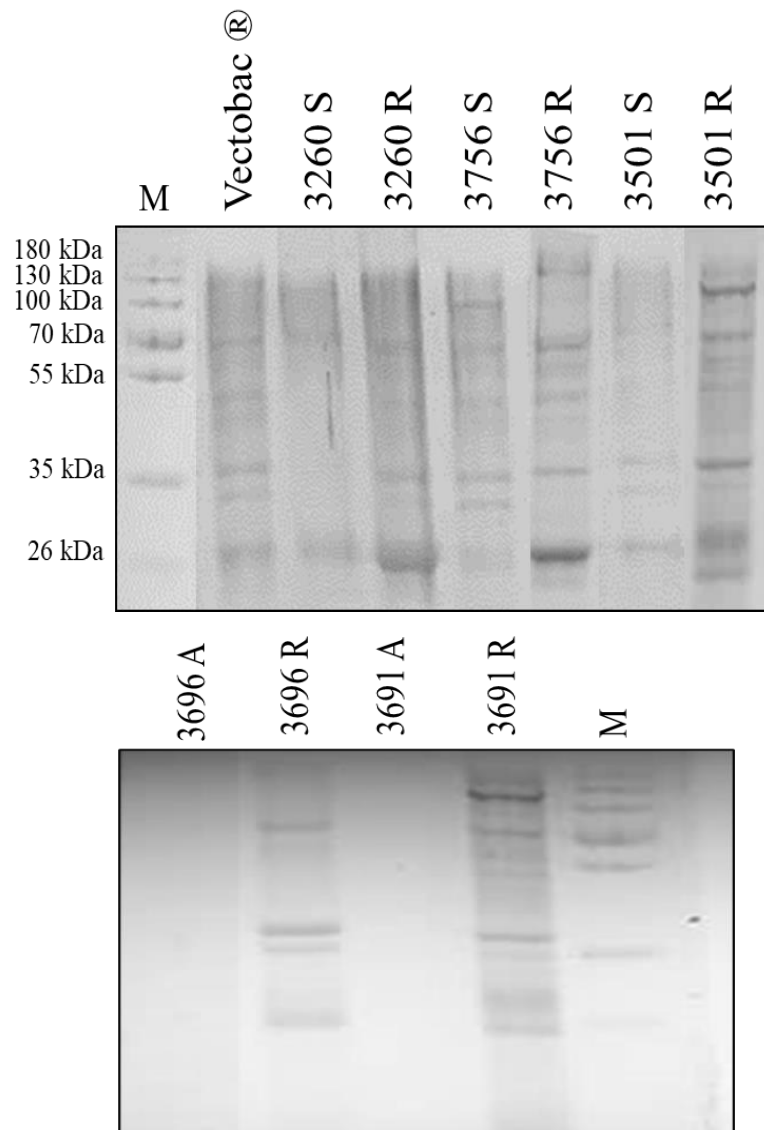


Figura 15. SDS-Page de perfiles proteicos de extractos almacenados (A) y reactivados (R) ® de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Tinción con azul de comassie. M: Marcados de talla molecular (PageRuler®).

8. DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento de su potencial y eficacia como un agente de control biológico, *Bacillus thuringiensis* se ha aislado en varias partes del mundo, ya que la mayoría de los estudios sobre *B. thuringiensis* demuestran su ubicuidad en cualquier tipo de suelo (Dulmage y Aisawa 1982; Martin y Travers 1989; Bernhard *et al.* 1997; Hossain *et al.* 1997; Bravo *et al.* 1998). Muchos informes sobre la frecuente aparición de aislados de *Bt* en el entorno natural han demostrado la alta posibilidad de aislar nuevas cepas con actividad biológica de interés y mayor potencia, este es el caso del serotipo H-14 de *Bti* que produce 4 toxinas principales (Cry4Aa, CryBa, Cry11Aa y Cyt1Aa) específicas de dípteros. Aunque se logró aislar más de 40 cepas del género *Bacillus* de diferente área geográfica, se observó la existencia de cristales proteicos en más de 20 y presencia de actividad biológica contra larvas de *Aedes aegypti* en 2 cepas aisladas de muestras de tierra (DL10-Cleveland y Q13L10-Queretaro) obteniendo una Concentración Letal 50 de 40ug/ml y 125ug/ml respectivamente. Estando por debajo de los bioinsecticidas comerciales. Es de destacar, sin embargo, que diversos estudios han proporcionado evidencia de una amplia distribución de *B. thuringiensis* no insecticidas en ambientes naturales (Ohba 1996, 1997; Roh *et al.* 1996). En este caso, las muestras de suelo recolectadas de otras regiones que no presentaron *Bt* puede deberse a la presencia de desinfectantes y los productos químicos residuales según los hallazgos de Martin y Travers (1989), el cual también demostró que *Bt* fue más productivo en algunas áreas que otras.

