

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS FORMULADOS DE
BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS PARA EL
CONTROL DE LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*.**

POR

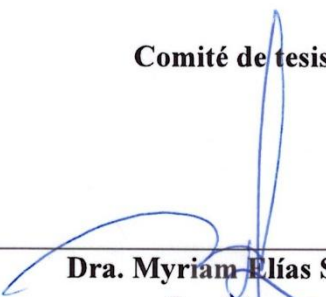
GABRIELA FERNÁNDEZ PEÑA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA**

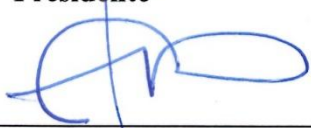
2026

Diseño y evaluación de nuevos formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*.

Comité de tesis:



Dra. Myriam Elías Santos
Presidente



Dr. Luis Jesús Galán Wong
Secretario



Dra. Isela Quintero Zapata
Vocal



Dr. Humberto Quiroz Martínez
Vocal



Dra. Violeta Ariadna Rodríguez Castro
Vocal



Dra. Katushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

Diseño y evaluación de nuevos formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*.

Dirección de tesis:

Dirección de tesis:



Dra. Myriam Elías Santos
Director



Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Co - Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a **Dios**, porque siempre ha estado conmigo y en su nombre doy gracias por todas las bendiciones que me ha otorgado en la vida.

Al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)** por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la **Dra. Myriam Elías Santos**, por aceptar ser mi nueva Directora de Tesis, así como guiarme y acompañarme en este proceso tan importante para mi formación académica.

A la **Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco**, por permitirme nuevamente el aprovechamiento de una gran oportunidad de superación académica, ya que este proyecto de investigación culminó gracias a su amplia experiencia, profesionalismo, dedicación, confianza y paciencia para dirigirlo. Le agradezco infinitamente que me haya guiado a lo largo de todo este tiempo y por ser parte de mi formación académica profesional.

Al **Dr. Hugo Alberto Luna Olvera** actual Coordinador del Programa de Doctorado en Ciencias con orientación en Biotecnología y al **Dr. Luis Jesús Galán Wong**, Coordinador del Instituto de Biotecnología, gracias por su dedicación y pasión por la enseñanza.

Al comité de tesis, **Dra. Isela Quintero Zapata**, **Dr. Humberto Quiroz Martínez** y a la **Dra. Violeta Ariadna Rodríguez Castro**, muchas gracias por sus atenciones, consejos, clases, enseñanzas y colaboración.

A la **Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos**, Excoordinadora del Programa de Doctorado en Biotecnología, por todas sus recomendaciones, amabilidad y siempre estar al pendiente en todo momento.

A todo el personal del **Instituto de Biotecnología**, en especial al Laboratorio L3, **Dra. Ma. Del Socorro Flores González**, Ex jefa del Lab-3, a la **Técnica Teresa Pérez Burgos**, **M en C. Dinora Pérez** y la **Dra. Adriana Obregón**, así como al área de cría de insectos al **señor Feliciano Molina** y al **Técnico Luis Hebert Estrada**.

A todo el personal de la Subdirección de Posgrado, especialmente agradecer a la **Dra. Katiushka Arévalo Niño**, actual Directora de dicha Subdirección.

A todos los profesores con los que tuve el gran honor de recibir clase y prácticas, durante el transcurso del plan de estudios del Doctorado en Biotecnología con Orientación en Biotecnología.

A todas las áreas de la **Facultad de Ciencias Biológicas**, principalmente al personal Administrativo, de Servicios Escolares, Bibliotecas, pero especialmente a la actual Coordinadora de la Facultad, la **Dra. Diana Reséndez Pérez**.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, por ser mi alma mater.

Al Ecólogo, Jefe del Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas Unidad B, **M en C. Manuel Torres Morales †**, por apoyarnos con el uso de las instalaciones del departamento y brindarnos un espacio para llevar a cabo el bioensayo de campo, y al **LCA. Abraham Ortiz** por su colaboración en el mismo.

A la **Dra. Graciela García Díaz †** por su amistad y confianza.

A mis **amigos y compañeros** más cercanos del Instituto y del resto de los otros programas de doctorado que ofrece la Facultad de Ciencias Biológicas, que de alguna manera coincidimos en clases, seminarios, congresos, fiestas, reuniones y eventos. Gracias por amenizar mi vida.

A mi familia, pero sobre todo a mi madre **María Elena Peña Treviño**.

A todos ustedes... Gracias totales.

DEDICATORIA

A mis padres, María Elena Peña Treviño y Francisco Fernández Pérez †, quienes me dieron la vida, un hogar, una familia, amor, valores, educación, apoyo y consejos.

A mis hermanos Rosa Elena, Francisco y Elizabeth, así como a sus propias familias, mis cuñados Martha Gutiérrez y Arturo Reyes, y todos mis sobrinos, Estefanía, Paola, Ángela, Arely y Arturito

A mis compañeros de estudio y a mis maestros, quienes sin su ayuda nunca hubiera podido concluir este trabajo, en especial a quien fue mi primera Directora de tesis, la Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco, a quien le tengo un gran aprecio y admiración, y por su puesto a mi actual Directora de tesis, la Dra. Myriam Elías Santos, quien fue para mí una luz y esperanza en este proceso.

A mis amigos-hermanos por elección, José Fernando Ornelas, Mario A. Roque, Milca Miranda, Diana Castañeda, Isaac Valtier y Karenny Almaguer.

Más recientemente, a la Unidad de Planeación y Seguimiento del FIDEURB del Gobierno del Estado de Nuevo León, donde me han permitido consolidar mi desarrollo profesional, pero sobre todo al Titular del área, el Dr. Mauricio de Jesús Robles Montiel, quien más que un jefe, ha representado una gran figura de liderazgo en mi vida y un ejemplo a seguir, gracias por su confianza y apoyo, así como también a mis compañeros de trabajo con quienes he desarrollado una bonita amistad.

También, a mi grandiosa excompañera, amiga y excelente colega la Licenciada en Nutrición Cynthia Carolina Torres Zúñiga, a quien le tengo gran aprecio y cariño.

Y también dedico indudablemente este trabajo a Dios, quien siempre ha sido el autor de mi vida y mi destino, y además quien siempre me ha demostrado su genuino amor y apoyo en todo momento, sobre todo en tiempos difíciles.

ÍNDICE GENERAL

DIRECCIÓN DE TESIS:	III
DERECHOS RESERVADOS©	IV
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VII
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ANEXOS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
RESUMEN	XIX
ABSTRACT	XX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES (ETV) ALREDEDOR DEL MUNDO.	5
2.1.1 Distribución geográfica de Dengue, Chikungunya y Zika.	6
2.1.2 Dengue	7
2.1.3 Chikungunya	10
2.1.4 Zika	12
2.2 EL MOSQUITO Aedes aegypti	14
2.2.1 Características generales y su distribución.....	14
2.2.2 Ciclo de vida	15
2.2.3 Morfología e identificación del Vector	17
2.3 ESTRATEGIAS E INNOVACIONES PARA EL CONTROL DE VECTORES	20
2.3.1 Inicios y su regulación.	21
2.3.2 Medidas de Control	24
2.3.3 Otras estrategias: Esterilización (SIT) y Radiación, Incompatibilidad (IIT), OGM, Vacunas, Reguladores del crecimiento de insectos (IGR), Trampas de sonido.	33

2.4	USO DE BTI COMO CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Aedes aegypti</i>	36
2.4.1	Resistencia	38
2.5	BACTERIA <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	39
2.5.1	Mecanismo de acción de las proteínas cry en <i>Aedes aegypti</i>	42
2.5.2	Factores que afectan la actividad de la δ -endotoxina	44
2.5.3	Medios de cultivo para la producción de Bti	47
2.6	TIPOS DE FORMULACIONES	54
2.7	BIOINSECTICIDAS MÁS UTILIZADOS	58
3.	JUSTIFICACIÓN	61
4.	HIPÓTESIS	62
5.	OBJETIVOS	63
5.1	OBJETIVO GENERAL	63
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	64
6.1	CEPA	64
6.2	MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA	64
6.3	MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL	64
6.4	CONDICIONES DE FERMENTACIÓN	65
6.5	INÓCULO	65
6.6	OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL	66
6.7	ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LA CRÍA DE <i>Aedes aegypti</i>	66
6.8	EVALUACIÓN DEL BIOINSECTICIDA DE BTI PRODUCIDO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	68
6.9	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL ₅₀)	68
6.10	FORMULACIÓN DEL BIOINSECTICIDA	70
6.10.1	Tabletas	70
6.10.2	Granulados	71
6.11	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA RESIDUAL EN LABORATORIO DE LOS FORMULADOS PREPARADOS	72
6.12	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO Y	

FORMULADOS.....	74
6.13 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ALMACENAMIENTO EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS FORMULADOS DE BTI (TABLETAS Y GRANULADOS).	75
6.14 PRUEBAS DE CAMPO DE LOS FORMULADOS SELECCIONADOS.....	75
6.14.1 Preparación de los tratamientos.	75
6.14.2 Sitio y fecha de los experimentos en campo.	76
6.14.3 Colonización de los contenedores plásticos.	76
6.14.4 Diseño Experimental.	77
6.14.5 Muestreo.....	77
6.14.6 Medición de la actividad tóxica de sedimentos.....	77
6.14.7 Registro de factores ambientales.	78
7. RESULTADOS.....	79
7.1 RENDIMIENTO DEL COMPLEJO INSECTICIDA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.	79
7.2 EVALUACIÓN DEL BIOINSECTICIDA DE BTI 225 PRODUCIDO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.	79
7.3 DETERMINACIÓN DE LA CL50.....	80
7.4 FORMULADOS BIOINSECTICIDAS OBTENIDOS.....	81
7.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA RESIDUAL DE LOS FORMULADOS GRANULARES Y EN TABLETA CON BASE EN BTI CONTRA LARVAS DE <i>Aedes Aegypti</i> EN LABORATORIO.	82
7.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE IRRADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LAS FORMULACIONES GRANULARES Y EN TABLETA CON BASE EN Bti CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADÍO DE <i>Aedes aegypti</i> A NIVEL DE LABORATORIO.....	86
7.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ALMACENAMIENTO EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS FORMULADOS DE Bti (TABLETAS Y GRANULADOS).	86
7.8 EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES GRANULARES Y EN TABLETA MÁS EFECTIVAS EN PRUEBAS DE SEMICAMPO CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADÍO DE <i>Aedes aegypti</i>.	87
7.8.1 Factores ambientales	91
8. DISCUSIONES.....	93
9. CONCLUSIONES	100
10. PERSPECTIVAS.....	102
11. REFERENCIAS CITADAS.....	104
12. ANEXOS	120

13.	RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	145
14.	TRABAJOS Y EXPOSICIONES.....	146
14.1	CONSTANCIAS.....	147
14.2	PATENTE	153
14.3	ARTÍCULO	171

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1	Organofosfatos, hidrocarburos clorados, piretrinas, aceites y otros larvicidas que no se utilizan más en los Estados Unidos.	23
Tabla 2	Resumen de investigaciones clave sobre el efecto de los factores ambientales en la actividad de las bacterias entomopatógenas.	46
Tabla 3	Substratos naturales recomendados en el diseño de medios de cultivo para la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	52
Tabla 4	Composición de los medios de cultivo utilizados para la producción del extracto insecticida de Bti 225 por fermentación.	65
Tabla 5	Ingredientes de formulados de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> preparados como tableta.	71
Tabla 6	Ingredientes de formulados granulares de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> elaborados. (Porcentaje en peso).	72
Tabla 7	Tratamientos utilizados en la determinación de la actividad tóxica residual.	74
Tabla 8	Tratamientos utilizados en la determinación de la actividad tóxica residual a nivel semicampo.	77
Tabla 9	Comparación de los porcentajes de mortalidad presentados de los extractos insecticidas de la cepa <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , cultivada en dos medios nuevos solubles (1 y 2) y uno de referencia, contra larvas de tercer estadio tardío de <i>Aedes aegypti</i> , a las 24, 48 y 72 horas post aplicación.	81
Tabla 10	Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> 225 obtenidos en medio de referencia y medio nuevo 1, a las 24 y 48 horas post aplicación.	82
Tabla 11	Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio.	86
Tabla 12	Actividad tóxica comparativa de formulaciones de Bti sin irradiar e irradiados después de 72 h de exposición a luz ultravioleta y probadas contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	87
Tabla 13	Porcentajes de mortalidad presentados por 3 formulaciones granulares e ingrediente activo sin formular, de la cepa de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , almacenados a temperatura ambiente (23-25 °C) durante varios días, contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> a nivel laboratorio.	88
Tabla 14	Porcentajes de mortalidad presentados por 4 formulaciones en tabletas e ingrediente activo sin formular, de la cepa de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , almacenados a temperatura ambiente (23-25 °C) durante varios días, contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> a nivel laboratorio.	88
Tabla 15	Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> en semicampo.	91

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Eclosión de huevecillos, primeros estadios larvales.	68
Figura 2	Estadio de pupa en cámara de emergencia y estadio de mosquito adulto.	68
Figura 3	Jaula con cría del mosquito adulto <i>Aedes aegypti</i> y charola con papeleta para la oviposición.	68
Figura 4	Alimentación del mosquito adulto hembra.	68
Figura 5	Una de las repeticiones del bioensayo para la determinación de la CL ₅₀	70
Figura 6	Producción de las formulaciones en forma de tableta por medio de una prensa manual.	71
Figura 7	Esquema de la composición de las formulaciones granulares donde se muestra el amaranto como material acarreador y flotante siendo recubierto por capas del ingrediente activo, los polímeros y el fotoprotector.	73
Figura 8	Rendimiento promedio en gramos por litro (g/l) del complejo espora-cristal de Bti 225 obtenido en los 3 medios.	80
Figura 9	Formulados en forma de tableta y formulados granulares con diferentes concentraciones de ingrediente activo con base en <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> y otros ingredientes diversos como polímeros, adyuvantes y fotoprotectores.	83
Figura 10	Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio.	85
Figura 11	Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> en campo.	90
Figura 12	Medición de factores ambientales (Temperatura y pH del agua de los recipientes y la luz, durante el día y durante la tarde).	93

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo I Distribución geográfica global del Dengue.	120
Anexo II Distribución geográfica global del Chikungunya.	121
Anexo III Distribución geográfica global del Zika.	122
Anexo IV Distribución global del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	123
Anexo V Tamaño de un huevecillo de <i>Aedes aegypti</i> y su eclosión	124
Anexo VI Huevo de <i>Aedes aegypti</i> observado al microscopio estereoscópico	124
Anexo VII Pupa de <i>Ae. Aegypti</i> , observada en el microscopio estereoscópico	124
Anexo VIII Emergencia del adulto de <i>Aedes aegypti</i> .	124
Anexo IX Diagrama de la larva de <i>Aedes aegypti</i>	125
Anexo X Ciclo Biológico de <i>Aedes aegypti</i> .	126
Anexo XI Izquierda: Adulto macho de <i>Aedes aegypti</i> ; Derecha: Hembra de <i>Aedes aegypti</i>	127
Anexo XII Sección ultraestructurada de una célula esporulada de <i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i> (A) y de un cuerpo de inclusión purificado (B).	127
Anexo XIII Modelo del modo de acción de la toxina Bti Cry en el intestino medio del insecto.	128
Anexo XIV Los diferentes tipos de adyuvantes/ aditivos usados en formulaciones microbianas.	129
Anexo XV Formulaciones actualmente disponibles en el mercado europeo y estadounidense, su respectiva potencia, dosis de aplicación y usos principales	131
Anexo XVI Ejemplos del uso de formulaciones de Bti para el control de larvas de mosquitos en varios hábitats.	134
Anexo XVII Mililitros de rendimientos obtenidos a partir de las fermentaciones en los tres medios de cultivo utilizados [Medio 1, Medio 2 y Medio de Referencia]	137
Anexo XVIII Gramos de extracto insecticida de Bti obtenidos a partir de la coprecipitación con lactosa y acetona de las fermentaciones obtenidas con los tres medios de cultivo utilizados [Medio 1, Medio 2 y Medio de Referencia]	138
Anexo XIX Porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos preliminares de los extractos insecticidas de Bti obtenidos a partir los tres medios de cultivo utilizados [Medio 1, Medio 2 y Medio de Referencia] a concentración de 0.05 y 0.5 mg/l a las 24, 48 y 72 horas postaplicación.	139
Anexo XX Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> obtenidos en medio de referencia, a las 24 horas post aplicación.	140
Anexo XXI Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de	141

	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> obtenidos en el medio nuevo 1, a las 24 horas post aplicación.	
Anexo XXII	Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> obtenidos en medio de referencia, a las 48 horas post aplicación.	142
Anexo XXIII	Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> obtenidos en medio nuevo 1, a las 48 horas post aplicación.	143
Anexo XXIV	Lecturas de la actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio.	144

LISTA DE ABREVIATURAS

+EE	Exponente
>	mayor que
±	más menos
≤	mayor o igual que
®	marca registrada
°	grados
a.C.	antes de cristo
acre	medida agraria
ADN	Ácido desoxiribonucleico
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
AI	siglas en inglés, ingrediente activo
ANOVA	Análisis de Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
<i>B. sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
BIOTICOM	siglas en portugués, Industria Biotecnológica y comercio Ltda
BR	del inglés, Briqueta
br	briqueta
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CDC	siglas en inglés, Centers for Disease Control and Prevention
CFW	desechos de plumas de pollo
CHIKV	Serotipo del virus del Chikungunya
CL ₅₀	Concentración Letal Media
CL ₉₀	Concentración letal 90
cm	centímetros
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua, Servicio Meteorológico Nacional
CONAVE	Comité Nacional para la vigilancia epidemiológica
CS	Suspensión de cápsulas
δ	delta, letra griega
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DENV-1	Serotipo del virus del Dengue
DENV-2	Serotipo del virus del Dengue
DENV-3	Serotipo del virus del Dengue
DENV-4	Serotipo del virus del Dengue
DGMQ	siglas en inglés, Division of Global Migration and Quarantine
DMS	en estadística, Diferencia mínima significativa
DRB	siglas en inglés, salvado de arroz desaceitado
DV	virus del Dengue
DVBD	siglas en inglés, Division of Vector-Borne Diseases
ECSA	siglas en inglés, East / Central / South African Genotype
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ETV	enfermedades transmitidas por vectores

FHD	Fiebre hemorrágica de Dengue
FIFRA	Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas
ft ²	del inglés, pies cuadrados
g.l.	en estadística, grados de libertad
g/l	gramos por litro
GMT	reporte CONAGUA, Hora Del Meridiano De Greenwich
GR	gránulos
GR	del inglés, Granulado
h	horas
H14	serotipo de Bti
hPa	reporte CONAGUA, unidad de medida de presión atmosférica en pascales
IAV	Información Arancelaria Vinculante
IC	en estadística, intervalo de confianza
ICP	proteínas insecticidas cristalinas parasporales
IGR	reguladores del crecimiento de insectos
IIT	técnica de insectos incompatibles irradiados y transgénicos
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
IMM	siglas en inglés, integrated mosquito management
IPM	siglas en inglés, integrated pest management
ITU/mg	siglas en inglés, unidades tóxicas internacionales por miligramo
Kg/Ha	Kilogramos por hectárea
km	kilómetros
km/h	Kilómetros por hora
Km ²	Kilómetros cuadrados
L/Ha	Litros por hectárea
lb	del inglés, libra
lbs	del inglés, libras
LRM	Líquido del remojo del maíz
mg	miligramos
mg	miligramos
mg/l	miligramos por litro
ml	mililitro
μl	microlitros
mm	milímetros
n	tamaño de la muestra, número de sujetos
nc	no comunicado
NCEZID	siglas en inglés, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases
NE	reporte CONAGUA, Noreste
ng	nanogramos
nm	nanómetros
NO	reporte CONAGUA, Noroeste
NYSM	siglas en inglés, medio nutritivo convencional con sales de extracto de levadura
°C	grados celsius
OGM	organismos genéticamente modificados
OMS	Organización Mundial de la Salud

OMWM	siglas en inglés, open marsh water management
OP	siglas en inglés, larvicidas organofosforados
oz	onzas
p	valor p, probabilidad de que un valor estadístico calculado sea posible dada una hipótesis nula cierta
p/p	peso/peso
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PESP	Pesticide Environmental Stewardship program
pH	Potencial Hidrógeno
pouch	del inglés, envase, bolsa, paquete
ppm	partes por millón
pts	pints, siglas en inglés, pintas
RIM	siglas en inglés, rotational impoundment management
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
s.d.	siglas en inglés, desviación estándar
SCD	Síndrome de choque por Dengue
SCD	Tipos de formulaciones, del inglés, Concentrado en suspensión
SE	reporte CONAGUA, Sureste
serovar.	serovariedad
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SIT	técnicas de insectos estériles
SO	reporte CONAGUA, Suroeste
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica
T	Tableta
t	en estadística, distribución de Student
tab	Tableta
TB	del inglés, Tableta
TP	siglas en inglés, polvo técnico
™	marca de comercio
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UI	Unidades Internacionales
ULV	siglas en inglés, Concentrado fluido de volumen ultra bajo
UTI	Unidad Tóxica Infectiva
UV	Ultravioleta
var.	variedad
VM	virus Mayaro
WG	del inglés, Granulado dispersable en agua
X ²	Chi cuadrada
ZIKV	Serotipo del virus del Zika
λ	lambda, letra griega
σ	sigma, letra griega
β	Beta, letra griega