Se suele saber que la persistencia de toxinas proteicas de *Bacillus thuringiensis* no perduran en el medio ambiente, sin embargo, existen crecientes reportes que resaltan la duración de la actividad biológica de las toxinas ya sea bajo almacenamiento o en campo (Vettori *et al.* 2003; Hung *et al.* 2016; Galán *et al.* 2017; Moustafa *et al.* 2018).

Actualmente existen muy pocos estudios sobre la persistencia de las toxinas proteicas de *B. thuringiensis* en condiciones de almacenamiento, donde según diversos estudios, en 1-2 años de resguardo, los extractos de *Bt*.no presentan diferencia significativa en su toxicidad (Zafar *et al.* 2000; Moustafa *et al.* 2018). Por otro lado, los pocos informes sobre la persistencia de toxicidad en el campo o bajo control indican que estas proteínas pierden rápidamente sus propiedades insecticidas debido a diferentes causas. Entre los factores

ambientales que afectan negativamente la persistencia de la toxicidad se encuentran la temperatura (Wraight *et al.* 1981), la radiación solar (Becker *et al.* 1992), el pH (Ignoffo *et al.* 1981), la solubilización (Hung *et al.* 2016) y la materia orgánica (Essen and Hembree 1982).

Nuestros hallazgos demuestran la persistencia de la actividad tóxica en los extractos fermentados de *Bti* contra larvas de *A. aegypti* después de casi cuatro décadas de almacenamiento. Todos los extractos estudiados mostraron toxicidad a las dosis más altas probadas (1000 ppm) mientras algunos de los extractos (3501 y 3260), de las cepas HD-500 y HD-567, mostraron actividad larvicida a dosis tan bajas como 0.01 ppm. Dichos datos son sorprendentes, ya que ningún estudio hasta la fecha ha informado de la actividad de las proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* después de un tiempo de almacenamiento tan largo.

Sin embargo, otros autores han demostrado que algunas condiciones favorecen la posibilidad de aumentar su persistencia, por ejemplo, Saxena *et al.* (1999) demostró que las proteínas Cry de los exudados de raíz de maíz *Bt* mantuvieron su actividad larvicida durante más de 180 días en el suelo, mientras que Tapp y Stotzky (1998) informaron esta misma capacidad tóxica más de 234 días después de su incorporación al suelo. las proteínas Cry continúan activas hasta cierta medida bajo condiciones específicas, después de ser aisladas mediante el tratamiento lactosa-acetona (Dulmage 1970). La continua actividad larvicida de los extractos almacenados puede deberse a diversos factores, desde su producción hasta su conservación, como mantenerlos en viales herméticamente cerrados con el fin de evitar la absorción de humedad, ya que se encontró que este material es altamente higroscópico (Manonmani *et al.* 2008). Asimismo, la adsorción del complejo espora-cristal en las partículas de lactosa recogidas durante la producción del extracto de fermentación puede haber mantenido la estabilidad conformacional de las proteínas. Ahora se sabe que la unión a partículas favorece la protección de las células frente al daño y reduce la susceptibilidad a la contaminación y degradación bacteriana, manteniéndola biológicamente activa (Prabakaran y Hoti 2008). Estos hallazgos indican que el método de recuperación del complejo espora-cristal mediante coprecipitación de lactosa-acetona, junto con condiciones específicas de humedad, temperatura y luz, puede extender la vida útil de los extractos de *Bti* y retener la actividad biológica de las endotoxinas durante