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* constituye el vector principal del dengue y de otras enfermedades virales como el Chikungunya y Zika. El control del vector es una de las principales maneras de disminuir los niveles de transmisión. Dentro de los agentes de control biológico destaca *Bacillus thuringiensis israelensis* quien ha demostrado ampliamente su efectividad y seguridad ambiental, especificidad y bajas expectativas de desarrollo de resistencia. El objetivo de este trabajo fue la producción, diseño y evaluación de formulados bioinsecticidas con base en *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) contra larvas de *Aedes aegypti*. Se realizó la producción de bioinsecticida de Bti cepa 225 en dos nuevos medios de cultivo solubles con base en (1) jarabe de maíz, sólidos de remojo del maíz y extracto de levadura; (2) con harina de semilla de girasol y sacarosa, así como uno de referencia (3) con harina de soya, sólidos de remojo del maíz, melaza y sales minerales. Se recuperaron los extractos insecticidas mediante la coprecipitación con lactosa y acetona de cada uno de los medios. El mayor rendimiento promedio fue de 18.9 g/l en el medio de referencia, sin embargo, este extracto resultó menos tóxico que el obtenido en el nuevo medio soluble 1, que mostró la menor CL50 contra larvas de *Aedes aegypti*, de 0.4712 mg/l a las 48 horas postaplicación. Se diseñaron dos tipos de formulaciones, granulares y tabletas, incluyendo polímeros de lenta y rápida liberación, así como también fotoprotector, y se probaron contra larvas de *Aedes aegypti*, en laboratorio. En esta prueba, los formulados granulados resultaron más efectivos que las tabletas donde se observó que mostraron 90-100% de mortalidad en los primeros tres días postaplicación, en tanto que las tabletas presentaron menos de 60% de mortalidad; después de 14 días de exposición, los granulados 2 y 3 mostraron > 40% de mortalidad, mientras que las tabletas presentaron 2-20% de mortalidad y el ingrediente activo sin formular 22%. Se observó también que los formulados granulados irradiados con luz UV presentaron porcentajes de reducción del 6 al 11%, mientras que las tabletas mostraron reducciones de 5-12%, en comparación con el extracto sin formular que presentó 32% de reducción. En pruebas de semicampo, la tableta 2, aunque presentó menores porcentajes de mortalidad que el formulado granular 3 durante los primeros tres días postaplicación conservó mayor actividad tóxica que el formulado granular 3, a los días 7 y 10 en condiciones de semicampo. Sin embargo, todos los formulados perdieron su actividad tóxica en 10 días postaplicación.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of dengue and other viral diseases such as Chikungunya and Zika. Vector control is one of the main ways to decrease transmission levels. Within the biological control agents, *Bacillus thuringiensis israelensis* stands out, which has widely demonstrated its effectiveness and environmental safety, specificity and low expectations of resistance development. Therefore, the objective of this work was the production, design and evaluation of bioinsecticide formulations based on *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) against *Aedes aegypti* larvae. The production of Bti strain 225 bioinsecticide was carried out in two new soluble culture media based on (1) corn syrup, corn steeping solids and yeast extract; (2) with sunflower seed meal and sucrose, as well as a reference medium (3) with soybean meal, corn steeping solids, molasses and mineral salts. The insecticide extracts were recovered through the coprecipitation with lactose and acetone of each one culture media. The highest average yield was 18.9 g/l in the reference medium, however, this extract was less toxic than that obtained in the new soluble medium 1, which showed the lowest LC₅₀ against *Aedes aegypti* larvae of 0.4712 mg/l at 48 hours post-application. Two types of formulations, granular and tablets, were designed including slow and rapid release polymers, as well as photoprotectant and tested against *Aedes aegypti* larvae in the laboratory. In this test, granulated formulations were more effective than the tablets where it was observed that these showed 90-100% mortality on the first three days after application while the tablets presented less than 60% mortality; after 14 days of exposure, the granulates 2 and 3 showed > 40% mortality, whereas than tablets presented 2-20% mortality and the active ingredient unformulated was 22%. It was observed also that the formulations irradiated with UV light presented reduction percentages from 6-11%, whereas the tablets showed reductions of 5-12% in comparison with the unformulated extract that presented 32% reduction. In semi-field tests, tablet 2, although it presented lower mortality percentages than granular formulation 3 during the first three days post-application, retained higher toxic activity than the granular formulation 3, on days 7 and 10 posttreatment in semifield conditions. However, all formulations lost their toxic activity for 10 days post application.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los mosquitos de la familia Culicidae, subfamilias Culicinae y Anophelinae en su estadio adulto son los causantes de transmitir enfermedades a los humanos con consecuencias graves. Estas incluyen malaria, filariasis, fiebre amarilla, encefalitis y las que han ido en aumento en el país y sobre todo en la región, Dengue, Chikungunya, y Zika, virus que han reemergido y su origen proviene del medio oriente, además también perjudican a más de 3000 millones de seres humanos en países tropicales y subtropicales. Los virus Chikungunya y Zika son los que recientemente también ha puesto en alerta las autoridades de salud. Incluso ya se reportan casos del virus Mayaro en América del Sur donde se ha aislados a partir de seres humanos, vertebrados de origen salvaje y mosquitos en la región brasileña del Amazonas donde el virus es endémico, además de Colombia, Bolivia, Guyana Francesa, Guyana, Perú y Surinam, de manera adicional se ha constatado su prevalencia en otras regiones del continente mediante estudios serológicos que buscan la presencia de anticuerpos en Guatemala, Costa Rica, y Panamá (Zúñiga Carrasco et al. 2017). En México, *Aedes aegypti* es el mosquito que actúa como el responsable primario de la transmisión de Dengue, el contagio de esta enfermedad comienza con la exposición a la picadura del mosquito hembra, última fase de su ciclo de vida, es decir, el adulto aéreo, siendo el más difícil de controlar. Sin embargo, previo a esta metamorfosis, su ciclo vital inicia como huevecillo, que es muy resistente incluso a la desecación pero que requiere estrictamente un ambiente acuático para lograr eclosionar y así pasar a la fase larval, de cuatro estadíos, y posteriormente a la fase de pupa. La larva tiene un comportamiento intenso en su alimentación la cual obtiene en el agua, incluso ha desarrollado gran capacidad de adaptación a superficies y cuerpos de agua estancada, dulce o salobre. No obstante, es en las fases acuáticas donde ésta especie es más vulnerable y susceptible. Debido a que el hábitat para la distribución de *Aedes aegypti* es cada vez más favorable, lo convierte en un vector cosmopolita lo que conlleva a que fácilmente ocurra un contagio inmensurable de la enfermedad en numerosas regiones y localidades, impactando gravemente en el sector salud y por lo tanto en la economía del país. Ante la falta de plataformas vacunales para estimular la prevención de estas enfermedades de

origen vírico, el manejo ha sido abordado desde una estrategia basada en el control del vector, convirtiéndose en uno de los elementos esenciales en lo que se relaciona a los programas de las enfermedades transmitidas por vectores. Una de las actividades enfocadas en la disminución del riesgo de contraer la infección y bajar el número de casos positivos, se basa en disminuir la población de mosquitos en su estadio larval. Desde los años de 1940 el manejo de *Ae. aegypti* ha fincado sus esfuerzos en el uso de compuestos organofosforados y organoclorados (Nicolas, 1992). El uso de estos insecticidas, llamados de segunda generación, han resultado perjudiciales ya que provocan toxicidad para organismos no blanco, que pudieran ser otras especies de enemigos naturales de éstos vectores (Nicolas, et al 1996), así como también acumulación en el ambiente, lo que ha ocasionado un elevado nivel de contaminación y pérdida del equilibrio ecológico debido a sus características como compuestos recalcitrantes, aumentando la resistencia en los insectos diana (OMS 1986 a,b,c; OMS 1987a). Uno de los ejemplos ampliamente documentados del tema corresponde al DDT (Fleming 1986), que en 1939 fue inicialmente el insecticida organoclorado más utilizado y que para 1946 ya se habían documentado los primeros casos de resistencia este compuesto. El uso de Temephos también conocido como Abate ha tenido buenos resultados como controlador de larvas, sin embargo, desde hace varios años se conoce que han generado resistencia (Minsa 1998). Aunque actualmente se están desarrollando diversas vacunas contra el dengue, aun no se tiene una fecha específica de su disponibilidad (Porter 1996; Marshall 1992), así como la experimentación para liberar mosquitos modificados a través de ingeniería genética con la finalidad que al reproducirse su descendencia no prospere a la fase adulta y se trunque su ciclo reproductivo. Este proyecto tiene el respaldo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se evaluó en la región brasileña de Piracicaba y en las Islas Caimán. Además, esta misma organización menciona otras metodologías como la liberación masiva de mosquitos macho estériles a través de dosis bajas de radiación y el empleo de mosquitos infectados con una bacteria llamada *Wolbachia* que es inocua en humanos y que tiene la capacidad de dañar los huevos que ovipositan las hembras del mosquito macho previamente expuesto a esta bacteria. Esta estrategia para la OMS tiene futuro ya que ha mostrado eficiencia para combatir la transmisión del virus del dengue, sin embargo, diversas organizaciones relacionadas con la ecología han mostrado preocupación acerca

de las implicaciones de lo que desaparecer o erradicar a los mosquitos tendrían para la biodiversidad. El manejo de vectores se ha sostenido y mejorado debido al uso de plaguicidas de origen químico y al manejo ambiental, sin embargo, se ha estimado que las posibilidades efectivas para el manejo están dirigidas en la actualidad al mosquito como vector, mediante la restricción del aumento de su población a través de eliminar lugares de alimentación y donde pueden desarrollar su ciclo de vida, o a través de evitar el crecimiento de los estadios larvarios utilizando insecticidas de origen biológico es por esta razón que la OMS ha encaminado sus esfuerzos en encontrar diferentes estrategias para el manejo, donde se distingue el uso del control biológico que utiliza de forma directa o indirecta enemigos naturales, patógenos o depredadores de las plagas, es decir utilizar un organismo para controlar las actividades del otro. Uno de los agentes de control biológico con mayor relevancia es *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), un bacilo con actividad entomopatógena que ha demostrado buenos resultados (Nicolas 1992; Porter 1996), que de la mano de su efectividad cuenta con enormes beneficios como ser amigable con el ambiente, es específico, tiene pocas posibilidades de desarrollar resistencia, además que es relativamente sencillo escalar su producción, además de presentar estabilidad cuando se almacena y una vida media larga (Su y Mulla 1999). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) es una bacteria Gram positiva con metabolismo aeróbico y capacidad de formar esporas, además de tener la capacidad de producir toxinas denominadas δ -endotoxinas que tienen la característica de ser específicas y que se unen en forma de cristal, se sabe que estos cristales poseen actividad toxica contra larvas de mosquitos ya que una vez que se ingieren por las larvas ocurren una serie de eventos que causan una detención del epitelio del intestino, ruptura de las microvellosidades, cambios en los organelos del citoplasma y el deceso al final de la larva (Federici 1982).

Respecto a los productos elaborados a base de *B. thuringiensis israelensis* (Bti), se considera que son altamente seguros, pues no se han documentado efectos adversos en abejas, vertebrados o en seres humanos, lo cual significa que Bti funciona como un agente larvicida eficaz y considerablemente seguro para el personal de salud, habitantes de casas habitación donde se aplica y también para animales domésticos (Galán 1996). Respecto a su producción, la metodología es variada, por ejemplo, las esporas se pueden formular a manera de polvo humectable, gránulos o concentrados suspendibles que se pueden aplicar

en diversidad de ambientes incluyendo en cultivos a campo abierto o en áreas urbanas para el control de plagas de dípteros como moscas y mosquitos. Existen diferentes marcas que utilizan a Bti como su ingrediente activo, entre ellas se encuentran Skeetal®, Teknar®, Vectobac® y Vectocide® Aquabac®, Bactimos®, y Gnatrol® (EPA 1999), sin embargo, se debe considerar que los costos para elaborar un bioinsecticida pueden ser algo elevados, ya que se requiere de personal con entrenamiento específico para su producción aplicación, monitoreo y vigilancia, lo cual puede disminuir su empleo en países en vías de desarrollo y ,que en contraste, son los que más requieren de estas alternativas de manejo sustentable.

Con la finalidad de contribuir en el conocimiento de la producción de un bioinsecticida este trabajo tuvo como objetivo producir un bioinsecticida basado en *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en diferentes medios de cultivo de bajo costo y de alta disponibilidad, mediante la obtención de esporas y cristales con actividad toxica sobre larvas, además de elaborar formulaciones en forma de tabletas y gránulos, así como establecer el efecto de la luz ultravioleta en el almacenaje de las formulaciones, y finalmente evaluar la actividad toxica de estos formulados contra larvas de *Aedes aegypti* en condiciones controladas de laboratorio y a nivel de campo mediante colonización asistida con larvas criadas en laboratorio.

2. ANTECEDENTES

2.1 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES (ETV) ALREDEDOR DEL MUNDO.

Dengue, Chikungunya y Zika son virus que se transmiten por culícidos como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Su hábitat y distribución geográfica se establece en zonas tropicales y subtropicales. Estos virus pueden producir un cuadro clínico muy similar, dificultando el diagnóstico clínico, resultando en problemas para su manejo apropiado e incluso llegando a desencadenar eventos fatales (Álvarez Escobar et al 2018).

Estas arbovirosis han alcanzado altos índices de morbilidad y mortalidad en una situación epidemiológica complicada, causada por diferentes razones; incluyendo la variación de las condiciones ambientales, así como la demografía y factores socioeconómicos que favorecen su presencia (Undurraga et al. 2015).

El bajo énfasis en las campañas de salud para el control del vector, el aumento en el crecimiento demográfico y la urbanización, el aumento de comercio aéreo y la presencia de una infraestructura del sector salud ineficiente en un gran número de naciones ha permitido la proliferación de estas patologías a mayor escala (Kraemer et al 2015).

Sin embargo, para que estas patologías se desarrollen se necesita la presencia de ciertos factores considerados como de y que propician su proliferación. Por ejemplo, diversas investigaciones muestran que hay mayor número de casos femeninos en los contagios de Dengue, debido a que se considera que las mujeres están durante mayor tiempo en casa; otro factor considerado es el color de piel, ya que los individuos con tonos de piel clara son más propensos al contagio. El grado académico de la población también es un factor, pero de manera indirecta, ya que un estilo de vida inadecuado debido a la falta de información también favorece la proliferación del insecto y por tanto las enfermedades virales que transmite (Álvarez Escobar et al 2018).

Sin embargo, otras enfermedades importantes como la malaria, la filariasis y la encefalitis japonesa son otros ejemplos de patologías que se transmiten por medio de un vector en la sociedad humana. Anualmente se estima que 300 millones de personas son afectados por la malaria, transmitida por los mosquitos *Anopheles*, con más de un millón de muertes (Kabilan 1997, Sharma 1998, WER 1999). El número de casos a nivel mundial de la filariasis linfática se estima en 250 millones de personas (Ottesen y Ramachandran, 1995), (Poopathi et al 2003).

México es un país que debido a su orografía y variedad de climas provee condiciones ideales para el hábitat de los mosquitos vectores; sin embargo, debido a la altitud en la que se encuentran ciertas localidades, donde existe esta barrera natural gracias a los sistemas montañosos, no todo el territorio es susceptible de estas enfermedades, ya que el vector subsiste a poco menos de 1,200 msnm. En el territorio habitan más de 120 millones de personas que conforman una población diversa, es decir, personas de escasos recursos, marginada, con problemáticas relacionadas con la equidad y desigualdad, de tal manera que la atención a los problemas causados por las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) implican un gran desafío al sistema de salud y por ende al desarrollo del país (Rodríguez-Domínguez 2009).

2.1.1 Distribución geográfica de Dengue, Chikungunya y Zika.

Las principales arbovirosis causadas por *Ae. aegypti* son el Dengue un *Flavivirus* que incluye cuatro serotipos (DENV 1, 2, 3 y 4), el Chikungunya un *Alfavirus* y el Zika otro *Flavivirus*, los cuales causan enfermedades que se han incrementado en incidencia y distribución geográfica (Álvarez -Escobar et al 2018).

En las últimas cinco décadas, los casos de Dengue han aumentado cerca de treinta veces, con cientos de millones de casos anuales (Bhatt, S., et al 2013). En el año 2004, el Chikungunya se distribuyó de forma activa desde el continente Africano hasta el océano Índico, el continente asiático, Oceanía y el continente Europeo, donde se originaron millones de casos. El Chikungunya llegó al continente americano en el 2013, donde se propagó eficazmente y llegó a causar cerca de 2 millones de personas infectadas (Leparc-Goffart 2014). El Zika comenzó en el continente Africano y se diseminó hacia las islas del

Pacífico y el sudeste asiático, llegando a América donde se ha extendido velozmente (Yasri et al 2015). Debido a que el principal mosquito vector en las zonas urbanas el cual transmite estos arbovirus es *Aedes aegypti*, se ha llegado a concebir la posibilidad real, de que actualmente existe la coexistencia de 6 seis virus diferentes circulando de manera simultánea, tanto en *Ae. aegypti* como en seres humanos que viven en las zonas urbanas de regiones tropicales (Velandia et al 2011; Álvarez Escobar et al 2018).

Otro parámetro relevante se refiere al aumento de temperaturas (tasadas en 1.4-5.8°C, durante el período de 1990 al 2010), las cuales están directamente relacionadas con la aparición de fenómenos climáticos como huracanes y/o ciclones tropicales, o por el contrario con largos periodos de sequía. Con el aumento de estos fenómenos, las precipitaciones se incrementan de manera exponencial provocando desbordes de ríos e inundaciones de las regiones más marginadas, que pueden conllevar a cambios extremos desde el punto de vista epidemiológico como el aumento de la incidencia del Dengue, el cólera, la malaria, el Chikungunya y el Zika. El cambio climático y las enfermedades reemergentes y las nuevas pueden representar la ecuación perfecta que puede explicar la situación actual en la que se vive (Colón-González 2011). (Anexo I, II y III).

2.1.2 Dengue

El dengue es un virus y sus serotipos se clasifican dentro de la familia *Flaviviridae* y se transmiten a los seres humanos a través de picaduras de *Ae. aegypti*. *Aedes albopictus* es otra especie de mosquito que también puede transmitir el virus. En este sentido, es necesario aumentar el conocimiento y la investigación acerca de la biología del mosquito, como una manera de que la epidemiología pueda ayudar a predecir y explicar las causas de los brotes de Dengue, ya que existen diversas variables epidemiológicas con relación entomológica, que el modelo cuantitativo puede no estar considerando (Fernández-Salas, et al 1995).

Ae. aegypti es un culicido con un comportamiento antropofílico, es decir, muy a la par de los hábitos del ser humano. Solo la hembra es hematófaga, lo que significa que parte importante de su alimentación se basa en sangre, la cual se ve aumentada durante el ciclo gonadotrófico, ya que esencialmente así lo requiere para satisfacer la necesidad de

proteínas para la generación de huevos. Cuando la hembra de *Ae. aegypti* se alimenta tomando el fluido sanguíneo de un ser humano contagiado de Dengue ésta se infecta, y pasados alrededor de 8 a 12 días, es cuando se vuelve infecciosa. A este período se le llama período de incubación extrínseco; sin embargo, ya se ha llegado a documentar la transmisión transovárica, lo que implica que las siguientes generaciones estarán infectadas (Rosen et al 1983).

El Dengue es replicado en las glándulas salivales del adulto hembra de *Aedes aegypti*. La infección por este virus tiene síntomas como temperatura corporal elevada, cefaleas, artralgias, dolor muscular, dolor ocular y malestar corporal en general. El Dengue es una enfermedad autolimitada, pero está documentado que pueden suceder alteraciones de gravedad que se caracterizan por la presencia de hemorragias. Desde el año 1984 se documentaron casos de fiebre hemorrágica en la república mexicana y recientemente se ha detectado un aumento cada año de forma significativa en varios estados del país; tan solo en el año de 1989 se detectaron más de 500 casos de fiebre hemorrágica por dengue. Para el año de 1994, los cuatro serotipos del virus del dengue circulaban en territorio nacional, sin embargo, en el año 1995 se reportó el aislamiento del serotipo tres, el cual no había sido aislado en el continente americano desde hace más de cuatro décadas. (Rodríguez-Domínguez 2009).

En el año 1977, el serotipo 1 se introdujo en Jamaica y se diseminó en todo el Caribe; el avance continental en Venezuela, la Guyana Francesa, y en Colombia, se propagó hacia la zona centroamericana y los primeros contagios en México se presentaron en Chiapas en el año de 1978. La progresión hacia el noreste lo llevó al estado de Nuevo León en 1980. En agosto del año de 1980 también se documentaron los casos iniciales de Dengue en territorio estadounidense, específicamente en el estado de Texas, siendo los primeros desde el año de 1945 (Rodríguez-Domínguez 2009).

El dengue se considera endémico en áreas tropicales y subtropicales, y su presencia depende de la presencia del vector. Las personas que puede ser impactada por el virus comprende alrededor de 2.5 billones en casi 100 naciones. En el año de 1998, 1,200,000 casos de dengue y de la variedad hemorrágica se informaron a la Organización Mundial de la Salud incluyendo 1,500 muertes. Se ha estimado que de forma anual ocurren cerca

de 51 millones de casos y se ha calculado que casi la mitad de las personas en el mundo vive en zonas de alto riesgo. El aumento del Dengue en el continente americano durante casi las últimas tres décadas se debe principalmente al aumento y la dispersión de *Ae. aegypti* (Rodríguez-Domínguez 2009).

México ha sufrido algunos episodios epidémicos importantes por Dengue durante los años ochenta. Entre 1980-1982 se generaron epidemias de Dengue causadas por el serotipo uno, y en el año de 1982 se aislaron los serotipos 2 y 4. De 1983 a 1986 se reportó la presencia de los serotipos 1, 2 y 4, siendo afectados 24 de los 32 estados de la República Mexicana. En el año 1984 se reportaron 8 pacientes con Dengue hemorrágico relacionados con el serotipo cuatro en Yucatán. En años recientes el Dengue en su forma clásica y hemorrágica han tenido una tendencia al alza con el 95% de los casos en doce estados de la República Mexicana. En el año de 1997 se detectó en el país un aumento de Dengue clásico con 52, 561 casos en veintisiete entidades federativas, en 1998 disminuyó hasta 23,267, y para el año de 1999 se reportaron 22,982 casos, llegando a 1,714 en el año 2000, predominantemente en entidades como Oaxaca, Veracruz, Tamaulipas, Morelos, Guerrero, Colima San Luis Potosí Nuevo León, (Rodríguez-Domínguez 2009).