décadas. En otras variedades de esta bacteria de la misma colección de extractos de fermentación (datos no publicados), cuyo mecanismo de protección aún es incierto, no aparece el mismo efecto. Aunque se encontró que la actividad de los extractos de *Bti* era muy baja en comparación con el tratamiento con VectoBac, es notable que la actividad residual mantenida en las concentraciones más altas probadas, y dos de estos extractos se destacaron en las concentraciones mínimas a las que podrían matar larvas de mosquito.

La potencia de las proteínas tóxicas de *Bti* reside en su actividad sinérgica atribuida a complejas interacciones entre 4 toxinas principales (Cry4A, Cry4B, Cry11Aa y Cyt1) (Perez *et al.* 2005; Cantón *et al.* 2011; Elleuch *et al.* 2015). Las bajas concentraciones de toxinas Cyt1Aa observadas en el análisis del perfil de proteínas de los extractos almacenados, pudo haber afectado su actividad biológica, ya que la toxicidad de cada una de las cuatro proteínas Cry es mayor que las de Cyt, pero la alta actividad de todo el cristal es producto de sinergias entre ellas (Perez *et al.* 2007; Ben-Dov 2014), esto debido a la característica única de Cyt1Aa que sirve como un receptor adicional para las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry11Aa de *Bti*. Cyt1A mejora la actividad de las toxinas Cry al funcionar como receptores unidos a membrana: mejorando la unión a microvellosidades epiteliales del intestino del insecto *A. aegypti* y facilitando la formación de estructuras oligoméricas pre-poros, sinergizando así su toxicidad (Ben-Dov 2014; Torres-Quintero *et al.* 2018). La pérdida de actividad biológica de las proteínas Cyt puede deberse a la posible presencia de proteasas, así como a la constante temperatura (25°C) a lo largo del tiempo, que puede producir un cambio conformacional en su estructura (Hung *et al.* 2016). Los resultados observados según el análisis proteico son consistentes con la persistencia diferencial de la actividad biológica presentada en las delta-endotoxinas bajo condiciones de laboratorio contra larvas de *Aedes aegypti*. Según diferentes estudios, sugieren que cuanto mayor es el tamaño de la proteína, más persiste: Cry4(130kDa)>Cry11(70kDa)>Cyt(28kDa) (Tetreau *et al.* 2012; Ben-dov).

La actividad biológica de las cepas reactivadas se vio considerablemente potenciada en comparación con los extractos almacenados (Galán *et al.* 2017), esto debido a la degradación o inactivación de las proteínas tóxicas de *Bti* después de largo periodo de tiempo, en el caso particular las cepas reactivadas de los extractos 3260 y 3756 se observó

una fuerte banda marcada de 28kDa en el gel de policrilamida, atribuida a la proteína Cyt1 (Zghal and Jaoua 2004) así como un aumento respectivo de 100 (LC₅₀ 0.0014 mg/l) y 1000 (LC₅₀ 0.0038 mg/l) veces más, en su actividad toxica larvicida siendo más potentes que la mayoría de los productos comerciales. Esto demuestra una alta viabilidad de esporas y la preservación de las capacidades genéticas de las cepas. Los datos obtenidos de los extractos son una señal alentadora con respecto al trabajo que demuestra que los cristales de proteína *Bti* pueden prolongar su toxicidad en condiciones de vida útil o de campo bajo condiciones específicas. Esto puede llevar a la selección de una cepa para la elaboración de un formulado que perdure largo tiempo en almacenamiento y poco en campo para aumentar su rendimiento y evitar resistencia.

9. CONCLUSIONES

- 1.- De las veinticuatro aislados de suelo de *Bacillus thuringiensis*, solo la cepa DL10-Cleveland presento ligera actividad larvicida.
- 2.- Las proteínas toxicas de los extractos de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* tratados mediante la coprecipitacion lactosa-acetona pueden prolongar su actividad biologica en condiciones de vida útil bajo condiciones específicas.
- 3.- La estabilidad de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* disminuye después de un largo período de tiempo bajo almacenamiento, particularmente la proteína Cyt1A.
- 4.- El método de conservación a partir de la coprecipitación lactosa-acetona mantiene alta la viabilidad de las esporas, así como la preservación de las capacidades genéticas de las cepas.
- 5.- La cepa HD-567 del extracto 3260 muestra un gran potencial para desarrollarse como biopesticida contra el mosquito *Aedes aegypti*.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abd El-Ghany A, Abd El-Ghany N. 2017. Molluscicidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Biomphalaria alexandrina* snails. Beni- Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 6:391-393.
- Adang MJ, Crickmore N, Jurat- Fuentes JL. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. Advances in Insect Physiology 47:39-87
- Ahmad Z, Shahid K, Ahmad I, Riazuddin S. 2000. Shelf Life and Field Evaluation of CAMB *Bacillus thuringiensis* Biopesticide Against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) on Tomato. Pakistan J Biol Sci 3:804–807.
- Badran A, Guzov V, Huai Q, Kemp M, Vishwanath P, Kain W. 2016. Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. Nature. 533:58-63.
- Bar A, Andrew J. 2013a. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* larvae. Annual Review and Research in Biology, Vol. 3, pp. 1-21.
- Bar A, J Andrew. 2013b. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. Annual Review and Research in Biology, Vol. 3, pp. 52-69.
- Ben-Dov E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. Toxins 6:1222-1243.
- Ben-Dov E, Boussiba S, Zaritsky A. 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol 177, 2851–2857.
- Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, Jones A, Murphy L, Quail A, Holden G, Harris D, Zaritsky A, Parkhill J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5082e5095.
- Black CW, Bennett KE, Gorrochótegui EN, Barillas MC, Fernández SI, Lourdes MA, Farfán AJ, Olson KE, Beaty JB. 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of Medical Research 33:379-388.

Boyd AM, Kay BH. 2000. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex sitiens*, *Culex annulirostris*, and *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae) for barmah forest virus. *Journal of Medical Entomology* 37(5):660–663.

Brady OJ, Johansson MA, Guerra CA. *et al.* 2013. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites Vectors* 6, 351.

Cantón PE, Reyes EZ, de Escudero IR, Bravo A, Soberon M. 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides* 32:595-600.

Chadee DD, Corbert PS. 1987. Seasonal incidence and diel patterns of oviposition in the field of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: A preliminary study. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 81:151-161.

Chadee DD, Corbert PS, Greenwood JD. 1990. Egg-laying Yellow Fever Mosquitoes avoid sites containing eggs laid by themselves or by conspecifics. *Entomology Experimental Applied* 57:295- 298.

Couch T, Ross D. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 22:1297-1304.

Chougule NP, Bonning, BC. 2012. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins* 4:405–429.

Christophers SR. 1960. *Aedes aegypti* (L.) The Yellow Fever Mosquito. Its Life History. Bionomics and Structure, Cambridge University Press, Cambridge.

Clements AN. 2000. The Biology of Mosquitoes, Volume I: “Development, Nutrition and Reproduction” Second Edition, CABI Publishing, Oxford.

Cohen S, Albeck S, Ben-Dov E, Cahan R, Firer M, Zaritsky A, Dym O. 2011. Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane perforating function. *J. Mol. Biol* 413:804-814.

- Couret J, Benedict MQ. 2014. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *BioMed Central Ecology* 14:1-15.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *MicrobiolMol Biol Rev* 62:807.
- Crickmore, N, Bone EJ, Williams JA, Ellar DJ. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett* 131, 249–254.
- De Maagd R. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17:193-199.
- Delecluse A, Bourgoquin C, Klier A, Rapoport G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins encoded by two different genes. *Mol. Gen. Genet* 214:42–47.
- Dickson LB *et al.* 2014. Vector competence in West African *Aedes aegypti* Is Flavivirus species and genotype dependent. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8:10-3153.
- Donovan WP, Engleman JT, Donovan JC, Baum JA, Bunkers GJ, Chi DJ, *et al.* 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:713-719.
- Dulmage HT. 1970. Production of the spore-Sendotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology* 16:385-389.
- Dulmage HT. 1973. Assay and standardization of microbial insecticides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 217:187-199.
- Dulmage HT, Correa JA, Martinez AJ. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15:15-20.