En el año de 1983 se aisló el serotipo dos; en la mitad inicial de los años 90 se relacionó con algunos brotes, pero de manera fundamental se aislaron los serotipos uno y cuatro; en el año de 1995 se documentó los aislamientos iniciales del serotipo tres; en el año 1996 se aisló al serotipo dos en Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Tamaulipas; el serotipo tres se ha relacionado con numerosas epidemias, durante el año de 1996, el serotipo dos se detectó a un brote epidémico en la costa de Chiapas durante los meses de julio y agosto; en el año 2000 se detectaron dos epidemias, uno en el Istmo de Tehuantepec y otro en el sur del estado de Veracruz, también asociados al serotipo dos. La presencia de Dengue hemorrágico se puede atribuir a que no se ha logrado controlar de forma eficiente al vector y que la población ha estado expuesta a varios serotipos del agente (Rodríguez-Domínguez 2009).

Las entidades federativas con más casos de dengue hemorrágico son Veracruz, Tamaulipas, Nuevo León, Morelos, Colima, Sinaloa Tabasco y Yucatán. En el año de

1996, donde los casos lograron la cifra más elevada con 1,452 casos, estos han decrecido hasta 67 casos para el año 2000 (Rodríguez-Domínguez 2009).

La Secretaría de Salud Nacional en su Sistema único de Información (SINAVE, SUIVE) del CONAVE (Comité Nacional para la vigilancia epidemiológica), en su boletín número 36, volumen 35, semana 36, en su fecha de publicación del 10 de septiembre del 2018 menciona que el número de contagios por Dengue sin datos de alarma es de 2, 125; Dengue con datos de alarma son 808 casos y Dengue severo son 279. Mientras que el año 2017 cerró con 4,421 contagios corroborados acumulados de Dengue sin signos graves o alarmantes.

2.1.3 Chikungunya

Durante el año 2014, llegó al continente americano una enfermedad infecciosa, denominada Chikungunya (CHIK) causada por un virus del mismo nombre (Alfaro-Tolosa et al 2015). Esta infección fue descrita hace más de cinco décadas, y no hay reporte de que se hubiera presentado previamente en este continente. Esta enfermedad llegó al final del año 2013 al Caribe, a partir de casos foráneos, y a la presencia de vectores como *Ae. aegypti*, se comenzaron a detectar casos autóctonos (Clouet-Huerta 2014; Morales 2015).

Chikungunya es una patología considerada emergente que se transmite vía culícidos y que desde el año 2004 ha sido la causa de grandes epidemias, provocando considerables tasas de morbilidad. El término Chikungunya procede de un vocablo en un idioma denominado “makonde”, reducido a una tribu al sureste de Tanzania, y que significa “hombre encorvado”, ya que hace referencia a la posición corporal que toman quienes padecen esta enfermedad causada por dolor punzante en las articulaciones. El Chikungunya posee un material genético compuesto de RNA y pertenece a la familia *Togaviridae*. Éste posee tres genotipos (uno del occidente del continente africano, otro del oriente/centro/ sur africano (CHIKV-ECSA) y uno de Asia. El ECSA pudo dar lugar al linaje procedente del océano Índico, causante de los brotes epidémicos en la India y Europa a principios del año 2004 (Uribarren-Berrueta 2015).

Los casos iniciales del Chikungunya en América se documentaron en 2013 en la Isla San Martín y en el año 2014 se reportaron casos de contagio autóctono en la región caribeña, según el boletín de laboratorio y vigilancia al día número 17, septiembre del 2014 que emitió el Subdepartamento Vigilancia de Laboratorio del Instituto de Salud Pública del Gobierno de Chile. Para junio de ese mismo año se confirmaron dos casos en Chile, de los cuales uno era procedente de República Dominicana y el otro de Haití (DIPLAS 2014).

Las naciones de América con más casos confirmados por laboratorio son México, Ecuador y Brasil. En la República Mexicana se detectó el primer contagio en 2014 de un paciente que presentó Chikungunya en el estado de Jalisco, México. Este caso se consideró importado ya que había estado en un evento relacionado con el deporte en el área del Caribe. La distribución a otras entidades federativas y naciones fue rápida con valores de entre el 38 al 63% en las comunidades afectadas. Se sabe que *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son los dos vectores principales, además, *Aedes vigilax* también es un vector eficaz para el Chikungunya. *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* tienen una elevada distribución en América, de esta manera la zona es de alto riesgo para diseminar el virus. El humano se considera como el reservorio principal en los períodos de epidemias y en los interepidémicos, también se ha documentado a varios vertebrados como potenciales reservorios, como otros primates, algunos roedores, aves y pequeños mamíferos (PAHO, 2011; 1: 1-148).

Varios científicos sostenían que la epidemia reciente de Chikungunya fue la primera en el continente americano, una investigación reciente mostró que los brotes de Chikungunya ocurrieron al sur de la Unión Americana en el año 1827, y que la mayoría de los brotes considerados como virus del dengue que se registraron antes del uso de pruebas de laboratorio para confirmarlo, representaban realmente casos que correspondían a Chikungunya (Halstead 2015).

En la República Mexicana, la Secretaría de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema único de Información (SINAVE, SUIVE) del CONAVE (Comité Nacional para la vigilancia epidemiológica) en su boletín número 36, volumen 35, semana 36, en su fecha de

publicación del 10 de septiembre del 2018 menciona que la cantidad de casos con confirmación positiva de la enfermedad por virus Chikungunya es de 20; mientras que el año 2017 cerró con 24 casos confirmados acumulados de Chikungunya.

2.1.4 Zika

La circulación inicial considerada como autóctona del Zika en América fue en el año 2014 en la Isla chilena de Pascua. Desde ese momento, varios países como Brasil, El Salvador, Guatemala, Venezuela, Paraguay, Colombia, Puerto Rico y México, entre otros; han reportado casos de transmisión autóctona (Fauci et al 2016).

La enfermedad por Zika es del tipo emergente ocasionada por este mismo virus, que se transmite a través las actividades alimenticias de mosquitos del género *Aedes* incluyendo *Ae. polynesiensis*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Ae. hensilli*. Este virus pertenece a la familia *Flaviviridae* que posee una cadena de RNA. De este virus se identificaron los linajes asiático y africano. La transmisión puede ser a nivel selvático como urbano y se ha propuesto la probabilidad de que puedan existir reservorios del tipo primate. Algunos investigadores reportan la existencia de anticuerpos contra este virus en cebras, elefantes, orangutanes y roedores (Uribarren-Berrueta 2015).

La patología se identificó en el año de 1947 en un macaco Rhesus que se utilizaba para la supervisión de la fiebre amarilla en el bosque de Zika ubicado en Uganda. En el año de 1968 se aisló por primera vez en humanos en Nigeria (Hayes 2009; Landeta 2016), y del año 1951 al año de 1981 se informaron casos en trece naciones africanas y asiáticas. Cuando sucedieron los brotes epidémicos de Zika en la Polinesia durante el año 2013 el gobierno de Chile comenzó con la observación en Islas del Pacífico Sur y documentó en el año 2014 el contagio inicial y nativo de Chikungunya en el continente americano, ubicado en la Isla de Pascua. Durante el año 2015, el estado brasileño comunicó que existían contagios nativos del Zika en dieciocho estados y tres muertes como resultado. Adicionalmente se detectó en El Salvador, Colombia, Guatemala, Surinam, Paraguay y Venezuela. En la República Mexicana en noviembre del año 2015 se reportaron dos contagios nativos por Zika, uno en la ciudad de Monterrey Nuevo León y el otro contagio en Chiapas, ambos casos se caracterizaron por temperatura corporal elevada, erupciones

en la piel y conjuntivitis. Ninguno de los enfermos tenía reporte de haber visitado regiones donde hay una gran cantidad de contagios ni tampoco relación con casos confirmados de Zika. También se ha estimado que cuatro de cada cinco pacientes son asintomáticos (Arredondo-García et al 2016).

El Zika está relacionado con microencefalia y afectaciones del sistema nervioso, ya que se reportó un incremento reciente en la presencia de esta condición en el estado brasileño específicamente en la zona en donde se reportaron los brotes epidémicos por el Zika, lo cual ha determinado que se considere que existe una alta relación entre ellos, ya que se ha logrado aislar el Zika en la amniocentesis de femeninas en etapa gestacional cuyos productos tenían una reducción de la circunferencia del cráneo y otras anomalías en el cerebro, además se ha reportado RNA del virus en la placenta y en el cerebro de niños con disminución del tamaño del perímetro cefálico y abortos de personas contagiadas durante la gestación. Brasil se ha reportado como la nación más afectada por las consecuencias derivadas por Zika con casi cuatro mil neonatos que nacieron con microcefalia. Además, se ha documentado otros tipos de transmisión como la que se da por contacto sexual, por sangre, por contacto en el laboratorio y el aislamiento del virus del semen de diversos pacientes (Ioos et al 2014).

En México, la Secretaría de Salud a través de la Dirección general de Epidemiología, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema único de Información (SINAVE, SUIVE) del CONAVE (Comité Nacional para la vigilancia epidemiológica) en su boletín número 36, volumen 35, semana 36, en su fecha de publicación del 10 de septiembre del 2018 menciona que la cantidad de contagios reportados de infección por virus Zika es de 205; mientras que el año 2017 cerró con 1, 282 casos confirmados acumulados de Zika.

También, en este boletín se reportan cero casos de la Fiebre del Oeste del Nilo, sin embargo, ya consideran el número de casos de paludismo, siendo 511 casos en lo que va del año por *P. vivax* a diferencia del año 2017 que cerró con 453 casos confirmados acumulados. Mientras que para *P. falciparum* no se reportan casos desde el año pasado.

2.2 EL MOSQUITO *Aedes aegypti*

Aedes aegypti se considera originario de Etiopía, este es un culícido de origen selvático de coloración oscuro y tamaño pequeño. Los dos primeros se encuentran en América, y se piensa que fueron introducidas como larvas presentes en recipientes de agua presentes en las embarcaciones durante la exploración y en la colonización europea (Nelson 1986; Oldstone 2002). A estas especies les tomó mucho tiempo habituarse y distribuirse por la región del Caribe y lograr estabilidad en territorio americano, lo cual fue un éxito debido al aumento de rutas marinas que se magnificó en la región (Gómez-Dantés et al 1994, Zárte-Nahón 2012

2.2.1 Características generales y su distribución.

Aedes aegypti pertenece al orden Diptera específicamente a la familia *Culicidae*. Este mosquito tiene hábitos típicamente domiciliarios y se ha adaptado a las zonas urbanas, cuando se ha ejercido algún tipo de presión sobre sus poblaciones se ha observado su presencia en ámbitos periurbanos y silvestres (Nelson 1986). (Anexo IV).

Los principales sitios donde se puede reproducir la cría de *Aedes* son principalmente artificiales del tipo urbanos incluyendo baldíos, panteones, vertederos de basura, entre otros; también pueden ser de origen doméstico como llantas, jarrones con plantas o flores, botellones, abrevaderos, contenedores de diversos tipos y en desuso, depósitos de agua, estanques, etc. En ciertas condiciones de presión sobre los culícidos, estos pueden colocar sus huevos en sitios como plantas bromelias, plataneras, huecos de los árboles, o en el bambú. Cuando las circunstancias son adecuadas el culícido no se desplaza lejos de los lugares donde oviposita, pero pueden tener una diseminación activa de 1 a 2 kilómetros. La dispersión por medios como autos, tren, bus, embarcaciones, aeronaves, son también factores de diseminación de estos mosquitos y del Dengue entre diversas regiones. *Ae. aegypti* requiere condiciones mínimas para su sobrevivencia y es sumamente resistente a la deshidratación y la falta de alimento, lo hace un culícido que está presente frecuentemente, así como de altas tasas de la población durante la época de lluvia con temperatura y humedad estables (SSA 2009, Zárte-Nahón 2012).

2.2.2 Ciclo de vida

Ae. aegypti presenta una transformación que incluye larvas en agua y estadio adulto con capacidad de vuelo. El desarrollo sucede en cuatro etapas que son huevo, larvas, pupas y adultos. En seguida se describe cada una de las fases:

a) **Huevo o Huevecillo:** las hembras se alimentan de sangre y ovipositan entre 50 y 150 huevos con medidas de 0.8 a 1 mm (Anexo V) en la superficie de los contenedores, en el agua o cerca de ella, principalmente este fenómeno puede suceder en recipientes y en objetos de desecho o acumulados por el ser humano, así como también en lugares con agua de lluvia como huecos de los árboles, axilas de las hojas o cavidades de las rocas (Harwood et al 1987).

Los objetos de color oscuro pueden resultar más llamativos para los culícidos, específicamente si están bajo la sombra, y dejan aquellos que están contaminados o poseen algún olor. Regularmente el horario de oviposición es por las tardes. Cuando la superficie de las paredes de los contenedores llega a ser muy lisa, la hembra oviposita encima del agua, pero se quedan unidos en los costados del contenedor a la altura del nivel del agua (CDC, 1987). En condiciones particulares, la hembra puede colocar entre un 10 a 20% en el agua y el restante unido a las superficies de forma que cuando sube la cantidad del agua en el contenedor eclosionan los huevos, y de esta manera, se asegura una eclosión de manera paulatina que logre la sobrevivencia aún en condiciones poco favorables. En la oviposición los huevos son blancos, pero en minutos toman el color negro (Anexo VI). Los huevos se fecundan durante la oviposición y el desarrollo del embrión se termina dentro de dos días, bajo condiciones favorables como un ambiente húmedo y cálido, pero este período puede extenderse hasta cinco días si se estuviese expuesto a temperaturas bajas; si en este tiempo no hay humedad el embrión se pierde. Los huevos se consideran formas para resistir y sobreviven varios meses en condiciones climáticas desfavorables hasta que estas mejoren y ayuden a la eclosión, sin embargo, una vez completado el desarrollo del embrión, los huevos pueden subsistir durante amplios períodos sin humedad, de meses hasta el año. No obstante, una vez que los huevecillos tienen contacto con el agua, la actividad de las bacterias sobre los compuestos orgánicos disminuye el oxígeno en el agua, y se da la señal para la eclosión. Ciertos huevos pueden eclosionar 15

minutos después de estar en contacto con agua suficiente, otros eclosionan tardíamente. Se considera que los lugares, tiempos y etapas en que la hembra del mosquito oviposita podrían ser de utilidad para acciones preventivas (Zárate-Nahón 2012).

La persistencia de los huevos de *Ae. aegypti* a la falta de agua es un impedimento para controlarlos ya que esto les permite ser transportados en recipientes a lo largo de grandes distancias. Eliminar culícidos en estado adulto y larvas en una región no es un obstáculo para la reinfestación por huevos que hayan estado no visibles y latentes en recipientes. Lo cual podría explicar el incremento de mosquitos durante épocas de lluvias, lo que se relaciona con los brotes que surgen con las enfermedades transmitidas por vectores (Reiter et al 1995).

b) **Larva.** Los huevos al eclosionar dan lugar a larvas que tienen su desarrollo exclusivamente en agua, con respiración del tipo aéreo que toman su alimento filtrando el material en suspensión. El período como larva es considerado el de alimentación y desarrollo.

La morfología para la identificación (Anexo VII), muestra que *Ae. aegypti* en estado larval es presentan la cabeza de forma ovoide y nueve segmentos en el abdomen. En el segmento extremo posteriori y anal del abdomen presenta cuatro branquias lobuladas y un sifón para respirar, el cual tiene una longitud menor comparado con otros mosquitos. En la superficie del agua la larva de *Aedes sp.* se coloca de forma erguida. La forma de nadar de la larva de *Aedes sp.* se distingue por su serpenteo (CDC, 1987).

Otro factor involucrado en el deceso de los estadios larvales es resultado de la influencia que su misma población ejerce sobre las zonas de cría , debido al agotamiento de nutrientes cuando la población es elevada; debido a esto las medidas de control se dirigen en mayor medida al ataque de los adultos; ya que aún y cuando las medidas para el control de larvas sean efectivas y se logre eliminar arriba del 80 % de estos estadios en una zona de cría, no es afectada la formación de otros culícidos , pues se considera que esa baja en la población se compensa por una alta probabilidad de supervivencia de los estadios larvarios que restan (Service, 1992).

c) **Pupa:** En este estadio no se alimentan; el resultado es la metamorfosis de la fase larvaria a adulto (Anexo VIII), la pupa es diferente de otros holometábolos debido a que es muy activa y sensible a estímulos externos como vibraciones y reaccionan moviéndose de manera repentina y activa hacia aguas más profundas. Las pupas cuando no están activas se quedan sobre el agua; esta propiedad de flotar ayuda en el surgimiento del adulto. Este estadio dura aproximadamente de 48 a 72 horas (Harwood et al 1987).

Para establecer la morfología y características específicas de la pupa hay que revisar el tórax, ya que la pupa posee dos tubos respiratorios que traspasan hacia la zona superficial del agua y le ayudan a respirar. En la cavidad abdominal existen dos remos para el nado. La pupa de *Aedes* también puede diferenciarse por la corta trompeta no acampanada distalmente y en el ápice de cada paleta natatoria tienen un solo pelo. Las pupas de *Ae. aegypti* tienen cerdas robustas y completamente desarrolladas en los vértices sub-apicales de los segmentos abdominales del 2 al 6 (Nelson 1986).

d) **Adulto:** Son último estadio y son alados. Estos adultos poseen dimorfismo sexual, y se consideran fitófagos, la hembra también es consumidora de sangre ya que ocupa de las proteínas presentes en la sangre para la formación de los huevos, y tienden a permanecer en zonas cercanas de los domicilios de los seres humanos. El adulto es la parte medular de la dispersión, como también lo es el huevo; en *Ae. aegypti* probablemente hay un mayor transporte no activo de huevecillos y estados inmaduros en recipientes, que la diseminación activa por parte del adulto (Nelson 1986). Este mosquito es de comportamiento huidizo y silencioso, con hábitos diurnos, que tiende a encontrarse en superficies oscuras.

Sin embargo, las características de la morfología para la identificación del vector son muy parecidas, pero presentan ciertas diferencias entre hembra y macho, las cuales se mencionan a continuación. (Anexo IX).

2.2.3 Morfología e identificación del Vector

Aedes aegypti es un culícido de color oscuro, que posee franjas plateadas en las patas y un diseño característico en forma de lira, también de color plata en el tórax, el cual puede desaparecer a medida que aumenta la edad. En la etapa adulta el macho se puede

distinguir de la hembra por las antenas en forma de pluma y por los palpos largos y desarrollados. La duración del desarrollo está sujeta al ambiente, pero en condiciones favorables puede durar entre siete y catorce días. Los adultos poseen un promedio de vida de una hebdómada para los machos y de hasta un mes en las hembras. Una hembra que lleva a cabo la oviposición cada 72 a 96 horas, puede llegar a colocar hasta setecientos huevos en el transcurso de su ciclo.

Emergencia. Una vez que el adulto emergió de la fase de pupa (Anexo X), este reposa en las superficies de su criadero por algún tiempo, para lograr que el exoesqueleto y las alas se endurezcan y fortalecen al insecto (Zárate-Nahón 2012).

Apareamiento. Una vez que pasa un día posterior a la emergencia, ocurre el apareamiento, y las hembras son capaces de alimentarse de sangre. La copulación sucede durante el vuelo, aunque en ocasiones puede pasar en otras superficies. Una inseminación se considera lo necesario para la fertilización de todos los huevos en una hembra durante todo se ciclo vital, ya que cuando ésta recibe el esperma, después de uno o dos minutos, el esperma se almacena en unas estructuras llamadas espermatecas. El macho se acerca a la hembra mediante el ruido emitido que se produce mediante el batir de sus alas durante el vuelo (Nelson 1986).

Alimentación. Las hembras se pueden alimentar de sangre de casi todos los vertebrados, pero tienen un marcado favoritismo por los humanos. El propósito principal de alimentarse con sangre es tener proteínas para el crecimiento de los huevos. Esta alimentación con fluido sanguíneo, y la subsecuente oviposición, por lo regular ocurre en horarios diurnos, en las horas iniciales del día, a la media mañana o tarde, y en ocasiones también al anochecer (Nelson 1986). A diferencia de la hembra, el macho no posee estructuras bucales adaptadas para tomar sangre (Anexo 11); es por ello que su principal fuente de alimentación es a través de la obtención de carbohidratos encontrados en el néctar de las plantas y así poder obtener sus requerimientos energéticos. No obstante, la hembra, además de ser hematófaga es también fitófaga, por lo que también puede alimentarse de los jugos de las plantas (Zárate-Nahón 2012).

Postura / Oviposición / Ciclo gonadotrófico. Por lo general, la hembra desarrolla

un lote de huevos después de cada alimentación sanguínea. Sin embargo, la fabricación de huevos está en relación directa con la frecuencia y cantidad de sangre con que se haya alimentado, ya que, si llega a ser perturbada, la hembra no se puede saciar, por lo tanto, su alimentación es incompleta. Si la hembra completa su alimentación con sangre, alrededor de 2 a 3 mg de sangre, se desarrolla y coloca alrededor de 100 huevecillos. Hay una correlación en la distensión de la cavidad estomacal que ayuda a estimular el desarrollo de las estructuras ováricas, por lo tanto, la alimentación sanguínea escasa produce menos huevecillos por lote, una alimentación sanguínea reducida puede no llegar a siquiera producir (Nelson 1986).

Con cada alimentación y postura, la hembra tiene modificaciones en su morfología y una de ellas es llamada “reliquia folicular”, lo cual las distingue entre las hembras que ya pusieron huevecillos de las que aún no lo han hecho. Un alto número de hembras paridas es indicador de una población envejecida y que ya ha tenido bastantes alimentaciones de sangre y posee una mayor oportunidad para transmitir los virus (Mattison et al 2017).

El intervalo que hay entre la alimentación con sangre y la puesta de huevecillos es de 48 a 72 horas en condiciones ambientales inmejorables, incluso la hembra puede tomar sangre de nuevo el mismo día en que oviposita. Toda vez que la hembra ya se encuentra grávida, es atraída por depósitos de agua, que en término entomológicos se denominan criaderos, los cuales sean oscuros o sombreados, de paredes duras para hacer la postura, y que el agua contenida sean aguas relativamente limpias, claras, transparentes; un criadero puede ser cualquier desecho capaz de almacenar agua (Zárate-Nahón 2012).

Rango de vuelo. Se calcula que en el tiempo de vida del adulto la capacidad de volar de la hembra es inferior a 100 metros, por lo general no vuelan más de 50 metros de distancia a la redonda, y casi siempre permanecen en el mismo lugar donde emergió, siempre y cuando, los hospederos, sitios de descanso y de oviposición sean adecuados y estén a su disposición y alcance; de no ser así, una hembra grávida puede llegar a desplazarse incluso hasta 3 kilómetros buscando un lugar para ovipositar, por lo tanto se debe considerar esto en las acciones donde se planea la aplicación de insecticidas en el perímetro de las zonas afectadas. También es un hecho que los machos tienen a dispersarse

en menor medida que las hembras (CDC, 1987; Reiter, 1995).

Conducta de reposo. Cuando los culícidos no están en apareamiento, ni buscando un hospedero, ni están migrando, procuran estar en un sitio oscuro y tranquilo para el reposo, sobre superficies verticales como las paredes y algunas veces se posan sobre el techo o bajo muebles, y en artículos colgantes (Nelson 1986).

Longevidad. En condiciones de laboratorio sobreviven algunos meses, pero en la naturaleza, hasta el medio de la población puede morir en la semana inicial, y solo el 5% sobrevive en el primer mes (CDC, 1987). A pesar de esta disminución, si la población que emergió de forma original es grande, la población envejecida que resulta es lo suficientemente elevada para la transmisión de enfermedades e incluso mantener una epidemia.

2.3 ESTRATEGIAS E INNOVACIONES PARA EL CONTROL DE VECTORES

La gran diversidad de culícidos con capacidad de transmitir patologías y la búsqueda de métodos para controlarlos, han sido registradas durante muchos años. Incluso, existe una excelente relación de plagas de mosquitos y métodos de control que se remontan a los griegos cerca del año 480 a.C. (Patterson 2004). Apenas en el siglo XIX se descubrió que estos mosquitos portaban enfermedades, las cuales eran atribuidas erróneamente al agua “sucia” o a los gases de pantano. En la antigüedad, como medida de control, cerca de Corpus Christi, Texas, y hacia lo largo de las regiones costeras de la Unión Americana, eran enviados rebaños de caballos para que permanecieran cerca a los cuerpos de agua como sustento de los cientos de miles de millones de mosquitos, áreas las cuales éstos habían vuelto inhabitables. Más amenazante que la simple molestia de la picadura del mosquito, fue el descubrimiento a comienzo del siglo XX, de que estos también transmitían enfermedades como la malaria, la fiebre amarilla y el dengue; por lo que se reconoció una necesidad más urgente de control de mosquitos (Mattingly 1969). Los primeros métodos de control de mosquitos incluía la reducción de las principales fuentes del agua de la cual provenían mediante el uso de peces come mosquitos o productos químicos; sin embargo, estas metodologías biológicas, naturales, químicas y demás, continúan hoy en día, pero de maneras mucho más sofisticadas, la gran mayoría

siguiendo los principios establecidos por entomólogos médicos, siendo Leland Ossian Howard uno de ellos, decano de los entomólogos norteamericanos y de los principales iniciadores del control de vectores (Floore 2006).

Los mosquitos son responsables de más enfermedades que cualquier otro grupo de los artrópodos. Los problemas de salud globales asociados a las patologías contagiadas al ser humano a través de culícidos ponen en riesgo a cientos de millones que viven en las regiones tropicales y subtropicales y los países subdesarrollados (Zhang et al 2011); siendo el Dengue, Chikungunya y Zika los principales virus causantes de estas enfermedades de gran importancia para las autoridades de salud y una de las principales especies que los transmiten es el mosquito *Aedes aegypti*. Es por ello que, a través del tiempo, se han desarrollado estrategias enfocadas a reducir la diseminación de estas enfermedades a través de control de los vectores que las transmiten con diversos métodos, por ejemplo: insecticidas químicos, modificación genética de los vectores, incluso el desarrollo de vacunas contra estos virus; sin embargo, el manejo con estrategias amigables con el ambiente ha resultado hasta el momento la mejor opción.

2.3.1 Inicios y su regulación.

Entre los métodos de control más antiguos, alrededor de 1812, se encontraba el tratamiento de las aguas infestadas de mosquitos con queroseno (veneno por contacto) o Paris Green (Verde de París, veneno por acción de ingestión). El Verde de París, su efectividad estaba limitada al control de larvas, estadio del mosquito donde su alimentación es voraz. Su fórmula es $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$, técnicamente Acetoarseniato de Cobre. El médico entomólogo, L. O. Howard, fue el pionero en describir la utilidad de aceites con efectos tóxicos sobre larvas (Herms 1948). Una vez que se publicaron sus resultados en el año de 1892, esta metodología retoma relevancia para el manejo de los culícidos. Las partes volátiles y ligeras como el queroseno, la gasolina o el diesel podían causar un fenómeno parecido a la anestesia en la larvas y ocasionar su deceso, debido a que se formaba una capa parecida a una película formada por los mismos aceites sobre la superficie del agua, lo cual se consideró que no era necesario, además de ser algo costoso, ya que con cantidades muy pequeñas se podía intoxicar a los estadios larvales, ya que entre más elevado resultaba el porcentaje de

compuestos aromáticos en el aceite, también se elevaba la toxicidad sobre las larvas (Owens 1951; Gray 1961).

El control de mosquitos estaba en su infancia en el año 1900, y muchos estados, como California, Florida y Nueva Jersey, estaban iniciando programas de salud pública dirigidos a reducir los problemas de mosquitos, así como otros problemas de salud pública (Gray 1961). Durante los años siguientes, muchas de las metodologías de control fueron alteradas, o descartadas, mejoradas y/o perfeccionadas (Howard & Bishop 1931).

Los órganos legislativos y las agencias reguladoras a nivel estatal y federal han tenido un impacto en los métodos de control de mosquitos, siendo Nueva Jersey y Florida, los primeros estados que aprobaron una legislación a principios de 1900, estableciendo comisiones locales de control de mosquitos y supervisión estatal. Actos legislativos nacionales importantes incluyen la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas de 1947 y la formación de la Agencia de Protección Ambiental en 1970 (Eller 1974). Estas iniciativas ponen en marcha el registro oficial de todos los pesticidas en los Estados Unidos.

El control de mosquitos se encuentra todavía en un estado de evolución. Durante los últimos 50 años, ha dependido de los insecticidas orgánicos sintéticos, muchos de los cuales han sido retirados (Tabla 1). Por otra parte, algunos mosquitos se han vuelto resistentes, con lo que algunos pesticidas son menos efectivos. En respuesta a esta situación, el uso de insecticidas contra mosquitos debe ser desarrollado de manera que sea más amigable ecológicamente e introducido comercialmente tanto para las formas inmaduras y adultas del vector, es decir larvas y mosquitos (Rey et al 1999).

Tabla 1. Organofosfatos, hidrocarburos clorados, piretrinas, aceites y otros larvicidas que no se utilizan más en los Estados Unidos.¹

Clase	Insecticida	Nombre Comercial ²
Hidrocarburo clorado	DDT	DDT
Hidrocarburo clorado	Clorpirifós	Durban®
Hidrocarburo clorado	Dieldrín, Dieldrina	¿?
Organofosfato	Fentión	Baytex®
Organofosfato	Malatión	Cythion®
Organofosfato	Metoxicloro	Methoxychlor®
Organofosfato	Metilparatión	Methyl parathion
Organofosfato	Naled	Dibrom®
Organofosfato	Etilparatión	Ethyl parathion
Pireto, Pelitre	Piretrinas	Pyrenome MC®
Aceites	Aceites de petróleo	GB-1356®
Aceites	Aceites de petróleo	GB-1313®
Aceites	Aceites de petróleo	Fla larvicida
Aceites	Aceites	Kerosene
Aceites	Aceites	Undiluted diesel oil
Aceites	Aceites	Light fuel oil
Aceites	Aceites de petróleo	FLIT MLO®
Arsencial	Paris Green	Paris Green
---	Tierra de diatomeas	Perma Guard D-20®

¹ Esta lista está incompleta porque muchos estados y distritos locales que implementaban el control de mosquitos, desarrollaron sus propias formulaciones especiales, y las compañías químicas desarrollaron formulaciones que se evaluaron solo como formulaciones numeradas y nunca se fabricaron. Además, varios productos se comercializaron por poco tiempo en un mercado limitado, y la información histórica no estaba disponible.

² Un insecticida puede comercializarse bajo varios nombres comerciales, pero solo se menciona un nombre. (Floore 2006)

Muchos factores juegan un papel en el manejo eficaz de mosquitos, tales como la geología, el clima y la vegetación, pero en Florida otro factor fue adquiriendo importancia: la economía de la industria del turismo. A nivel internacional, así como en los Estados Unidos, los mosquitos infectados con malaria, el dengue, filarias, u otros virus no podían ser tolerados. Por ende, la industria multimillonaria del turismo no iba a permitir que estos mosquitos afectaran a los visitantes de la ciudad ni mucho menos que evitaran viajar (Rogers 1967).

Hay algunos elementos de control de los mosquitos que casi todos los programas incluyen como parte de sus operaciones el manejo integrado de plagas (IPM), el cual ha sido seguido por las agencias de control de mosquitos durante muchos años (Frank et al 1980). Recientemente, fue redefinido como el manejo integrado de mosquitos (IMM), cuyo objetivo es manejar las poblaciones de culicidos para lograr reducir la transmisión

de enfermedades y bajar el nivel de problemas relacionados con mosquitos mediante el uso de las técnicas y materiales efectivos y económicos disponibles con el más bajo impacto posible en el medio ambiente (Metcalf y Novak 1994).

En base a la revisión de los datos y características de la población del mosquito objetivo y la vigilancia epidemiológica, el manejo integrado de mosquitos, IMM, comenzó a utilizar medidas de control y el calendario de aplicación de insecticidas. Cuatro componentes del IMM se definieron (AMCA 1997) en asociación con el Programa de Administración de Pesticidas del Medio Ambiente EPA (siglas en inglés, Environmental Protection Agency, PESP, Pesticide Environmental Stewardship program) (EPA / PESP 1997):

1. **Reducción de fuentes:** eliminación o reducción de los hábitats de larvas de mosquitos.
2. **Aplicación de larvicidas:** aplicación de sustancias de origen químico para eliminar las larvas de mosquitos o pupas por aplicación vía terrestre o tratamientos aéreos.
3. **Aplicación Adulticidas:** aplicación de sustancias de origen químico para eliminar los culícidos adultos por tierra o aplicaciones aéreas.
4. **Control biológico (Biocontrol):** uso de organismos biológicos, p. ej., bacterias, hongos y virus, o sus subproductos, para controlar las poblaciones de diversas plagas, como en este caso los mosquitos en sus diferentes fases de larva y/o adulto.

2.3.2 Medidas de Control

El control efectivo de mosquitos requiere una planificación y preparación. Las herramientas deben incluir el conocimiento de la fauna de mosquitos y de área local con respecto a las temporadas de abundancia y el hábitat, la capacidad de planificar y desarrollar tácticas operacionales que se adapten a las necesidades de cada localidad, así como también la recolección de datos y la reevaluación de los planes si así se requiere considerando esos datos obtenidos. El manejo de las poblaciones de mosquitos inmaduros a menudo es ventajoso porque el hábitat de las larvas normalmente se concentra, relativamente inmóvil, y ocupan el área mínima de hábitat en comparación con los adultos

que se dispersan rápidamente. El control de larvas efectivo minimiza el uso de insecticidas en el medio ambiente que va dirigido contra el mosquito adulto, lo cual es más cómodo y mejor apreciado por las personas (Floore 2006).

La educación continua, tanto para los empleados y el público en general, es un factor esencial de casi todas las campañas de control de mosquitos. Esta educación ha dado lugar a una población más informada, e incrementa el profesionalismo entre los trabajadores de control de mosquitos, y tiene el beneficio adicional de la reducción del uso de insecticidas y sus riesgos asociados.

2.3.2.1 Reducción de fuentes

Reducción fuentes es la eliminación de los sitios de producción de mosquitos, y es a menudo una solución efectiva y a largo plazo para el control de mosquitos. Además, reduce o elimina la obligación de otras estrategias para el control de mosquitos. Cualquier charco de agua, incluso o agua salobre pueden crear el ambiente ideal para que se reproduzcan y alimenten los mosquitos, el cual puede purgarse o ser drenado. Incluso, una de las primeras prácticas fue el drenado de pantanos y el cribado de barriles de lluvia para eliminar los criaderos (Howard 1911). Sin embargo, los mosquitos se desarrollan a menudo en los humedales de importancia económica, como bebederos, presas, norias, etc., por lo que la modificación del hábitat no siempre pueden ser una opción.

Los esfuerzos de saneamiento relacionadas con el control de mosquitos se logran mejor por esas mismas personas que, a través de su propio descuido, crearon los sitios de reproducción de mosquitos que con frecuencia afectan sus viviendas. Muchas agencias y campañas de control de mosquitos incluyen recursos educativos como una sección de su estrategia para el manejo integrado de plagas y mosquitos (IMIP, IMM, siglas en inglés) para que las personas pueden aprender la importancia de los ya bien conocidos principios de saneamiento alrededor de sus hogares como parte integral del control de mosquitos. Los mosquitos en el hogar pueden reducirse significativamente mediante la eliminación de los criaderos como pueden serlo los envases de plástico, piscinas sin mantenimiento, neumáticos (muchos estados tienen sitios de reciclaje de neumáticos), o recipientes similares que contengan agua. A los residentes de la localidad se les exhorta a:

- Perforar el fondo de los contenedores de reciclaje y de basura que se encuentren al aire libre.
- Limpiar con regularidad las canaletas que tapan los techos.
- Cambiar el agua de los bebederos para pájaros y las piscinas de plástico una vez a la semana.
- Drenar las pipas y tuberías de riego, el agua estancada y zanjas obstruidas durante el regadío de pastos en las zonas rurales.

Otro método de reducción de fuentes es el manejo del hábitat del mosquito mediante las presas o represas de agua, donde la finalidad es embalsar el agua del cauce fluvial de un río o arroyo con el objetivo de derivarla y mejorar su aprovechamiento. Los alrededores de las presas son áreas donde también se reproducen los mosquitos, estas presas son usualmente construidas de manera que conserven las características naturales de flora y fauna, o como presas artificiales para así contener el caudal del agua que normalmente desembocaría en pantanos, zanjas o charcas. Este sistema elimina las oportunidades de oviposición y reduce efectivamente sus poblaciones. Desde 1990, se ha hecho un esfuerzo concertado para gestionar estas presas no sólo para el control de mosquitos, sino también para los intereses de los recursos naturales y de recreo (Carlson et al 1991). El manejo de rotación en las presas (RIM, siglas en inglés, rotational impoudment management) es una técnica desarrollada para abrir sus compuertas al mínimo nivel y permitir una corriente mínima durante el verano cuando los mosquitos se reproducen más, para luego aumentar la apertura de las compuertas originando una mayor corriente el resto del año, permitiendo así conservar muchas de sus funciones naturales con las demás especies de plantas y animales que lo necesitan (Carlson y O'Bryan 1988).

El Zanjamiento, o fabricación de canales, es también una técnica de reducción de fuentes con respecto al control de mosquitos; y se ha utilizado durante muchos años. Esta técnica de reducción de fuentes fue recientemente aplicada en algunas zonas costeras de las marismas de Florida en los Estados Unidos; se trata del manejo abierto del agua de marismas/pantanos (OMWM, siglas en inglés, open marsh water management). Con esta técnica, los lugares donde se reproducen los mosquitos en las marismas son conectados mediante zanjas poco profundas hacia otros hábitats de aguas profundas (por ejemplo,

lagos y lagunas). De esta manera, las crías de mosquitos son controlados sin el uso de pesticidas, propiciando el acceso a peces que se alimentan de las larvas, mejorando en ese sentido, la disminución de la población de mosquitos. De cualquier forma, estos lugares pueden ser drenados antes de que los mosquitos adultos pueden emerger. El mejoramiento de la conexión hidrológica entre la marisma y otros cuerpos de agua puede proporcionar un mejoramiento de los recursos naturales y mantener los beneficios de control de mosquitos. El zanjamiento poco profundo (zanjas de aprox. 3 pies o menos de profundidad), en lugar del zanjamiento profundo, se utiliza en el manejo abierto del agua de marismas/pantanos (OMWM, siglas en inglés) porque se considera ambientalmente más aceptable y tiene menos impactos hidrológicos en las marismas (Carlson et al 1999).

2.3.2.2 Control de Adultos

Fumigar espacios para el control de insectos adultos se recomienda en emergencias, para eliminar brotes epidémicos en franco desarrollo o para detener una epidemia inicial. La razón para fumigar espacios es destruir vertiginosa y masivamente a los adultos. Se considera que todos los métodos que reducen los culícidos adultos infecciosos, aunque sea por corto tiempo, se reduce la transmisibilidad de los virus durante este tiempo, aunque no se sabe si el resultado del tratamiento de espacios es significativo a largo plazo. Por tanto, si la vigilancia de las enfermedades tiene la susceptibilidad suficiente y se pueden determinar casos en los inicios de una epidemia, y si hay recursos, se puede comenzar con fumigar urgentemente espacios y las disposiciones de disminución de fuentes y la aplicación de larvicidas (Morera et al 2018).

El éxito de la fumigación de espacios puede depender de varios factores:

- Los medios de dispersión que se utilizan como vehículos terrestres o aéreos y/o equipos manuales
- Tipos de niebla (térmica o fría)
- La dimensión de las partículas líquidas que se expanden por el aire, la cantidad de la aplicación y las circunstancias del clima
- Estructura y configuración de los edificios, así como la penetración del fumigante
- La dimensión del área blanco

- La propiedad y la facilidad para acceder a ella
- El tiempo de vuelo.

Si se hace la fumigación en fases iniciales de un brote epidémico y a gran escala, se disminuye la intensidad de la transmisibilidad, con lo que se ahorra tiempo para implementar otras medidas para el manejo de los culícidos que logren un control a un plazo mayor, como los larvicidas y la disminución de fuentes de origen (Morera et al 2018). Por ello el control del vector *Aedes aegypti* está esencialmente dirigido al control de larvas o al enfoque de los estadios más susceptibles.

2.3.2.3 Control de larvas de Mosquitos

Para las áreas donde el agua estancada no puede ser reducida o eliminada, el control puede llevarse a cabo por la aplicación de larvicidas. Las posibles áreas de uso de larvicidas incluyen cualquier área donde el agua llegue a estancarse, tales como marismas, pantanos, arroyos, platos de maceteros, canales del techo, pozos, llantas viejas, estanques, entre muchos, muchos otros. Sin embargo, las consideraciones más importantes al aplicar larvicidas son los siguientes:

- El material debe ser específico para los mosquitos, para así minimizar el impacto sobre los organismos no objetivo.
- El larvicida debe ser capaz de penetrar incluso cuando la densa vegetación está presente.
- Las formulaciones de larvicidas (por ejemplo, líquidas, granulares, sólidas) deben ser adecuadas para el hábitat que se está tratando, deben ser aplicadas con precisión, y en base a los datos de vigilancia epidemiológica.

Un programa de aplicación de larvicidas eficaz es una parte muy importante de una operación integrada del control de mosquitos. La precisión en la aplicación es importante porque incluso aún y cuando un área relativamente pequeña no fuese tratada, puede resultar en la aparición de una gran cría de mosquitos y por lo tanto la necesidad de adulticidas adicionales a gran escala. Los larvicidas de mosquitos disponibles en la actualidad en la unión americana incluyen los larvicidas organofosforados (OP) (temefos, malatión), aceites de superficie y películas.

Aceites y películas. El Queroseno y Diesel fueron utilizados antiguamente según los reportes para ser larvicidas y pupicidas eficaces cuando éstos fueron rociados o vertidos en el agua (Herrick 1901). El aceite consistía en 1 de 3 métodos de control de larvas de mosquitos comunes en aquel tiempo. Durante los años de 1960 hasta principios de 1980, los aceites y las películas, se consideraban alternativas larvicidas útiles debido a la resistencia de los larvicidas organoclorados y organofosforados en muchas especies de mosquitos en los Estados Unidos. Aceites larvicidas deben tener propiedades tales como baja fitotoxicidad, buena capacidad de extensión, y proporcionar una rápida disminución de las larvas y pupas de mosquitos. Además, deben ser no corrosivo y sin olores. En la actualidad, las películas monomoleculares (Arosurf® MSF y Agnique® MMF) y los aceites superficiales derivados de destilados de petróleo (Bonide, BVA2, y Golden Bear Oil 1111) están disponibles. Las películas son ideales para el control de larvas en zonas ambientalmente sensibles. Estos larvicidas reducen la tensión superficial, por lo que es difícil para la larva, pupa o adulto emergentes se unan a la superficie del agua y así se ahogan. Los aceites superficiales y las películas ahora son productos derivados del petróleo altamente refinado que son prácticamente inodoro e incoloro. Ambos son muy efectivos: los aceites son de corta duración en el medio ambiente (por lo general menos de 12 horas), mientras que las películas pueden persistir de manera efectiva durante 10-14 días. Estos presentan un bajo riesgo para los organismos no objetivo, cuando se aplican debidamente de acuerdo a la etiqueta (Floore 2006).