Dulmage HT, McLaughlin RE, Lacey LA, Couch TL, Alls RT, Rose RI. 1985. HD-968-S-1983, a proposed US standard for bioassays of preparations of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*-H-14. Bulletin of the ESA **31**:31-34.

Elleuch J, Jaoua S, Darriet F, Chandre F, Tounsi S, Zghal R. 2015. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. Toxicon **104**:83-90.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proceedings of the National Academy of Sciences **93**:5389-5394.

Farnesi LC. *et al.* 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Influence of different constant temperatures. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **104**:124-126.

Fay RW, Perry AS. 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. Mosquito News **25**:276-281.

Foster WA, Walker ED. 2002. Mosquitoes (Culicidae). in G. Mullen and L. Durden (eds.), Medical and Veterinary Entomology, Academic Press, San Diego, pp. 203-262.

Gad A, Al-Dakhil A. 2018. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) and four plant extracts on the mortality and development of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Egypt J Biol Pest Control **28**:62

Galan-Wong L, Gamino-Hernandez R, Fernandez-Chapa D, Garcia-Diaz G, De La Garza-Ramos M, Guajardo-Barbosa C, *et al.* 2017. Persistence of toxic activity of fermentation extracts from *Bacillus thuringiensis var. israelensis* after more than three decades of storage. International Journal of Microbiology. **1**:1-6.

Goldberg LJ, Margalit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News **37**:355-358.

Gomez-Machorro C, Bennet KE, y M del. Muñoz. 2004. Quantitative trait loci affecting dengue midgut infection barriers in an advanced intercross line of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 13:637-648.

Granados B. Founder's Lectures. 1996. 29th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and IIIRD International Colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Córdoba, Spain: Society for Invertebrate Pathology

Harrington L y Edmann JD. 2001. Indirect evidence against delayed “Skip-Oviposition” behavior by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand”, *Journal of Medical Entomology* 38:641-645.

He X, Sun Z, He K, Guo S. 2017. Biopolymer microencapsulations of *Bacillus thuringiensis* crystal preparations for increased stability and resistance to environmental stress. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7):2779-2789.

Helassa N, M'charek A, Quiquampoix H, Noinville S, Déjardin P, Frutos R, Staunton S. 2011. Effects of physicochemical interactions and microbial activity on the persistence of Cry1Aa *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43(5):1089-1097.

Hernández-Soto A, Del Rincón-Castro MC, Espinoza AM, Ibarra JE. 2009. Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. *Appl. Environ. Microbiol* 75:4661–4667.

Hofte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53:242-255.

Icoz I, & Stotzky G. 2008. Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 40(3):559–586.

Park HW, Pino BC, Kozervanich-Chong S, Hafkenschied EA, Oliverio RM, Federici BA, Bideshi DK. 2013. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* enhances mosquitocidal activity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 against *Aedes aegypti* but not *Culex quinquefasciatus*. *J Microbiol Biotechnol* 23(1):88-91.

Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol.* 88(1):91-142.

James Clive. 2015. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. *ISAAA Brief* No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

Jouzani GS, Valijaniani E, Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: A successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:2691-2711.

Kettle DS. 1984. *Medical and Veterinary Entomology*. John Wiley and Sons: New York, pp. 658

Khasdan V, Ben-Dov E, Manasherob R, Boussiba S, Zaritsky A. 2001. Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Environ. Microbiol* 3:798–806.

Knowles BH, Dow JAT. 1993. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*—Models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioessays* 15:469-476.

Lacey LA. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 23(2):133–163.

Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132:1-41.