Organofosforados (OP, siglas en inglés) e hidrocarburos clorinados. Históricamente, muchos OP e hidrocarburos clorados se emplean para el manejo de larvas de culícidos (por ejemplo, el DDT, fentión, malatión, paratión etílico, temephos, clorpirifos, metoxicloro). Temefos (Abate®), registrado en 1965, así como el malatión son los únicos OP o hidrocarburos clorados disponibles actualmente. Temefós se utiliza en programas del Manejo Integrado de pesticidas (MIP, siglas en inglés) y como una herramienta alterna del manejo de la resistencia cuando se utilizan larvicidas microbianos o productos reguladores del crecimiento de insectos (IGR, siglas en inglés) para evitar que los mosquitos desarrollen resistencia. Temefós es eficaz contra un amplio espectro de larvas de mosquitos, de acción rápida, económica y rápidamente biodegradable. Cuando se aplica de acuerdo a la etiqueta, no representa riesgos irrazonables para los organismos

acuáticos no objetivo o el ecosistema. Temefós se pueden utilizar en situaciones de agua limpia o contaminada. Se utiliza con mayor frecuencia en zonas de llantas de desecho, agua estanca, estanques de bosques, marismas, o áreas de tratamiento de aguas de desecho. Se acepta para su uso en sistemas de agua potable. Temefós está disponible como Abate en una variedad de formulaciones.

2.3.2.4 Control Biológico

Este método para la disminución de insectos plaga se demostró en 1889, cuando se logró el combate de *Icerya purchasi*, utilizando *Rodalia cardinalis*, en California, EE. UU (De Bach 1987).

El conservar en el ambiente las cantidades de seres vivos, dentro de los términos mínimos se atribuye a elementos bióticos; aquí se consideran a depredadores, parásitos y la acción de patógenos; su acción conjunta o de manera independiente es el control biológico (De Bach 1987). Mulla (1990), da una definición de los agentes de control biológico como los organismos o productos procedentes de ellos que se pueden emplear de forma única o en combinación con otras estrategias para el manejo de insectos plaga con capacidad vectorial para propagar enfermedades.

El control biológico o biocontrol, es el uso de organismos biológicos, p. ej., bacterias, hongos y virus, o sus subproductos, para controlar las poblaciones de diversas plagas, como en este caso los mosquitos en sus diferentes fases de larva y/o adulto.

El control biológico es muy popular debido a su potencial de especificidad, prácticamente sin afectar a los organismos no objetivo (Servicie 1983). Sin embargo, existen otras alternativas al uso de los microorganismos; otros autores ilustran el éxito del control de mosquitos con varias especies de peces (Legner y Sjogren 1984). *Gambusia* (peces que comen mosquitos), son especies que se pueden criar en grandes cantidades y se libera en criaderos de mosquitos donde se alimentan de muchos tipos de insectos, además de las larvas de mosquitos. Peces come-mosquito tienen que ser liberados anualmente en hábitats que no tienen agua todo el año, o cuando el agua se congela.

Otros organismos de control biológico incluyen a otras larvas de mosquitos (por ejemplo, *Toxorhynchites* spp.), que se nutren de estadios larvarios de otras crías de mosquitos contenidas en el mismo criadero. Sin embargo, la libre inoculación de *Toxorhynchites* spp. con el propósito de la colonización y la depredación efectiva se han realizado sin haberse establecido su correcto uso y control (Schreiber y Jones 1994).

Los microcrustáceos (copépodos predadores, por ejemplo, *Macrocyclus longisetus*) también se alimentan de larvas de mosquitos. Autores demostraron que la integración de *Mesocyclops* con larvicidas, se extiende la efectividad del control de mosquitos (Tietze et al 1994).

Los nematodos mermítidos (por ejemplo, *Romanomermis* spp.) también han mostrado ser larvicidas efectivos exitosamente. También, parásitos microsporidios (*Edhazardia aedis*) son patógenos comunes en estadios larvales de *Aedes aegypti* (Becnel y Johnson 2000).

El hongo *Lagenidium giganteum* se ha desarrollado como un organismo de control biológico de mosquitos (Roberts y Panter 1985).

Se comprende a los virus de mosquitos como: los virus iridiscentes de mosquitos (VIIs, siglas en inglés, virus iridiscentes de invertebrados (Williams 2008)) y los virus de la poliedrosis citoplásmica (CPV, siglas en inglés virus de la poliedrosis citoplásmica); estos virus están en espera de ser desarrollos como una futura tecnología (Federici 1985).

La geografía de América Latina así como el intercambio y comercio que se refleja en la emigración con otras naciones, así como la existencia de culícidos vectores de enfermedades, se vuelve difícil de controlar la emergencia, reemergencia y la dispersión de virus en América, aunque existen métodos de diagnóstico renovados, así como la existencia de inmunizaciones para Chikungunya y Dengue, se considera que la base del manejo y la prevención de los virus debe estar centrado en el control de los insectos vectores, ya que no es posible determinar en qué momento puede surgir un nuevo agente viral, mutaciones o nuevos serotipos que destruyan los logros en el manejo de estas patologías. Aunado al control biológico, es indispensable utilizar otras medidas de

prevención, las cuales se centran básicamente en bajar la cantidad de culícidos con la reducción del número de lugares que utilizan para la oviposición haciendo uso de insecticidas y larvicidas. La protección del individuo puede incluir el uso de ropa de manga completa y de colores resplandecientes, el uso de repelentes de los mosquitos, adicionalmente se pueden emplear mallas para camas, puertas y ventanas y así evitar las picaduras de estos culícidos. (Martínez-Sánchez et al 2015; Ioos et al 2014; Arredondo-García et al 2016).

La interacción de los factores medioambientales (clima, el desplazamiento de organismos y otras influencias naturales) desempeña un papel en el control biológico exitoso (Frank et al 1980). Un agente de control biológico exitoso debe ser fiable en muchas situaciones ambientales y su efectividad fácilmente apreciados.

El control de mosquitos es un paso esencial hacia la reducción de las enfermedades transmitidas por mosquitos. Insecticidas sintéticos se han utilizado con eficacia durante las últimas décadas para controlar estas plagas de dípteros y para reducir las patologías contagiadas a través de vectores. Pero el enfoque químico tiene inconvenientes, tales como el desarrollo de resistencia a los insecticidas, la contaminación ambiental, polución de la cadena alimenticia, y los efectos secundarios a los insectos beneficiosos. Por lo tanto, hay un interés creciente en la utilización de agentes biológicos para el manejo de culícidos. Los insecticidas microbiológicos (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* [Bti] y *Bacillus sphaericus*), son altamente selectivos para el control de estadios larvales de moscas y otros culícidos. El descubrimiento de bacilos patógenos, tales como *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti), sugirió su potencial como un biolarvicida (Goldberg y Margalit 1977, de Barjac 1978, de Barjac y Larget-Thiery 1984).

Los plaguicidas microbianos tienen algunas ventajas sobre los insecticidas convencionales sobre el manejo de control de mosquitos, ya que son más aceptables, más seguros para los organismos que no son objeto (como los humanos), y son más respetuosos del medio ambiente.

2.3.3 Otras estrategias: Esterilización (SIT) y Radiación, Incompatibilidad (IIT), OGM, Vacunas, Reguladores del crecimiento de insectos (IGR), Trampas de sonido.

- Existen otras estrategias como las técnicas de **insecto estéril (SIT)** que se ha incrementado en años recientes, así como el uso de **mosquitos irradiados y transgénicos**, que son técnicas que se basan en liberar machos estériles que se aparean con hembras selváticas, para producir descendencia sin capacidad de reproducirse (Arredondo-García et al 2016).
- Las técnicas de **insectos incompatibles (IIT)** utilizan a *Wolbachia* para lograr la incompatibilidad citoplasmática en culícidos como *Aedes*. Esto induce el deceso de la descendencia cuando los machos infestados con *Wolbachia* copulan con hembras no infestadas, disminuyendo la capacidad del vector para transmitir Dengue y Chikungunya (Fernández-Salas et al 2015).
- **Modificación genética OGM organismos genéticamente modificados**, debido al avance de la biología molecular, se pueden hacer cambios en los genomas del mosquito. En el año 2002, en la Universidad Case Western Reserve, modificó culícidos de *Anopheles stephensi* con genes que bloquean el desarrollo de *Plasmodium berghei*, una especie relacionada con los de la malaria. En marzo del año 2006, en la Universidad Estatal de Colorado mostró que, insertando un transgén específico, en el genoma de *Ae. aegypti* se desactiva el dengue, al poco tiempo de que la hembra se alimenta con los fluidos sanguíneos de un humano infectado. También se han desarrollado estrategias que eliminan a los culícidos que tienen un gen determinado y modificado. Se considera que tener en el laboratorio mosquitos que no son capaces de transmitir el patógeno no es de gran ayuda a la población, ya que aun y cuando se criaran y liberaran miles de estos mosquitos transgénicos tendría poco impacto en la salud pública, salvo y que los transgénicos compitieran con especies silvestres y terminaran por reemplazarlas (Gould et al 2006).
- **Vacunas.** La propagación del virus del Dengue a través de su mosquito vector *Aedes* durante la mayor parte de los trópicos ha llevado a un resurgimiento mundial de la epidemia de Dengue, incluyendo la fiebre hemorrágica del Dengue. Por primera vez en 60 años, la red de vacunas contra el Dengue parece prometedor. Las cepas de cada

uno de los cuatro serotipos del Dengue, atenuados por resiembra en cultivo de tejidos o por tecnología de ADN recombinante, se han formulado en vacunas del tipo tetravalentes y han entrado en la fase 1 y 2 con éxito los ensayos clínicos en los Estados Unidos de América y el sureste asiático. Mejora dependiente de anticuerpos de tipo salvaje infecciones DV por la vacuna representa un problema de seguridad único, que está bajo investigación. La Iniciativa Pediátrica vacuna contra el Dengue, la OMS, empresarios, la milicia estadounidense, y gobiernos de países tropicales han colaborado para lograr una vacuna contra el Dengue y ensayos de fase 3 de eficacia de vacunas en naciones donde el dengue es endémico. Se considera que una vacuna tetravalente debería tener licencia en breve si se quiere tener el Dengue bajo control (Edelman 2007). Hasta el momento no existen vacunas que otorguen defensa contra los serotipos del dengue, las estrategias para el manejo y erradicación de los brotes por Dengue se fundan en el manejo del mosquito, pues es conocido que la dispersión de la enfermedad puede interrumpirse disminuyendo la densidad de culícidos a través del uso de pesticidas. Sin embargo, es necesario hacer otras estrategias de control eficientes y sin daño al ambiente, además de difundir actividades precisas y la colaboración de las poblaciones en hechos de atención y manejo (Rodríguez-Domínguez 2009).

- Otra estrategia que pueden mencionarse son **los reguladores del crecimiento de insectos:** (por ejemplo, S-metopreno) evitan el proceso de maduración normal de un insecto al interferir con el desarrollo del adulto o pueden conducir a la esterilidad o deformidad de los adultos si llegan a emerger. El uso de hormonas juveniles o imitadores de hormonas juveniles que alteran el proceso de desarrollo se consideró una alternativa segura para el medio ambiente en vez de productos químicos como el DDT. La Ecdisoma es una hormona de insecto responsable de inducir la muda y la expresión secuencial de genes específicos del estadio. Altosid® (metopreno), registrado en 1975 como IGR, fue el primer compuesto en interferir con el crecimiento y desarrollo de insectos (Ware 1989). El metopreno funciona contra una amplia gama de géneros de mosquitos en una variedad de hábitats. Se han obtenido excelentes resultados en áreas que se secan y se vuelven a reabastecer. La toxicidad para los mamíferos, aves, invertebrados y peces es muy baja. El metopreno utilizado en el

control de los culícidos atendiendo las indicaciones del producto presenta poco riesgo para los seres humanos, los organismos no objetivo o la vida silvestre. Varias formulaciones con metopreno de la marca Altosid están disponibles. Sin embargo, Cornel et al. (2002) y Dame et al. (1998) reportaron resistencia al metopreno en California y Florida. Un IGR con un modo de acción diferente, pero también con propiedades mosquitocidas, es el diflubenzuron (Dimilin®), que se registró en 1982. Actúa como un inhibidor de la quitina, bloqueando la formación de la quitina en la etapa larvaria. El Dimilin también es altamente tóxico para las etapas de la vida juvenil de los crustáceos acuáticos (por ejemplo, camarones y pulgas de agua) y muchos insectos acuáticos (moscas maya y moscas caddis). Los organismos como las aves, la vida silvestre, los peces, las lombrices de tierra, las abejas y los moluscos no se ven afectados. Dimilin 25W está disponible de manera comercial para el manejo de larvas de mosquitos y su aplicación está limitada a hábitats que no son sensibles al medio ambiente (Floore 2006).

Actualmente y en el futuro cercano poder detener la aparición de enfermedades emergentes diseminadas por vectores es un reto cada vez más grande. Las vacunas que se encuentran en el mercado sólo existen para, encefalitis japonesa, fiebre amarilla tularemia y peste, además su uso es mínimo. Los posibles prospectos para vacunas nuevas no son alentadores. Excepto el paludismo, son mínimas las enfermedades que encuentran recursos económicos para su investigación. Se espera que en los años siguientes el manejo de los insectos sea la manera de interrumpir la transmisión de estas enfermedades; para esto es necesario un acercamiento con sustancias para el manejo de insectos ambientalmente seguros y diversos sentidos como el control biológico; además de recursos económicos amplios y suficientes para la innovación e investigación, también se requiere formar personal capacitado para desplegar e implementar programas de prevención sostenibles a largo plazo. También es necesaria la reconstrucción de la infraestructura apoyada en nuevas políticas públicas para apoyar la prevención de enfermedades. Finalmente debe buscar revertir los cambios asociados a la creciente presión demográfica sobre las áreas urbanas y cambios en las prácticas agrícolas para lograr tener éxito contra los problemas que ocasionan las enfermedades transmitidas por vector en el siglo XXI (Sutherst et al 2001).

2.4 USO DE BTI COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti*

El control biológico de plagas ha mostrado que el uso de microorganismos es una buena estrategia en el manejo de culícidos vectores debido al elevado grado de letalidad que presentan; una de estas es *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria se caracteriza por producir toxinas con un alto grado de especificidad contra insectos de diferentes ordenes (Bravo et al., 1992; Bravo et al., 2006). Cuando *B. thuringiensis* esporula forma cristales formados por la glicoproteína δ -endotoxina que tiene diferentes efectos sobre el insecto como la paralización del intestino, rompimiento de las microvellosidades, cambios de los organelos en el citoplasma y la muerte de la larva. Existen diferentes productos a nivel comercial que contienen como ingrediente activo a *B. thuringiensis* (Bt) los cuales se consideran seguros ya que hasta el momento no existen efectos nocivos en los bioensayos de seguridad con vertebrados, abejas y humanos (Fernández-Ávila 2010).

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) y *Bacillus sphaericus* son altamente selectivos para larvas de mosquitos y mosquitos adultos. Los efectos de Bti se limitan al orden *Diptera*, suborden *Nematocera*, con la mayor actividad observada en las familias *Culicidae* y *Simuliidae*. Bti se aisló de *Culex pipiens* en Israel en 1976 (Goldberg y Margalit 1977) y se designó serovariedad *israelensis* H-14. Desde entonces, varias cepas mosquitocidas han sido aisladas y clasificadas. Esta bacteria produce una protoxina en forma de cristal durante la esporulación. Cuando se liberan en la columna de agua, las protoxinas están disponibles para la alimentación de larvas de mosquitos. Estas proteínas son esencialmente no tóxicas hasta que son ingeridas por las larvas de mosquitos y llegan al ciego gástrico y al intestino medio. Los cristales paraesporales microscópicos son luego activados por el ambiente alcalino y las enzimas proteolíticas del intestino medio. Las subunidades de proteínas resultantes (toxinas) atacan las células epiteliales del intestino medio de las larvas afectadas. Las células del intestino medio se hinchan, se rompen y se desprenden hacia la luz del intestino medio, y las larvas generalmente dejan de alimentarse en cuestión de horas y mueren dentro de las 24 a 48 h (Lacey 1985).

Las toxinas y las esporas son eficaces contra muchos mosquitos, moscas de los hongos, y moscas negras, incluidas las especies univoltinas como los lepidópteros, por

ejemplo; mientras que no tiene casi ningún efecto sobre otros organismos. Los sitios de aplicación incluyen cualquier sitio de desarrollo larvario temporal o permanente (es decir, zanjas, estanques, alcantarillas, pantanos de cipreses) y sitios que pueden secarse rápidamente donde no se puede esperar un control residual. El control efectivo disminuye rápidamente en los hábitats con suelo o sustrato orgánico, pero puede persistir durante períodos prolongados en los hábitats de contenedores sin sustrato. El reciclaje de la bacteria es muy bajo y no contribuye al control extendido. Las formulaciones comerciales incluyen Aquabac®, Teknar® y Vectobac® "Mosquito Dunks" / "Mosquito Bits". También está disponible en formulaciones líquidas o granulares a granel para uso comercial y de agencias públicas. Estos productos están disponibles como suspensiones acuosas, concentrados fluidos, tabletas de aplicación directa, gránulos y gránulos dispersables en agua (Floore 2006).

Poopathi et al., (2009) menciona que el control microbiano de los mosquitos, mediante el uso de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (de Barjac), está ganando una amplia aceptación en el manejo de plagas y vectores de patologías, sobre todo mosquitos, principalmente a causa de los numerosos casos de contaminación con insecticidas químicos y la presencia de resistencia en los insectos. Desde el descubrimiento de la propiedad mosquitocida de *B. sphaericus* y Bti, diversas formulaciones comerciales de estos agentes se han desarrollado y evaluado. Los atributos de estas preparaciones, tales como la producción a gran escala, de alta eficacia, especificidad, larga vida útil, rentabilidad, facilidad de transporte, y relativamente poco peligro de ocasionar resistencia, así como su inocuidad para los organismos no blanco, garantizan un prometedor futuro para estos agentes, en la aplicación práctica, para el control de mosquitos (Mulla et al. 1988, Kumar et al. 2000, Poopathi y Tyagi, 2006).

Según Lacey, (2007), menciona que desde el descubrimiento de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) serovariedad *israelensis* (IAV) y aislamientos eficaces de *Bacillus sphaericus* Neide, formulaciones no químicas de estas bacterias se han convertido en el medio predominante empleado para el manejo de larvas de culícidos en distintas localidades de los Estados Unidos de América y en otras naciones. Teniendo una visión general de la evolución en los últimos 20 años en relación con las toxinas de Bti y *B.*

sphaericus, sus modos de acción, eficacia y factores que afectan a la actividad larvicida, el desarrollo de la resistencia, la seguridad, y su papel en el control de mosquitos integrada; la eficacia de las formulaciones de Bti se ha demostrado en una variedad de hábitats contra una multitud de especies de mosquitos. Elementos bióticos y abióticos que influyen en la capacidad para controlar larvas por parte de Bti y *B. sphaericus* incorporan especies de culícidos y sus respectivas estrategias de alimentación, frecuencia de la ingestión, la edad y la concentración de larvas, los elementos del hábitat como la , profundidad del agua, temperatura, radiación a partir del sol, turbidez, tanino y el contenido orgánico, presencia de vegetación, entre otros), elementos de formulación (tipo de formulación, el contenido de la toxina, la eficacia con el material alcanza el objetivo, y velocidad de sedimentación), las condiciones de almacenamiento, los factores de producción, los medios de administración y repetición de los tratamientos. Debido a su eficiencia y especificidad correspondiente, tanto Bti y Bs pueden ser agentes de control ideales en programas integrados sobre todo cuando se combinan otros agentes de control biológico, la administración del medio ambiente, el cuidado del personal y el uso juicioso de insecticidas.

2.4.1 Resistencia

El uso extensivo de insecticidas sintéticos, sin embargo, ha dado lugar al advenimiento de mosquitos que escapan al efecto de los insecticidas, la contaminación ambiental y el aumento de precios de los nuevos insecticidas sintéticos (Rajkumar et al 2009). Estos factores hacen que la práctica del control de vectores sea difícil. Por lo tanto, es crucial la búsqueda de nuevas sustancias que sean seguras y ecológicamente amigables (Zhang et al 2011).

El uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y *B. sphaericus* como biolarvicidas es una estrategia viable para el manejo de insectos plaga (Aronson 2010). *B. thuringiensis subsp. israelensis* (Bti) es eficaz contra los culícidos. A pesar de la aplicación generalizada de Bti durante más de 30 años, no hay mosquitos resistentes que se hayan encontrado en el campo hasta la fecha (Bravo et al 2008, Sazhenskiy et al 2010, Zhang et al 2011).

El alto costo, sin embargo, se está convirtiendo en una de las dificultades más

importantes en el uso de productos de Bt. Encontrar cepas más activas contra dípteros podría afectar en gran medida el manejo de los culícidos.

2.5 BACTERIA *Bacillus thuringiensis israelensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es un grampositivo, bacteria aeróbica formadora de esporas que se encuentra en una multitud de hábitats. se distingue de especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas por la presencia de una inclusión paraesporal. Existen serovariedades Bt con actividad larvicida para lepidópteros, coleópteros, se han aislado de dípteros y otros insectos, de una diversidad de hábitats en todo el mundo, incluyendo insectos muertos, suelo, filoplano/filosfera, polvo de grano, acuáticos y otros hábitats (Martin y Traver 1989, Smith y Couche 1991, Beegle y Yamamoto 1992, Meadows 1993, Damgaard 2000, Glare y O'Callaghan 2000). Varios aislado de Bt se han desarrollado y comercializado para el control de insectos (Beegle y Yamamoto 1992). Bt Los productos de Bt representan la mayoría de las ventas de biopesticidas en América del Norte y en otros lugares (Lacey 2007).

La actividad larvicida de Bt se debe a las toxinas que se encuentran en las inclusiones paraesporales (también conocidas como cuerpos y cristales paraesporales) que se producen en el momento de la esporulación. Conocidas colectivamente como - endotoxinas (delta-endotoxinas), comprenden un grupo diverso de toxinas proteicas, formas de inclusión y rangos de huéspedes. La comparación de las secuencias de aminoácidos y los rangos de huéspedes de las toxinas individuales dio como resultado el desarrollo de una nueva nomenclatura para las toxinas de inclusión (Hofte y Whiteley 1989). Desde entonces, la nomenclatura ha sido revisada y ahora se basa únicamente en las relaciones de secuencia de aminoácidos entre las toxinas (Crickmore et al. 1998), lo que permite establecer correlaciones entre la secuencia, la actividad larvicida y los orígenes evolutivos de las toxinas (Crickmore 2000). La designación "Cry" se refiere a toxinas cristalinas y "Cyt" se utiliza para describir aquellas toxinas cristalinas que muestran actividad citolítica y hemolítica in vitro. Para toxinas individuales, Cry o Cyt van seguidos de una designación alfanumérica. Las toxinas con la mayor actividad larvicida de mosquitos (Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A) se encuentran en Bti y ciertos aislados de otras serovariedades que producen toxinas iguales o similares. Para obtener

una explicación de cómo se determinan las serovariedades, consulte Thiery y Frachon (1997). Se ha informado una amplia gama de actividad larvicida de mosquitos para serovariedades de Bt distintas de Bti (Hall et al. 1977, Padua et al. 1980, Lacey y Oldacre 1983, Padua et al. 1984, Yu et al. 1991, Ragni et al. 1996, Thiery et al. 1999 y varios otros revisados por Delecluse et al. 2000), y aislamientos de *Clostridium difformans* serovar. *malasia* (de Barjac et al. 1990), *Bacillus circulans* (Darriet y Hougard 2002), *Brevibacillus laterosporus* (Favret y Yousten 1985) y *B. sphaericus* (revisado en detalle en este capítulo). El nivel de actividad larvicida de la mayoría de estos aislamientos es más bajo que el de Bti. Las excepciones notables son el aislamiento PG-14 de la serovar *Bt. morrisoni* (Padua et al. 1984, Federici et al. 1987, Lacey et al. 1988a) y algunos de los aislamientos informados por Ragni et al. (1996). Los aislamientos de Bt con actividad larvicida de mosquitos han sido colocados en 3 clases por Delécluse et al. (2000): Clase 1 incluye Bti y 7 cepas adicionales con polipéptidos de toxina y actividad larvicida similar o idéntica a la encontrada en Bti; La clase 2 incluye 2 cepas que son casi tan tóxicas como Bti, pero con diferentes polipéptidos; y la Clase 3 tiene cepas débilmente activas y polipéptidos que son diferentes de Bti y las otras cepas altamente tóxicas.

La primera bacteria de *Bacillus thuringiensis* se aisló a partir de *Bombyx mori* en el año de 1902 (Ben-Dov et al 1999). Mucho tiempo se especuló que *B. thuringiensis* era nocivo solo para lepidópteros porque se habían aislado solo cepas con actividad toxica contra este orden de insectos. En el año de 1976, se aisló *B. thuringiensis* subsp *israelensis* con capacidad de eliminar culícidos y en el año de 1983 una *B. thuringiensis* subsp *tenebrionis* con actividad sobre coleópteros. Posteriormente numerosos investigadores a nivel mundial se dedicaron a la búsqueda de estas bacterias encontrando una amplia variedad de ellas, las cuáles se caracterizan por el serotipo H-flagelar, es decir, por las proteínas que se encuentran en su flagelo en más de cuarenta y cinco serotipos y cincuenta y ocho serovariedades distintas. Se tiene poca información acerca del entorno en la naturaleza de Bt, sin embargo, dado sus requerimientos vitamínicos y de aminoácidos como el glutámico, y por su capacidad para matar insectos, se cree que la forma de vida vegetativa se presenta solamente en la parte interna de insectos que puede infectar hasta que se genera la espora y se libera al ambiente donde se encuentra latente como esporas, lo que puede explicar su vasta disposición. En las especies de *Bacillus*, la endospora se

forma en un esporangio que tiene 2 compartimentos, la célula madre y la espora. Las proteínas con actividad insecticida se guardan en la célula madre mientras sucede la formación de esporas. En el primer estadio se estimulan genes que inician la formación de la espora, y en este sitio puede revertirse si se agregan nutrientes. A partir del segundo estadio de la formación de la espora, la fase no se puede revertir y debe continuar hasta terminar con la generación de una nueva espora. En este segundo estadio, la bacteria debe formar un septo de división de forma asimétrica. En el tercer estadio, empieza la creación del cristal con actividad tóxica sobre los insectos, la cual continúa hasta el fin de la formación de la espora. La formación del cristal comienza a partir de dos promotores que actúan de forma secuencial (Bt1, Bt2) el primero se inicia por σ -E durante los estadios tercero y cuarto y el segundo por σ -K durante los estadios quinto y sexto. Durante esta secuencia sucede la formación de la espora. Al final, en el séptimo estadio se forman enzimas con actividad lítica que dejan libres las esporas y los cristales (Arantes et al 1991; Fernández-Ávila 2010).

Laurence et al 2011, describe a Bti de la siguiente manera: *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti), serotipo H14, es una subespecie de las diversas especies de *Bacillus thuringiensis*, una bacteria entomopatógena capaz de sobrevivir en el medio ambiente como espora y produce toxinas insecticidas dentro de un cuerpo de inclusión durante el proceso de esporulación. Bti se aisló por primera vez de un estanque de agua en el desierto de Negev (Goldberg y Margalit, 1977) y fue la primera cepa descrita por tener actividad insecticida además del orden lepidóptero. Sin embargo, la especificidad para un grupo dado de insectos es una consecuencia del conjunto particular de proteínas que produce una cepa y, por lo tanto, no existe una correlación estricta entre los serotipos, las toxinas que producen durante la esporulación como inclusiones de cristales insecticidas y el rango de hospedadores. Sin embargo, la especificidad de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* son fundamentales en el amplio uso de Bt como alternativa a los insecticidas químicos para el control de plagas de insectos en silvicultura, agricultura y salud pública. El serotipo H14, Bti, produce 4 toxinas principales (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa) específicas para los dípteros (mosquitos, moscas negras y mosquitos quironómidos) (Anexo XII). Sin embargo, el plásmido conjugativo de 128 kb pBtoxis que lleva los genes de la toxina lleva tres genes más para las proteínas insecticidas: Cry10Aa,

Cyt2Ba y Cyt1Ca (Berry et al., 2002).

2.5.1 Mecanismo de acción de las proteínas cry en *Aedes aegypti*

Este mecanismo un proceso de varias etapas inicialmente debe existir la deglución por la cavidad oral de los organismos sensibles, luego ocurre la disolución del cristal, el proceso de las protoxinas, la fusión al receptor, posteriormente se inserta en la membrana, se agrega, y al final se forma un poro para alcanzar la ruptura celular (Alyahyae y Ellar, 1995).

Los síntomas que se observan una vez que los estadios larvarios de organismos sensibles engullen los cristales y las esporas de *Bacillus thuringiensis* son la interrupción de la alimentación, la paralización intestinal, emesis, diarrea, parálisis total y posteriormente la pérdida de la vida (Gómez et al., 2007). Las toxinas Cry incrementan la porosidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas más grandes (Bravo et al., 2011). Lo cual ocasiona que se destruya la diferencia del potencial y se disipe la fuerza motriz que induce el acceso de aminoácidos al interior de la célula, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma (Carroll y Ellar, 1993). La consecuencia más grave de este proceso es la alcalinidad del citoplasma, ya que causa interferencia con el metabolismo de la célula, que logra la pérdida del epitelio intestinal. Cuando las células se rompen, las esporas de *B. thuringiensis* llegan a la hemolinfa donde logran proliferar (Schwartz et al., 1997). El resultado es la aniquilación del intestino en su parte media y el aumento de microorganismos en la hemolinfa causando el deceso larvario por septicemia e inanición (Soberón y Bravo, 2003).

Al igual que otras toxinas Bt, el modo de acción de las toxinas Bti está estrechamente conexas con relaciones estructura-función. Una característica particular de Bti es que su actividad insecticida se basa en la combinación de tres grupos distintos de toxinas con respecto a la estructura-función y, por lo tanto, un modo de acción específico, es decir, Cry4Aa + Cry4Ba, Cry11A y Cyt1Aa. Esto también muestra a nivel del cuerpo de inclusión que es una entidad compuesta que comprende tres diferentes componentes del cristal, uno para cada uno de los tres grupos mencionados anteriormente. De hecho, cada grupo se pliega y se acumula por separado en un cuerpo de subinclusión específico

de diferente forma ensamblado en un cuerpo paraesporal esférico y unido por un sobre laminar (Ibarra & Federici, 1986, Federici et al., 2003). La organización de los genes en pBtoxis refleja estas diferentes estructuras con una organización monocistrónica separada para cada gen de toxina. Sin embargo, la coevolución y la selección de sinergia también se pueden ver en esta organización.

De hecho, Despres et al 2011 menciona que el Cyt1Aa1 es citotóxico también para las bacterias y para *B. thuringiensis* y debe ser debidamente plegado en un estado intermedio inactivado hasta la activación por las proteasas del intestino medio del insecto. Este plegamiento adecuado está mediado por una proteína chaperona, P20, que se encuentra en el operón Cry11Aa, junto con la proteína P19. Curiosamente, Cry11Aa no requiere la Chaperona P20 para plegar, mientras que Cyt1Aa1 lo requiere y se encuentra en un cistrón separado en orientación opuesta al operón Cry11Aa. Esto sugiere fuertemente una coevolución de todos estos genes para la sinergia en la actividad mosquicida que también está subrayada por divergencia de las cuatro principales toxinas Bti en toxicidad y rango de hospedadores: Cry4Ba está activo principalmente contra *Anopheles* y *Aedes*, y no muestra toxicidad para las especies de *Culex*, en contraste con la toxina Cry4Aa que es tóxica para los estadios larvarios de *Culex*. Cry11 es el más tóxico para *Aedes*, y Cyt1Aa muestra de bajo (*Aedes*, *Culex*) a la no toxicidad (*Anopheles*). Cyt1Aa tiene un fuerte efecto sinérgico en la toxicidad de las toxinas Cry en todos los mosquitos.

Los datos sobre la organización de las toxinas Cry y Cyt de Bti indican claramente las principales estructuras y diferencias funcionales y deben tenerse en cuenta al abordar su modo respectivo de acción y resistencia a las toxinas Bti. Todas las proteínas insecticidas Bti se producen como protoxinas y todas deben ser activadas in vivo por insectos proteasas del intestino medio actividad insecticida previa. Después de esta activación inicial, el paso posterior de unión al receptor aún no se resuelve completamente (Anexo XIII) (Despres et al 2011).

Poopathi et al (2013) menciona que, durante la esporulación, Bti sintetiza cuatro polipéptidos (135, 125, 68 y 28 kDa) que se refieren como Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt 1A, respectivamente (Delécluse et al 1995). Sin embargo, otros autores refieren que

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis sintetiza inclusiones de cristales intracelulares por la esporulación que contiene varios componentes de la proteína de 134, 125, 67 y 27 kilodaltons (Sekar 1986, Hofte y Whitely 1989, Federici et al 1990, Wirth et al 1998). Estas proteínas cristalinas interactúan sinérgicamente, causando toxicidad contra larvas de mosquitos, en la ingestión junto con materiales alimentarios (Poncet et al 1995). La forma de actuar de estas toxinas bacterianas implica una unión altamente específica con las células en la membrana del borde de las microvellosidades de la parte media del intestino.

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) ha sido conocido por 30 años como una bacteria que forma la inclusión insecticida durante la etapa de esporulación (Ramírez-Suero et al 2005). Sus productos son activos contra ciertas especies de larvas de mosquitos (de Barjac 1978). Las incorporaciones tóxicas son ingeridas por los estadios larvarios, solubilizado por el alto pH del intestino medio de las larvas, y la protoxina se activa por proteasas. Las células del intestino se hinchan y lisan y el insecto deja de alimentarse y, finalmente, muere (Delécluse et al. 1988).

2.5.2 Factores que afectan la actividad de la δ -endotoxina

Ramírez-Suero et al (2005), menciona que el uso de Bti está limitado por los bajos efectos de las preparaciones actuales que son aplicadas en condiciones de campo (Su y Mulla 1999). En muchos casos, y sobre todo en zonas expuestas al sol, el efecto residual es muy corto (Leong et al 1980) y el producto debe volver a aplicarse. Además, las formulaciones líquidas de Bti no son estables al calor ni a la alta humedad y no se pueden almacenar por meses bajo condiciones tropicales (Boisvert y Boisvert 1999). Una variedad de formulaciones de Bti han sido estudiadas para el manejo de culícidos en laboratorio y campo (Liu et al 1993, Nguyen et al 1999, Su y Mulla 1999).

Clark, et al. 2007, menciona que *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* es formador de esporas y de proteínas insecticidas cristalinas parasporales que se convierten en independientes de la espora tras la lisis de esporangios (Yousten et al 1992, Lee et al 2003). Estas proteínas parasporales son específicamente letales para algunos miembros del orden Díptera, tales como moscas negras y mosquitos. La producción comercial de

esta bacteria típicamente involucra la fermentación, la recuperación de cristales y esporas, y secado por pulverización de concentrado de fermentación procesado para obtener polvos técnicos que se utilizan en el desarrollo de polvos humectables, gránulos dispersables en agua, y formulaciones en suspensión acuosa y no acuosa (Devisetty 1994). En el pasado, las formulaciones comerciales de *B. thuringiensis subsp. israelensis* típicamente tenían un corto efecto residual (24-48 h) en el campo después de la aplicación (Margalit y Bobroglo 1984). Así, las poblaciones de larvas de mosquitos de agua estancada podían recuperarse al plazo de 5-7 días después del tratamiento (Priest 1992). Sin embargo, los grandes avances en las tecnologías de formulación larvicida microbianas (por ejemplo, pastillas de calidad farmacéutica, los sistemas de agua solubles de entrega de la bolsa, y otras tecnologías de liberación controlada y retardada) han hecho posible extender el efecto residual de *B. thuringiensis subsp. israelensis*. Por ejemplo, Benjamin et al (2005) demostraron en un estudio de 19 meses en el sudeste asiático que VectoBac DT®, una formulación de comprimidos/tabletas comerciales de *B. thuringiensis subsp. israelensis*, mostrando más del 90% de control esto en recipientes de barro por un período mínimo de 5,5 meses con y sin reposición de agua semanalmente, el 50% del volumen de agua de reposición, y por un período máximo de 2,2 meses con el 50% del volumen de agua de reposición a diario.

La razón principal para cualquier efecto residual breve bajo observación en el campo de *B. thuringiensis subsp. israelensis* es la adsorción de esporas y cristales de las partículas del suelo / de barro (Lacey 1990, Molloy 1990, Priest 1992). Otros factores que contribuyen a la falta de persistencia se enumeran en la Tabla 2. Aunque cada uno de estos factores ambientales juega un papel en el deterioro de la eficacia de la formulación comercial, se han realizado muy pocos estudios para evaluar la interacción de estos factores. Además, la complejidad de los diferentes entornos, los diversos comportamientos de alimentación de las especies de mosquitos y las diferencias en el tipo de formulación y la eficacia, se suman a los desafíos encontrados al intentar estudios de residualidad. Por lo tanto, en este momento es imposible atribuir la degradación de *B. thuringiensis subsp. israelensis* a un único factor principal en un ambiente acuoso dado.

Tabla 2. Resumen de investigaciones clave sobre el efecto de los factores ambientales en la actividad de las bacterias entomopatógenas.¹

Factor Ambiental	Material a prueba	Efecto	Referencia
Luz			
$\lambda = 300\text{--}700$ nm (luz solar)	Bt esporas y cristales	Las esporas son más sensibles que los cristales, pero ambos se inactivan en 3 días	Ignoffo et al. (1974)
$\lambda = 300\text{--}700$ nm	Bs esporas	Inactivación rápida	Mulligan et al. (1978)
$\lambda = 253.7$ nm (ultravioleta)	Bt esporas y cristales	Letal para esporas de Bt pero no tiene efecto en la actividad insecticida de Bt	Burges et al. (1975)
pH			
	Bt	Estable por encima de pH 3 y por debajo pH 11; sensibilidad al pH aumenta con temperatura y longitud de exposición	Nishiitsutsuji-uwo et al. (1976), Salama and Morris (1993)
Temperatura			
	Bt	Temperatura de agua menor a 10°C y mayores que 30°C tienen efectos adversos sobre la actividad	Ignoffo (1992)
Competición orgánica			
	Bti	Incremento en la contaminación resulta en mayor densidad de mosquitos que requieren tasas más altas de bacterias para mantener la eficacia	Mulla (1990); Hougard (1990)
Degradación microbiana			
	Bt	Las proteínas insecticidas se pueden eliminar o inactivar en el medio ambiente por degradación y eventual mineralización por microorganismos	Koskella and Stotzky (1997)

¹ Bt = *Bacillus thuringiensis*; Bti = *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*; Bs = *Bacillus sphaericus*. (Clark et al 2007).

De las formulaciones de Bti que generalmente son aplicados directamente al agua, las toxinas y esporas quedan suspendidos en la columna de agua y las larvas los ingieren por su conducta filtroalimentadora. Sitios de aplicación incluyen cualquier sitio de desarrollo larval temporal o permanente (es decir, zanjas, estanques, colectores de fango, pantanos de ciprés) y los sitios que se puedan secar rápidamente donde uno podría no esperar un control residual. El control efectivo disminuye rápidamente en los hábitats con el suelo o sustrato orgánico, pero puede persistir por períodos prolongados en los hábitats de contenedores desprovistos de sustrato. El reciclaje de la bacteria es insignificante y no contribuye al control extendido.

Lacey (2007) menciona que son varios elementos bióticos y abióticos los que influyen en la actividad toxica contra las larvas por parte de Bti, incluidas las especies de mosquitos y sus respectivas estrategias de alimentación, la tasa de ingestión, la edad y la densidad de las larvas, la dosis, los factores del hábitat (temperatura, radiación solar, profundidad del agua, turbidez, taninos y contenido orgánico, presencia de vegetación, etc.), factores de formulación (tipo de acarreador, contenido de toxinas, qué tan efectivamente el material alcanza el objetivo y tasa de sedimentación), condiciones de almacenamiento, medios de aplicación y frecuencia de los tratamientos, y factores de producción, especialmente el medio en el que se cultiva la bacteria (Mulligan et al. 1980, Sinegre et al. 1981, Lacey y Undeen 1986, Wraight et al. 1987, Aly 1988, Aly et al. 1988, Kramer et al. 1988, Kramer 1990, Mulla et al. 1990b, Becker et al. 1992, Lord y Undeen 1990, Walker 1995, Beck et al. 1996, Skovmand et al. 1997, Boisvert y Boisvert 1999, Nayar et al. 1999, de Melo-Santos et al. 2001, Christiansen et al. 2004, Vilarinhos y Monnerat 2004). Aunque la bacteria se utiliza para el control de larvas, Stoops (2005) mostró que las hembras de *Aedes albopictus* ponen más huevos en recipientes tratados con Bti en comparación con los controles no tratados. Este fenómeno de atraer y matar podría mejorar la eficacia, especialmente en comparación con los larvicidas que pueden repeler la oviposición.

2.5.3 Medios de cultivo para la producción de Bti

Seleccionar un aislado nativo de *B. thuringiensis*, la facilidad para inducir la producción de cristales tóxicos y la posibilidad mediante técnicas de ingeniería genética lograr su manipulación para su mejora, al igual que sus requerimientos nutricionales, se consideran condicionantes para la producción exitosa de un bioinsecticida a base *B. thuringiensis*; una fase considerada esencial en la técnica de producción gran escala de la δ -endotoxina, y su formulación, así como la liberación en campo (Reichelderfer, 1981). Por lo tanto, se considera que se debe diseñar un medio de producción adecuado para el desarrollo, y la formación de la espora y los cristales de *B. thuringiensis* pues de esto dependerá la toxicidad del mismo cristal; el medio de producción para la fermentación debe tener carbono, nitrógeno orgánico y sales minerales balanceadas adecuadamente para lograr el desarrollo, la formación de la espora y cristales con alta toxicidad (Galán et al.,

1996).

Existen diferentes reportes de la producción del bioinsecticida como el de Smith en el año de 1982 donde propago 3 cepas de *B. thuringiensis* en 6 medios de fermentación distintos, en la mayoría utilizó dextrosa y harina de soya, maíz, de semilla de algodón, caldo nutritivo, extracto de levadura, y casaminoácidos con minerales. Las cantidades de esporas por mililitro obtenidas variaron entre 1.00×10^4 a 8.90×10^8 , y los medios que obtuvieron mayores tasas de desarrollo, así como alto índice de toxicidad, eran los que contenían casaminoácidos, después los de harina de semilla de algodón y el extracto de levadura, sin que se detectara una diferenciación en toxicidad en los medios con reguladores o en los que carecían de ellos. Sin embargo, se determinó que se necesita elaborar ensayos para la evaluación de un producto y evitar solo reportar la cantidad de esporas obtenidas.