Land M, Miljand M. 2014. Biological control of mosquitoes using *Bacillus thuringiensis israelensis*: A pilot study of effects on target organisms, non-target organisms and humans. *Mistra Evi EM.* 2014;**PS4**

Manasherob R, Itsko M, Sela-Baranes N, Ben-Dov E, Berry C, Cohen S, Zaritsky A. 2006. Cyt1Ca from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: production in *Escherichia coli* and comparison of its biological activities with those of other Cyt-like proteins. *Microbiology* 152:2651–2659.

Mogi M, y Mokry J.1980. Distribution of *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae) eggs in pitcher plants in Newfoundland, Canada. *Tropical Medicine* 22:1-12.

Moustafa M, Saleh M, Ateya I, Kandil M. 2018. Influence of some environmental conditions on stability and activity of *Bacillus thuringiensis* formulations against the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal Of Biological Pest Control* 28(1).

Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F. 1992. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* treatments. *Journal of the American Mosquito Control Association* 8(3):285–289.

Nelson M.J. 1986. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology, Pan American Health Organization, Washington, DC, PNSP/86-63, pp. 50.

Ochoa G, Arrivillaga J. 2009. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 49:181-191

Ohba M. 1996. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *Journal of Applied Bacteriology* 80:56–64.

Ohba M. 1997. Three *Bacillus thuringiensis* flagellar serovars widely occurring in natural environments of Japan. *Journal of Basic Microbiology* 37:71–76.

Ohba M, Mizuki E, Uemori A. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research* 29:427-433.

Organización Mundial de la Salud. 2019. Casos Reportados de Dengue en las Américas. Recuperado de: <http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>

Organización Mundial de la Salud. (6 de enero de 2017). Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2016. Recuperado de: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-ene-6-phe-CHIKV-casos-se-1.pdf>

Otero M, Solari HG, Schweigmann N. 2006. A stochastic population dynamics model for *Aedes aegypti*: Formulation and application to a city with temperate climate”, *Bulletin of Mathematical Biology* 68(8):1945-1974.

Otieno-Ayayo ZN, Zaritsky A, Wirth MC, Manasherob R, Khasdan V, Cahan R, Ben-Dov E. 2008. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environ. Microbiol* 10:2191–2199.

Palma L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins* 6:3296-3325.

Panwar BS, Ram C, Narula RK, Kaur S. 2018. Pool deconvolution approach for high-throughput gene mining from *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:1467-1482.

Perez C, Muñoz-Garay C, Portugal LC, Sanchez J, Gill SS, Soberon M, *et al.* 2007. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* 9:2931–7.

Perez C, Fernandez L, Sun J, Folch J, Gill S, Soberon M, Bravo A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 102(51), 18303-18308.

Powell JR, y Tabachnick WJ. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – A review”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108:11-17.

Promdonkoy B, Ellar DJ. 2005. Structure-function relationships of a membrane proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:807-813.

R Core Team, *R: A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

Raymond B, Johnston PR, Nielsen LC, Lereclus D, Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology* 18:189-194.

Realpe M, Montoya D, Orduz S. 1998. *Bacillus thuringiensis*: Legado para el siglo XXI. *Revista Colombiana de Biotecnología* **1**:11-27.

Reiter P. 1998. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988 - 1995: The shape of things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association* **14**:83-94.

Roh JY, Park HW, Jin BR, Kim HS, Yu YM, Kang SK. 1996. Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolated from Korea. *Letters in Applied Microbiology* **23**:249–252.

Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2017. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *International Journal of Microbiology Biotechnology* **17**:547

Rojas-Ruiz, N. E., Vázquez-Cruz, C., Sánchez-Alonso, P., & Sansinenea-Royano, E. (2010). Análisis poblacional de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en interacción in vitro con bacterias del suelo. *Agrociencia*, *44*(8), 941-953.

Rosas GNM. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología* **10**(1):49-63.

Rueda LM *et al.* 1990. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera. Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **27**(5):892-898.

Wraight SP, Molloy D, Jamnback H, McCoy P. 1981. Effects of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae,” *Journal of Invertebrate Pathology* **38**(1):78–87.