Pearson y Ward en 1988, en sus investigaciones de fermentaciones con *B. thuringiensis*, revisaron diferentes medios de cultivo para obtener inóculo y para producirlo, usando un método de dos etapas para preparar el inóculo, primeramente, un medio de cultivo con agua triptonada y sales, y segundo un medio que en gramos por litro contenía extracto de levadura (2.5), líquido de remojo de maíz (5), y melazas (5); logrando con estos últimos, densidades celulares superiores a 31×10^7 por mililitro. Para producirlo se utilizaron 5 medios descritos anteriormente por Drake y Smythe (1963), Megna (1963), Dulmage (1971) y CRC (1978); donde observaron cuentas viables de $0.3-2.5 \times 10^9$ / ml, con 90 % de rompimiento de la célula. Todos los medios tenían excesos significativos de carbohidratos y proteínas. Para seleccionarlos se realizaron cambios o variaciones en los medios y se determinó que el medio P3 (a) de Dulmage (1971), compuesto en gramos por litro de harina de soya (15), melaza (10), almidón (10) y CaCO_3 (1.0), alcanzó la más elevada productividad y actividad toxica contra insectos, con 3.00×10^9 células viables por mililitro y más del 90% de ruptura de la célula en una fermentación de dos días, logrando un potencial insecticida de $11.50-13.00 \times 10^4$ UTI/ ml, en matraz. Luego, en el escalamiento en planta piloto se obtuvieron 6.50×10^9 células viables por mililitro con más del 95% de formación de la espora. Concluyendo que los medios de cultivo con alto contenido proteínico inhibían la formación de la espora, y los medios que estimularon la esporulación y formación de bioinsecticida tenían altos niveles de carbohidratos y

proteínas, y de manera general hubo una buena correlación en la cantidad de esporas y la actividad tóxica contra insectos. Sikdar *et al* (1991), en una investigación para determinar las necesidades de minerales de *B. thuringiensis* para producir la δ -endotoxina, examinaron un grupo de concentraciones desde 0 a 1.5 gramos por litro; las adecuadas se encontraron de 1 g/l de K_2HPO_4 , 0.3 g/l de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, y 1.0 g/l para $CaCO_3$, estos dos últimos minerales, que coincide con lo reportado Vandekar y Dulmage, (1983). Además, reportaron que $CaCl_2$ obtuvo igual productividad de toxina que el $CaCO_3$, solo que existe un provecho al emplear este último, porque es posible utilizar como fuente de calcio y como agente neutralizante; por otro lado, no se encontró una correspondencia directa entre el desarrollo celular y la formación de δ -endotoxina. En su trabajo sobre las características de fermentación para producir δ -endotoxina de *B. thuringiensis*, con cepas procedentes de Egipto, Abdel-Hameed *et al*, (1991), utilizaron 6 medios, con la combinación de melaza, harina de soya y de semilla de algodón, en un rango de concentraciones de 2-5 % las dos finales y la primera de 0-2 %.

Las 6 composiciones obtuvieron un desarrollo aceptable y formación de esporas, la mezcla de 1% de melaza y 3 % de harina de soya, logró la mayor ganancia de toxina; concluyendo que la generación de toxina se afectó por la cantidad de melaza, y en menor medida por la cantidad de harina de soya, ya que el medio carente de melaza obtuvo un rendimiento de 55% menor que el que contenía 1 % de melaza.

Maldonado-Blanco en 1994, sembró 7 cepas de *B. thuringiensis* en 6 medios compuestos por materiales utilizados para la alimentación y nutrición animal y con productos de desecho de la agroindustria como la harina de pescado, de soya, gluten de maíz, pasta de soya, melazas, la harinolina, líquido de remojo de maíz y pasta en polvo; donde se registró un buen desarrollo y formación de esporas de las distintas cepas, pero los resultados de la evaluación de los cultivos en su totalidad contra estadios larvarios de cuarto estadio de *Ae. aegypti*, mostraron que los cultivos con mayor toxicidad eran los que se obtuvieron en el medio con melazas, pasta en polvo y líquido de remojo de maíz, este medio de cultivo se formuló luego para mejorar su capacidad toxica contra insectos y la producción, con 1% de melaza, 3% de pasta en polvo y 1% de líquido de remojo de maíz,

donde se logró la producción del extracto insecticida más potente, con una CL_{50} de 0.0317 mg/l, y una potencia de 4,400 unidades tóxicas internacionales /mg contra *Aedes aegypti*.

B. thuringiensis necesita de aminoácidos esenciales y otros compuestos de nitrógeno orgánico durante la etapa de desarrollo y formación de la espora (Galán, et al., 1996), en los medios de origen comercial se han utilizado proteínas a partir de semillas así como agua donde se cuece maíz, y algunas fuentes económicas como harinas de pescado, semillas de algodón, o de soya, garbanzo, haba, cacahuete y lentejas, líquido de remojo de maíz; residuos de levadura, sangre de res, suero de queso, ya que esta clase de compuestos pueden estimular la síntesis biológica de la δ -endotoxina con actividad tóxica contra insectos (Couch y Ross, 1980; Salama, et al., 1983). Respecto a los minerales se ha descrito que el manganeso, potasio, calcio y zinc son esenciales en el medio para producir la δ -endotoxina (Galán, et al., 1996). Dulmage en 1970 documentó el aislamiento de *B. thuringiensis* en un medio con glucosa, extracto de levadura, fosfato dipotásico y fosfato monopotásico que logró altas cantidades en la generación de la δ -endotoxina y recomendó utilizar fuentes económicas como las harinas de semilla de algodón y de soya. Goldberg en 1980 detallo un medio con dextrosa, extracto de levadura, peptona de soya, y líquido de remojo de maíz y sales como $ZnSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, HPO_4 , $CuCl_2$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, KCl y $MnSO_4$, logrando una elevada productividad en la formación de la espora y los cristales con efecto insecticida de óptima calidad. Los medios para la propagación de *B. thuringiensis* tienen que incluir sales necesarias para sintetizar energía, estimulación del desarrollo y la formación de esporas, así como la adición de extracto de levadura que es una fuente de vitaminas B, pues su carencia retrasa la formación de la espora y baja la producción de cristales y como resultado el efecto tóxico del complejo espora/cristal (Dulmage, 1981). Goldberg, en el año 1980, reportó un aumento en la cantidad de esporas al añadir extracto de levadura a un cultivo con enriquecimiento. Para *B. thuringiensis*, la mezcla de elementos nutricios tanto inorgánicos como orgánicos es clave en la formación de la δ -endotoxina altamente tóxica, así que el utilizar compuestos baratos como ingredientes del medio, es esencial en la mejora del proceso de generación de bioinsecticidas basados en *B. thuringiensis*. Por lo tanto, para el diseño de medios se recomienda:

- Ingredientes sencillos de utilizar o que no necesiten un tratamiento previo

- Capacidad para mejorar el desarrollo de *B. thuringiensis* sin causar daños a la calidad de la δ -endotoxina
- Ingredientes económicos y que se encuentren en abundancia (Dharmsthini, et al., 1985)
- Ingredientes fáciles de adquirir en la región (Dulmage H.T., 1990).

Una formulación que se basa en la unión de diversos nutrimentos para una variedad de *B. thuringiensis*, no siempre funciona para otra variedad, por lo tanto, la calidad de la δ -endotoxina está en dependencia del medio de cultivo o producción como del aislado de *B. thuringiensis* (Feitelson et al 1992). Aunque el medio de cultivo y el aislado *B. thuringiensis* no son los únicos requisitos a considerar para la generación del insecticida biológico, también hay otros aspectos a considerar en la fermentación como la temperatura ideal para el desarrollo de *B. thuringiensis* que está en los 28 a 32°C; oxígeno, velocidad de agitación para el abastecimiento de oxígeno necesario y también para impedir que se acumule calor e impedir que se reduzca o inhiba la toxicidad de los cristales; el pH de inicio debe estar entre 6.8-7.2 (Ortiz et al 1992), ya que al oxidar los hidratos de carbono se producen ácidos orgánicos, lo que se puede solucionar neutralizando con bases (Salama y Norris 1983).

En la siguiente Tabla 3 se presentan algunas materias primas de bajo costo que es posible utilizar en el diseño de medios para la obtención de la δ -endotoxina a base de Bti.

Tabla 3. Substratos naturales recomendados en el diseño de medios de cultivo para la producción de *Bacillus thuringiensis*.

Líquidos	Vegetales	Animales
Agua de coco*	Habas*	Harina de pescado*
Suero de leche*	Frijoles*	Sangre*
Melazas*	Semilla de algodón*	Residuo de rastro
Líquido de remojo de maíz*	Papa	
	Camote	
	Cáscaras de cítricos	
	Zanahorias	

Modificada de Dulmage 1990. *Productos con excelentes resultados. El resto no lo han sido o sin resultados aceptables, pero pueden ser útiles en combinación con otros sustratos.

Poopathi, S., & Abidha, S. (2009) mencionan que a pesar de las muchas ventajas de los bioplaguicidas basados en Bt y Bti, su aplicación es limitada debido a que son

costosos (Obeta y Okafor 1984; Poopathi et al. 2002b, 2003). A pesar de que la alta eficacia y especificidad de Bti es valiosa para controlar los mosquitos, el costo de cultivar y producir Bti, a través de un medio de cultivo bacteriano de laboratorio altamente refinado, es exorbitante. Dado que el costo de los materiales para la producción de Bti comprende 70% del costo final para producirlo, el costo de la materia prima es un factor importante para lograr un costo de producción razonable de Bti (Ejiofer, 1991). Seleccionar un medio de cultivo o materia primaria es fundamental para producir comercialmente estos plaguicidas de origen biológico. Para fomentar la producción comercial de bioplaguicidas, se recomienda el uso de materias primas menos costosas (Mummigatti y Raghunathan 1990). Varias materias primas (subproductos industriales y agrícolas) se han evaluado exitosamente, como medios alternativos, para producir Bs / Bti (Saalma et al. 1983a, b; Obeta y Okafor 1984; Ventosilla y Guerra 1997; Poopathi et al. 2002b, 2003; Poopathi y Anup Kumar 2003, Poopathi 2005).

El salvado de arroz desaceitado (DRB) de las industrias petroleras y los desechos de plumas de pollo (CFW) de las industrias avícolas son muy buenas fuentes de carbono, nitrógeno y otras fuentes de nutrientes para la síntesis microbiana de toxinas mosquitocidas. En estudios anteriores, de Poopathi se enfatiza el uso de desechos de plumas de pollo para la producción de bioplaguicidas (Poopathi y Abidha 2007). Así como también el uso de la combinación juiciosa de agroresiduos (DRB) y desechos avícolas (CFW) para la producción de una mayor cantidad de bioplaguicidas (Bs y Bti) en términos de producción de biomasa y toxinas, así como también el uso del medio nutritivo convencional con sales de extracto de levadura (NYSM, siglas en inglés). Este último, se menciona también como un medio sintético (medio nutritivo con sales de extracto de levadura, NYSM, siglas en inglés) el cual comprende de glucosa, peptona, extracto de carne, extracto de levadura, y sales minerales y puede emplearse en el proceso convencional de la producción de bioplaguicidas y posterior comercialización. A veces, los ingredientes adicionales deben añadirse para mejorar el proceso de esporulación, por lo que es importante seleccionar un medio de cultivo y la materia inicial para producir comercialmente este tipo de plaguicidas biológicos.

Aunque el potencial de Bti y sus toxinas derivadas en el control de mosquitos se

ha demostrado, la tecnología existente para crecer y producir formulaciones de Bti en biofermentador no es rentable. El avance hacia medios de producción más baratos facilitaría cultivar y producir Bti en una manera costo-efectiva. Obeta y Okafor (1984) prepararon 5 medios de crecimiento con semilla de leguminosas, la sangre seca de vaca, y minerales, y valoraron el crecimiento y la cantidad de toxinas con actividad toxica contra insectos de Bti que son eficientes contra el *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles gambiae*. También se han reportado otros medios de cultivo que contienen harina de pescado, soya y el licor macerado de maíz para producir Bti y *Bacillus sphaericus* (Salama et al. 1983, Kuppusamy 1990, Kumar et al. 2000). Otros autores han utilizado papas, cocos, harina de pescado, licor de maíz y plumas de pollo para producir bioplaguicidas (*Bacillus sphaericus* y Bti) (Foda et al., 1983; Salama et al., 1983; Ventosilla & Guerra, 1997; Poopathi et al., 2002; Poopathi y Abidha, 2008; Kuppusamy, 1990, Lee y Seleena, 1991).

Según Soccol et al. 2009, un bioinsecticida con alta especificidad, su fácil degradación en medio ambiente y los bajos costos de producción podría eliminar los impactos ecológicos, económicos y de salud de los compuestos químicos utilizados para el control (Brar et al., 2006). Sin embargo, la producción de bioinsecticida aún no se ha traducido en altos niveles de ventas en todo el mundo. Nuevos productos y formulaciones se están desarrollando para la comercialización (Hynes y Boyetchko, 2006). Las variables para fermentar y producir toxinas son muy importantes para la productividad óptima del producto. Evaluar diferentes sustratos es un elemento clave, que incluye la explotación potencial de productos de origen agrícola y residuos agroindustriales (Prabakaran y Balaraman, 2006). Diversos investigadores han buscado opciones para generar diversos medios de propagación más baratos para producir Bti como pesticida de origen biológico. Con frecuencia, los sustratos disponibles de forma local y que son económicos se han utilizado y han logrado resultados similares o superiores a los obtenidos en medios de origen comercial. Prabakaran y Balaraman (2006) intentaron desarrollar un medio basado en materias primas como harina de soya (*Glycine max*), cacahuete en polvo, y extracto de salvado de trigo en un fermentador de 100-L. Prabakaran et al (2008) hizo un medio rentable con agua de coco, que es una materia prima que es abundantemente disponible como un producto de desecho de la industria del aceite de coco. Yezza et al (2006) llevaron

a cabo la bioconversión de aguas residuales industriales y lodos de aguas residuales en un biopesticida en un fermentador piloto. Poopathi y Kumar (2003) utilizan la papa, el azúcar común y sustratos de Bengala. Poopathi y Abidha (2007, 2008) hicieron extracto de plumas y polvo de plumas, y exploraron la posibilidad de degradar plumas de pollo descartados de la industria donde se procesan aves de corral. Obeta y Okafor (1984) evaluaron la producción de propiedades insecticidas utilizando matraces de agitación, haciendo cinco variaciones del medio basal al añadir diferentes tipos de semillas de leguminosas, incluyendo torta de maní (*Arachis hipogeos*), caupí (*Vigna unguiculata*, variedad blanca), guisante de vaca (*Vigna unguiculata*, la variedad negra), semillas de soya (*Glycine soja*), y frijoles bambara (*Voandzeia subterraneas*). Ghribi et al (2007) aplicaron un nuevo medio compuesto de sólo almidón, soya y agua de mar diluida. Özkan et al. (2003) estudiaron diversos parámetros nutricionales y culturales que influyen en la síntesis de delta-endotoxina y encontró que, entre las fuentes de carbono, inulina, dextrina, maltosa, lactosa, sacarosa, suero de leche y el glicerol eran todos estimulantes, mientras que algunos como la glucosa, el almidón y melaza eran supresores.

2.6 TIPOS DE FORMULACIONES

Una variedad de formulaciones de Bti se han estudiado para el manejo de culícidos en laboratorio y campo (Yu-Tien et al. 1993, Tranvía et al. 1999, Tyanyun y Mulla 1999). La investigación y el desarrollo se centran en formulaciones con larga vida útil, facilidad de transporte, alta eficacia, la producción a gran escala, así como la seguridad para los organismos no objetivo (Sacerdote 1992). Por lo tanto, el desarrollo potencial de las formulaciones secas también ha resultado en aumento de la actividad residual de plaguicidas microbianos (Tamez-Guerra et al., 1996). Secar mediante pulverización es una metodología muy común en la industria de la encapsulación. También es uno de los métodos de encapsulación más antiguos que se ha utilizado desde la década de 1930 (Sparks y Jacobs 1999). El proceso de secado por pulverización es económica y flexible, utiliza equipos que está fácilmente disponible, y produce partículas de buena calidad (Shahidi y Han 1993). Aunque lo más a menudo del secado por pulverización se considera como un proceso de deshidratación, que puede ser utilizado como un proceso de encapsulado cuando se colocan materiales "activos" dentro de una matriz protectora

formados a partir de un polímero o de fusión (Risch 1995). Además, el secado por pulverización es a menudo favorecida para los materiales sensibles al calor tales como enzimas y proteínas (Okello et al., 1998). En otras subespecies de *B. thuringiensis* activa contra lepidópteros, formulaciones poliméricas y agentes fotoprotectores se han utilizado para encapsular el complejo de toxina de esporas para proteger la δ -endotoxina de factores ambientales (Behle et al. 1996, McGuirre et al. 1996, Ridgway et. al 1996, Castro-Franco et al. 1998, Tamez-Guerra et al. 1999). Sin embargo, estas formulaciones no se pueden utilizar contra las larvas de dípteros porque sus necesidades de comportamiento y hábitat son diferentes de los de las larvas de lepidópteros.

Según Gašić & Tanović, 2013., los gránulos (GR) son similares a las formulaciones de polvo, excepto que las partículas granulares son más grandes y más pesados. Las partículas gruesas (rango de tamaño desde 100 hasta 1000 micras para gránulos y 100 a 600 micras para micro gránulos) están hechos de materiales minerales (caolín, atapulgita, sílice, almidón, polímeros, fertilizantes secos y residuos vegetales del suelo) (Tadros, 2005). La concentración de ingrediente activo (organismos) en los gránulos varía de 5-20%. El ingrediente activo recubre el exterior de los gránulos o se absorbe en ellos. Productos granulares son muy simplemente fabricados, su ingrediente activo se procesa mediante una mezcla en polvo con poca agua para lograr un preparado pastoso que se extruye y se seca si es necesario. Otra forma de producción es la aplicación de un principio activo líquido a grueso material absorbente.

Después de que los gránulos están formados, se pueden recubrir con resinas o polímeros para controlar la velocidad de la eficacia de ingrediente activo después de la aplicación. Biopesticidas granulares se utilizan sobre todo para aplicar productos para el suelo con el fin de controlar las malezas, nemátodos e insectos que habitan suelo, o para la absorción de las plantas por la raíz. Una vez aplicado, gránulos liberan su ingrediente activo lentamente. Algunos gránulos requieren humedad del suelo para lanzar su ingrediente activo (Knowles, 2005; Lyn, 2010) (Gašić, S., & Tanović, B. 2013).

El objetivo de formular es lograr la mezcla perfecta de componentes de manera que el activo y los demás componentes formen un producto que sea inocuo, con efectividad, con facilidad de aplicación, amplia vida de anaquel, así como la capacidad de

ampliar su viabilidad en la naturaleza (Couch e Ignoffo, 1981; Connick et al., 1989; Rhodes et al., 1990). En los últimos años, varios científicos han empleado polímeros de origen natural (Morales Ramos et al., 2000). En el Anexo IX, se refieren algunos adyuvantes y aditivos, así como la función que hacen y ejemplos de cada uno (Satinder et al., 2006).

La selección del aditivo o adyuvante que se va a emplear se determina por el tipo de formulación que se desea obtener. La formulación deberá ajustarse a la variabilidad de la zona de aplicación como el follaje, agua, suelo; el tipo de patógeno y sus características, la viscosidad de la materia y la dimensión de la partícula, el mecanismo de acción ya sea por cavidad oral o de contacto, la interacción entre el hospedero, el patógeno y el ambiente (resistencia), así como el modo en que se aplicará y la cantidad en litros o kilogramos por hectárea (Satinder et al., 2006).

También Gašić & Tanović, 2013., menciona que la suspensión de cápsulas (CS) es una suspensión estable de micro-encapsulado ingrediente activo en una fase continua acuosa, destinada a la dilución con agua antes de su uso. Bio-agente como su ingrediente activo se encapsula en cápsulas (revestimiento) hechas de gelatina, almidón, celulosa y otros polímeros. De esa manera el bio-agente está protegida de las condiciones ambientales extremas (radiación UV, la lluvia, temperatura, etc.), y su estabilidad residual se mejora debido a la lenta liberación (controlada).

El método más frecuentemente aplicado de encapsulación utiliza el principio de la polimerización interfacial. La encapsulación en microcápsulas se ha utilizado ampliamente para dar tamaño más pequeño y de alta eficacia para formulaciones de biopesticidas fúngicas (Winder, 2005; Brar, 2006). Suspensiones en microcápsulas necesitan ser estabilizados con tensioactivos y espesantes en la misma manera que se utilizan concentrado en suspensión y aditivos similares. A pesar de los beneficios claros de esta formulación de liberación controlada, su desarrollo comercial es bastante lento. El lento avance se debe en parte a la complejidad de la formulación y en parte a su alto costo de producción (El-Sayed, 2005; Chen, 2013).

Armengol et al (2006) preparó una formulación de Bti, a partir de polvo técnico,

producido a partir de una cepa de Bti, el cual alcanzó una CL50 de 4.34 ng/ml y con este formularon una tableta larvicida experimental (XL-47) de 190 mg, la cual fue diseñada conteniendo 4.8% (p/p) de polvo técnico y 95.2% (p/p) de ingredientes inertes utilizados en la industria alimenticia. El polvo técnico contenía 2.1×10^5 unidades formadoras de colonia (UFC) de Bti /mg. Las tabletas eran cilíndricas (8.1 mm de diámetro por 4.2 mm de altura). La duración de la inhibición de la formación de pupas demostrado por la tableta desarrollada en laboratorio probó ser mayor bajo condiciones de laboratorio y de campo. La actividad residual (>80% reducción en el número de pupas) registrada en contenedores de 50 litros de agua con tan sólo una tableta, duró 16 semanas en condiciones experimentales a nivel laboratorio y por 12 semanas en condiciones a nivel de campo. Esta nueva formulación de la tableta proporcionó un efecto larvicida mayor que otros formulados anteriores (Kroeger et al. 1995, Melo-Santos et al. 2001; Toma et al. 2003; Mulla et al. 2004; Vilarinhos and Monnerat 2004).

Araújo et al (2007) en su estudio, utilizó muestras de polvo técnico (TP), con un promedio de CL50 de 0.299 mg/l y una tableta (T) que contenía 15% (p/p) del ingrediente activo (AI) de diferentes lotes de producción de la cepa IPS82 de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), provistas por “Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda” (BIOTICOM) en Brasil. El proceso de la producción involucró el uso de medio para crecimiento bacterias que contenía sales minerales, glucosa y líquido del remojo de maíz, y la fermentación discontinua sumergida (batch). El cultivo fue producido en un fermentador con agitación y la biomasa fue recuperada utilizando la técnica de floculación/sedimentación para obtener el AI (complejo esporas y cristales) de acuerdo a la metodología descrita por Luna et al (2002), con algunas modificaciones. Lo obtenido del fermentador fue centrifugado y secado a 35°C para conseguir el polvo primario (PP), comprimiendo el AI y el medio sólido. Ingredientes adyuvantes fueron agregados, incluyendo un agente de protección solar (sin mención de que producto era) para obtener el TP. El mismo proceso fue repetido para producir 10 lotes del producto. 250 mg de TP fue comprimido para hacer cada tableta. Los resultados relativos a la persistencia de la actividad larvicida en recipientes alejados de la luz solar revelaron que todos los tratamientos de polvo técnico y Tableta persistieron para eliminar todas las larvas durante el período experimental de 180 días, después de un solo tratamiento, y sin diferencia significativa entre ellos ($p=1$). En su último período de

evaluación, un nuevo lote fue agregado a los contenedores a medida que se encontraba si el producto seguía permaneciendo tóxico para las larvas en etapas ya más avanzadas, y se observó mortalidad de 99.1% demostrando que la toxicidad del producto permanecía incluso después de 180 días. Sin embargo, cuando fueron expuestas a la luz solar, la actividad larvicida residual en recipientes con tratamientos de Polvo Técnico y Tableta continuó por 11 semanas únicamente (febrero-mayo 2005), con un promedio de mortalidad de larvas que fluctuó entre 55% y 100%. Posteriormente, un lote examinado durante septiembre-octubre 2005, una disminución progresiva en el promedio de la mortalidad fue observado después de la segunda semana, con una completa pérdida de actividad larvicida después de cuatro semanas. El mayor número de horas de luz solar por día fue observado en este período. Cuando el mismo producto fue examinado durante Noviembre/2004 a Marzo/2006, el promedio de la mortalidad larval fluctuó entre 66% a 97% por 17 semanas. En todos los tratamientos realizados bajo luz solar, un 100% de mortalidad promedio fue observado únicamente durante la primera semana de aplicación.

2.7 BIOINSECTICIDAS MÁS UTILIZADOS

El descubrimiento de la actividad patógena de Bti contra los vectores dípteros (mosquitos y moscas negras) fue seguido rápidamente por aplicaciones. A partir de los años 80, gracias a los esfuerzos combinados de la Organización Mundial de la Salud (OMS), otras instituciones y numerosos laboratorios de investigación, se desarrollaron varios programas internacionales para el uso de Bti y *Bacillus sphaericus* (Bs) (Lecadet, 1996). La formulación de polvo primario de Bti no tuvo virtualmente ningún efecto residual contra las larvas de mosquito más allá de la aplicación, aunque la delta-endotoxina permaneció químicamente estable en aguas neutras y ácidas (Sinègre y al., 1980). Numerosos ensayos y observaciones de campo muestran una rápida disminución de la eficacia en pocos días en condiciones abiertas y una baja actividad residual después. Esta disminución se debe principalmente a la rápida sedimentación fuera de la zona de nutrición de las larvas, la inactivación por luz ultravioleta de los residuos de triptófano esenciales para la actividad insecticida (Pusztai et al., 1991; Padilla et al., 2006) o la degradación en áreas de agua contaminadas o altamente concentrada en materia orgánica. Si varios autores han informado sobre el reciclaje de Bti en cadáveres de larvas en

condiciones controladas o simuladas (Aly et al., 1985; Khawaled et al., 1990; Boisvert & Boisvert, 1999), la evidencia de dicho reciclaje en condiciones de campo natural es escasa (Tilquin et al, 2008; de Melo-Santos et al, 2009). Numerosos artículos revisados por Lacey (2007) han estudiado los factores bióticos y abióticos que influyen en la actividad larvicida de Bti, es decir, la susceptibilidad específica de las especies objetivo y sus estrategias de alimentación, la tasa de ingestión, la densidad de larvas y su edad, la dosis, temperatura, radiación solar, profundidad del agua, turbidez, contenido de taninos y orgánicos, cobertura vegetal, etc. Si las primeras formulaciones con base en Bti fueron un polvo técnico más o menos difícil de usar por la mala miscibilidad con el agua, varios tipos de formulaciones se desarrollaron desde 1981, adaptados a las diferentes especies de mosquitos y hábitats a tratar (Anexo X). (Despres, L., Lagneau, C., & Frutos, R. 2011).

Los larvicidas que contienen Bti incluyen Aquabac®, Teknar® y Vectobac®. Estos productos están disponibles en forma de suspensiones acuosas, concentrados fluidos, tabletas de aplicación directa, gránulos y gránulos dispersables en agua.

La eficacia de las formulaciones de Bti se ha demostrado en una variedad de hábitats contra una multitud de especies de mosquitos (Anexo XI). Actualmente es el agente de control microbiano más utilizado de mosquitos y moscas negras (Lacey 2007).

Los insecticidas más utilizados en México son los del tipo piretroides, temefos, spinosad, malatión y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. (Fernández-Salas et al 2015) (CENAPRECE 2015).

Un insecticida se puede introducir en el mercado comercial de diversas maneras, esto puede depender del hábitat de la plaga que se requiere controlar o del método para aplicarlo. Los tipos más frecuentes de formulaciones son del tipo granular, polvo, polvos humectables, líquidos que se emulsionan y los sistemas para liberar controladamente. Se considera que las formas deshidratadas poseen mayor estabilidad durante el almacenamiento, mientras que las que están en estado líquido son más baratas (Fernández et al., 2002). Actualmente una gran diversidad de bioinsecticidas están al alcance de manera comercial para el control de una amplia cantidad de plagas de tipo agrícola, forestal y para plagas que son vectores de enfermedades (Satinder et al., 2006).

Ramírez-suero et al (2005) menciona que se ha estudiado una variedad de formulaciones de Bti para el control de mosquitos en condiciones de laboratorio y de campo (Yu-Tien et al. 1993, Tram et al. 1999, Tyanyun y Mulla 1999). Los esfuerzos de investigación y desarrollo se centran en formulaciones con una larga vida útil, transportabilidad, alta eficacia, producción a gran escala y seguridad para organismos no objetivo (Priest 1992). Por lo tanto, el desarrollo potencial de formulaciones secas también ha resultado en un aumento de la actividad residual de los pesticidas microbianos (Tamez-Guerra et al. 1996). El secado por aspersión es el método de encapsulación más utilizado en la industria. También es uno de los métodos de encapsulación más antiguos que se ha utilizado desde la década de 1930 (Sparks y Jacobs 1999). El proceso de secado por aspersión es económico y flexible, utiliza equipos que están fácilmente disponibles y produce partículas de buena calidad (Shahidi y Han 1993). Aunque la mayoría de las veces el secado por aspersión se considera un proceso de deshidratación, se puede utilizar como un proceso de encapsulación cuando atrapa materiales "activos" dentro de una matriz protectora formada a partir de un polímero o diluyente (Risch 1995). Además, el secado por aspersión a menudo se favorece para materiales sensibles al calor como enzimas y proteínas (Okello et al. 1998). En otras subespecies de *B. thuringiensis* activas contra lepidópteros, se han utilizado formulaciones poliméricas y agentes fotoprotectores para encapsular el complejo de espora-toxina para proteger la δ -endotoxina de factores ambientales (Behle et al. 1996, McGuirre et al. 1996, Ridgway et al. 1996, Castro-Franco et al. 1998, Tamez-Guerra et al. 1999). Sin embargo, estas formulaciones no se pueden utilizar contra las larvas de dípteros porque su comportamiento y necesidades de hábitat son diferentes a los de las larvas de lepidópteros

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en nuestro país y específicamente en nuestro estado, los virus Dengue, Chikungunya y Zika, provocan fiebres y enfermedades víricas muy importantes, las cuales son transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti*, que se presenta cada temporada y hasta podría decirse que está siempre presente, por lo cual se ha convertido en un tema prioritario para las autoridades de salud ya que el control de estos vectores es una de las estrategias más importantes en el control de la enfermedad. Aunado a esto, un tema que ha ido tomando importancia y que favorece la dispersión de estos vectores, es el calentamiento global que ya está ocurriendo en el planeta presentándose sus efectos en algunas regiones que anteriormente eran templados o fríos y que ahora se han vuelto más calientes; esto trae como consecuencia el aumento y desarrollo de diversas plagas entre las que se encuentran los mosquitos. Además, en diversos reportes registrados en la literatura ya existen mosquitos resistentes a los insecticidas químicos usados para su control y que conforme pasa el tiempo, el uso y contacto con ellos aumentará el número de sustancias hacia las cuales se tenga el desarrollo de la resistencia.

4. HIPÓTESIS

“Es posible el diseño y la elaboración de formulaciones de Bti que sean efectivas para el control de larvas de *Aedes aegypti*, que mantengan la actividad tóxica por periodos de tiempo largos y así la actividad larvicida se conserve, aún y cuando sean expuestos a las condiciones ambientales.”

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Producción, diseño y evaluación de formulados bioinsecticidas con base en *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir el extracto insecticida de Bti en nuevos medios de cultivo compuestos por ingredientes solubles, así como en el medio de referencia con base en harina de soya y liquido de remojo de maíz, a nivel de matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- Recuperar el extracto insecticida producido en los medios anteriores.
- Evaluar y comparar la actividad tóxica de los extractos insecticidas producidos en los dos nuevos medios de cultivo elaborados y uno de referencia, contra larvas de 3er estadio tardío de *Aedes aegypti*.
- Diseñar y elaborar dos tipos de formulaciones de Bti, granulares y tabletas.
- Evaluar a nivel laboratorio los formulados elaborados contra larvas de *Aedes aegypti*.
- Evaluar a nivel semicampo las mejores formulaciones contra larvas de *Aedes aegypti* criadas en laboratorio.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CEPA.

Se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 225, que se encuentra en el cepario del Instituto de Biotecnología y que fue previamente seleccionada por Maldonado-Blanco (2001) en un estudio anterior.

6.2 MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA.

La cepa se conservó a corto plazo en agar nutritivo inclinado y también liofilizada en papel filtro a largo plazo.

6.3 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.

Para la producción del complejo espora-cristal se utilizaron dos medios de cultivo líquidos nuevos y un medio de cultivo de referencia el cual ya ha sido utilizado para la producción de otras serovariedades de Bt (Maldonado-Blanco 2001). La composición de los medios de cultivo fueron los siguientes, mostrados en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo utilizados para la producción del extracto insecticida de Bti 225 por fermentación.

	Ingredientes g/l		
	Medio de Referencia	Medio soluble 1	Medio soluble 2
Harina de Soya	10	0	0
Sólidos de remojo de maíz	10	10	0
Melaza	10	0	0
Jarabe de maíz	0	10	0
Extracto de levadura	0	10	0
Harina de Girasol	0	0	10
Sacarosa	0	0	10
CaCO ₃	1	1	1
MgSO ₄	0.3	0.3	0.3
ZnSO ₄	0.02	0.02	0.02
FeSO ₄	0.02	0.02	0.02
MnSO ₄	0.02	0.02	0.02
pH inicial	7	7	7

El medio de referencia fue compuesto por Harina de Soya comercial 1%, Polvo de Remojo del Maíz 1% y Melaza 1% se utilizó una solución de NaOH y HCl al 1% para ajustar el pH del medio de cultivo.

Para el nuevo medio soluble 1 se utilizó Jarabe de maíz (Glumex®)1%, Polvo de remojo de maíz (CP Ingredientes®) 1% y extracto de levadura 1%, más las sales minerales en g/l: CaCO_3 , 1.0, MgSO_4 , 0.3, y ZnSO_4 , FeSO_4 , y MnSO_4 en concentraciones de 0.02 c/u, $\text{pH}=7.0 \pm 0.2$., el pH se ajustó también a 7.0 ± 0.2 .

El nuevo medio de cultivo 2, con base en Harina de semilla de Girasol y Sacarosa (azúcar comercial) al 1% se llevó a cabo de la siguiente manera; Como primer paso se preparó la harina de semilla de girasol. Para ello se adquirió medio kilo de semillas de girasol sin cáscara las cuales fueron molidas en licuadora hasta pulverizarlas y conseguir la consistencia de polvo o harina. Se pesaron 10 gramos de esta harina y se homogenizaron en 1000 ml de agua destilada, se agregó sacarosa al 1%, más las sales minerales en g/l: CaCO_3 , 1.0, MgSO_4 , 0.3, y ZnSO_4 , FeSO_4 , y MnSO_4 en concentraciones de 0.02 c/u, $\text{pH}=7.0 \pm 0.2$., el pH se ajustó también a 7.0 ± 0.2 . Se utilizaron las mismas soluciones de NaOH y HCl al 1% para ajustar el pH del cultivo.

6.4 CONDICIONES DE FERMENTACIÓN.

Se utilizaron 100 ml de cada uno de los medios que se colocaron en matraces Erlenmeyer bafleados con capacidad de 500 ml, los cuales fueron sometidos a las condiciones de 30°C de temperatura, con agitación de 200 rpm y pH inicial de 7.0 ± 0.2 . Se mantuvieron durante 72 horas o hasta que se observó al microscopio 80 a 100% de esporulación. De cada uno de los medios se corrieron 4 repeticiones y los experimentos se hicieron en 3 ocasiones.

6.5 INÓCULO

Cada uno de los medios se inoculó con un cultivo de Bti de 24 horas de edad, crecido en agar nutritivo inclinado incubado a 30° C. Se emplearon dos asadas para cada matraz.

6.6 OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL.

Al concluir la fermentación, se recuperaron los extractos insecticidas según el método de coprecipitación de Dulmage et al (1970) con lactosa y acetona. Se molieron en mortero y se guardaron en frascos plásticos hasta su posterior evaluación.

6.7 ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LA CRÍA DE *Aedes aegypti*.

A partir de una papeleta con huevecillos, viable y obtenida recientemente, se inició la cría. Se colocó un litro de agua a hervir, se dejó enfriar y ya que estaba tibia y atemperada al ambiente, esta agua se depositó en una charola de plástico y se introdujo una o dos papeletas con huevecillos (Figura 1), y se le agregó una pizca de extracto de levadura. Cuando ya se observaron las larvas de primero y segundo estadio, se añadió alimento molido para perro (croqueta) en la charola y se agregó más agua, la suficiente para permitir el libre movimiento y así favorecer el desarrollo de las mismas. El agua que se agregó a la charola, fue agua potable del grifo que se dejó reposar y así declorarse con 24 horas de anticipación.

Cuando se observaron los estadios de pupa, se traspasaron a la cámara de emergencia, con agua reposada y sin alimento. Las pupas fueron transferidas cuidadosamente con ayuda de pipetas Pasteur desechables recortadas de la punta para no dañarlas.

Una vez que se observaron los mosquitos adultos en la cámara de emergencia (Figura 2), se traspasaron a una jaula de aluminio con dimensiones de 60x60x60 cm. (Figura 3), donde se alimentaba a los mosquitos macho adultos con compresas de algodón empapadas con agua con miel y se expuso el brazo de una persona no enferma ni bajo tratamiento de antibióticos para el consumo de sangre necesario por parte de las hembras de mosquito adulto (Figura 4). Dentro de la jaula se colocó una papeleta siempre humedecida en una charola más pequeña, para que ahí ocurriera la oviposición y así poder recolectar los huevecillos para bioensayos posteriores, así como también la continuación necesaria para el desarrollo y mantenimiento de la cría.



Figura 1. Eclosión de huevecillos, primeros estadios larvales.



Figura 2. Estadío de pupa en cámara de emergencia y estadío de mosquito adulto.



Figura 3. Jaula con cría del mosquito adulto *Aedes aegypti* y charola con papeleta para la oviposición.



Figura 4. Alimentación del mosquito adulto hembra.

6.8 EVALUACIÓN DEL BIOINSECTICIDA DE BTI PRODUCIDO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

Se realizó una selección preliminar de los extractos producidos en los diferentes medios de cultivo, para determinar el rango de concentraciones que iban a ser utilizados. Para ello todos los extractos producidos en las corridas se probaron a las concentraciones de 1, 0.05 y 0.01 mg/l (por triplicado) y se determinó el porcentaje de mortalidad presentado contra *Aedes aegypti*. Se seleccionaron posteriormente los extractos más tóxicos producidos en los diferentes medios de cultivo, mediante un análisis de varianza y diferenciación de medias al nivel 0.05. También se determinó el rango de concentraciones para la determinación de la CL₅₀.

6.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀)

A los extractos obtenidos se les determinó la CL₅₀, mediante el método propuesto por De Barjac y Larget-Thiery (1985). Los bioensayos preliminares fueron efectuados de la siguiente manera: A partir de una suspensión de 50 mg de extracto bioinsecticida suspendido en 10 ml de agua destilada en un tubo de ensayo, se agregaron 10 perlas de vidrio y se agitó durante 120 segundos en vórtex; posteriormente se tomó un volumen de 0.1 ml de esta suspensión y se añadió a otro tubo de ensayo con 9.9 ml de agua destilada y se agitó en vórtex, obteniendo así una solución stock (50 mg/l).

De la solución stock de cada uno de los tres extractos insecticidas obtenidos a partir de los tres medios de cultivo, 1) el **medio de referencia** con base en Melaza y Soya, el 2) **medio nuevo soluble 1** con base en Jarabe de Maíz y Extracto de Levadura, y el 3) **medio nuevo 2** con base en Harina de Girasol y Sacarosa, se tomaron las cantidades correspondientes de 150 µl (0.5 mg/l) y 15 µl (0.05 mg/l) para depositar en vasos plásticos desechables con 150 ml de agua destilada, que serían utilizados para probar contra las larvas de *A. aegypti*.

Para cada tratamiento, se realizaron dos repeticiones (vasos) de cada concentración. En cada una de las repeticiones, así como el control se utilizaron grupos de 25 larvas de *Aedes aegypti* de 3er estadio tardío. Cabe mencionar que los grupos de 25 larvas fueron seleccionados previamente para lograr que fueran grupos uniformes donde

se observaron larvas del mismo tamaño y edad según las características correspondientes al tercer estadio. Los controles se probaron con agua destilada únicamente.

Las condiciones de prueba se mantuvieron a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y 50% de humedad relativa durante 24, 48 y 72 horas, al cabo de la cuales se registraron las lecturas de individuos muertos. Los bioensayos se repitieron al menos tres veces, en días diferentes.

Los datos de mortalidad se sometieron al Análisis de varianza, al nivel 0.05, y diferenciación de medias mediante el Método de Diferencia Mínima Significativa, utilizando el Programa Estadístico de Olivares-Saénz 1994.

A partir de los resultados preliminares obtenidos se realizaron nuevos bioensayos donde se prepararon nuevas concentraciones de extractos insecticidas, tomando en cuenta la mortalidad obtenida con las concentraciones de 0.05 y 0.5 mg/L. (Figura 5)

De esta manera las nuevas concentraciones a probar fueron las siguientes: 0.08, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 y 1 mg/L de los extractos insecticidas obtenidos en medio soluble 1 (Jarabe de maíz, extracto de levadura). Para los extractos del medio de referencia (melaza-soya) se usaron las concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 y 1 mg/L, para así poder obtener la CL_{50} . De cada concentración se hicieron 4 repeticiones incluyendo el control no tratado y los bioensayos se repitieron 3 veces en días diferentes. Si la mortalidad del control excedía el 10% de mortalidad era descartado.

Los resultados de mortalidad obtenidos fueron sometidos al programa de Probit computarizado (United States Applied and Environmental Health 1989), mediante el cual se obtiene la CL_{50} y CL_{90} , la pendiente de línea de regresión y análisis de Chi cuadrada (X^2).



Figura 5. Una de las repeticiones del bioensayo preliminar con 2 concentraciones.

6.10 FORMULACIÓN DEL BIOINSECTICIDA

Del extracto insecticida que resultó más tóxico se realizaron dos tipos de formulaciones: granulares y tipo tabletas.

6.10.1 Tabletetas

Se llevaron a cabo cuatro variedades de las formulaciones en forma de tableta, las cuales contenían el ingrediente activo de Bti al 10 y 15% y dos polímeros: Goma acacia y Pectina al 5 y 10%. Estos polímeros tienen propiedades de rápida y lenta disolución respectivamente, por lo cual actuaron como matriz donde se embebió el ingrediente activo y fue así que de esta manera se aprovecharon dichas propiedades para prolongar la liberación del mismo. Se ajustó al 100% con Almidón de maíz y Carbonato de Calcio a la misma concentración, los cuales fungieron como material acarreador. Se empleó una prensa manual para proporcionarle forma de tableta al formulado. (Figura 6 y Tabla 5).

Tabla 5. Ingredientes de formulados de *Bacillus thuringiensis israelensis* preparados como tableta.

Ingrediente (% p/p)	Tableta 1	Tableta 2	Tableta 3	Tableta 4
Goma acacia	0%	0%	10%	5%
Pectina	10%	5%	0%	0%
Carbonato de calcio	40%	40%	40%	40%
Almidón	40%	40%	40%	40%
Bti	10%	15%	10%	15%

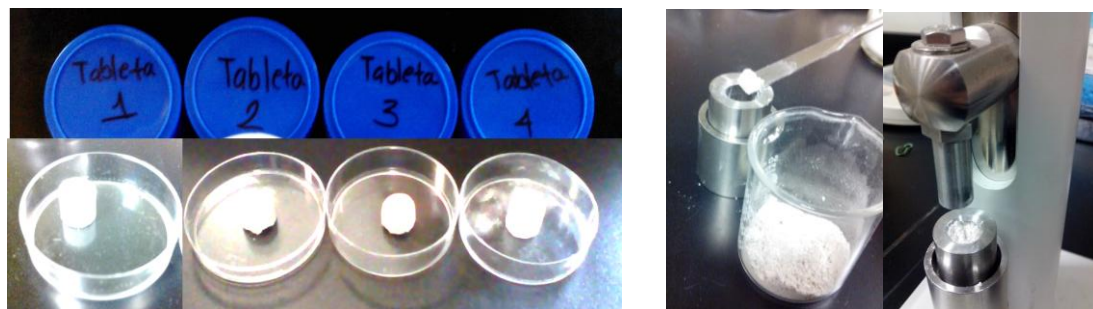


Figura 6. Producción de las formulaciones en forma de tableta por medio de una prensa manual.

6.10.2 Granulados

En la siguiente Tabla 6 se muestra la composición de las formulaciones granulares. En el mismo sentido que las tabletas, también fueron aprovechadas las propiedades de los polímeros de rápida y lenta disolución, siendo estos añadidos de manera estratégica en forma de