Sajid M, Geng C, Li M, Wang Y, Liu H, Zheng J, *et al.* 2018. Whole genomic analysis of *Bacillus thuringiensis* revealing partial genes as a source of novel Cry toxins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**:e00277-e00218

Sanchis V, Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: Applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **28**:11-20.

- Sauka DH, & Benintende GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología* 40(2): 124-140.
- Saxena D, Ben-Dov E, Manasherob R, Barak ZE, Boussiba S, Zaritsky A. 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. *Current Microbiology* 44(1)25-30.
- Saxena D, Flores S, Stotzky G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*. 402:6761:480.
- Schaper S, & Hernandez-Charvarria F. 2006. Scanning electron microscopy of the four larval instars of the Dengue fever vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)", *Revista de Biología Tropical* 54:847-852.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Scott F. *Biology*. Glenview, Illinois: Scott, Foresman and Company. 1980. p. 689
- Service M. 2012. *Medical Entomology for Students*, 5th Ed. Cambridge University Press: New York. pp. 303.
- Shea K, Possingham HP. 2000. Optimal release strategies for biological control agents: an application of stochastic dynamic programming to population management. *Journal of Applied Ecology* 37:77-86.
- Sheeran W, & Fisher S. 1992. The effects of agitation, sediment, and competition on the persistence and efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 24(3):338-346.
- Soberon M, Lopez-Diaz JA, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides* 41:87-93.
- Sun YP. 1950. Toxicity Index-An Improved Method of Comparing the Relative Toxicity of Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 43(1):45-53.

Russell TL, Brown MD, Purdie DM, Ryan PA, and Kay BH. 2003. "Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*) formulations for mosquito control in Australia," *Journal of Economic Entomology*, vol. 96, no. 6, pp. 1786–1791.

Watson TM and Kay BH. 1998. "Vector Competence of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) for Ross River Virus in Queensland, Australia," *Journal of Medical Entomology*, vol. 35, no. 2, pp. 104–106.

Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S., & Galán Wong, L. J. (2000). Assessment of Microencapsulated Formulations for Improved Residual Activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 93(2), 219–225

Tapp H, & Stotzky G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30(4):471-476.

Tetreau G, Alessi M, Veyrenc S, Pérignon S, David JP, Reynaud S, Després L. 2012. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: Evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. *Appl. Environ. Microbiol* 78:8362–8367.

Van Essen FW, and Hembree SC. 1982. Simulated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes: residual activity and effect of soil constituents. *Mosquito News* 42(1):66–72.

Van Frankenhuyzen K. 2013. Crossorder and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 114:76-85

Vargas VM. 1968. Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Mosquito News* 28:374-379.

World Health Organization. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>

Wirth MC, Georghiou GP, Federici BA. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci* 94:10536–10540.

Wirth MC, Park HW, Walton WE, Federici BA. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol* 71:185–189.

Yang HM. *et al.* 2009. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti* the vector of dengue. *Epidemiology and Infection* 137(8);1188-1202.

Ye W, Zhu L, Liu Y, Crickmore N, Peng D, Ruan L, Ye. 2012. Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:4795-4801.

Zafar A, Karim S, Ahmad Nasi I and Riazuddin S. 2000. Shelf Life and Field Evaluation of CAMB *Bacillus thuringiensis* Biopesticide Against *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on Tomato. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3(5):804-807.

Zhang L, Zhao G, Hu X, Liu J, Li M, Batool K. 2017. Cry11Aa interacts with the ATP-binding protein from *Culex quinquefasciatus* to improve the toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:10884-10890.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

David Daniel Fernández Chapa

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: PERSISTENCIA Y RECONSTITUCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE EXTRACTOS ALMACENADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
DESPUÉS DE 40 AÑOS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacido en el Municipio de Monterrey del estado de Nuevo León, México en 1989. Hijo del Sr. Julio de Jesús Fernández Hinojosa y la Sra. Diana Margarita Chapa Hinojosa.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido

Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2013.

Experiencia Profesional: Personal no Docente desde agosto del 2019 en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas.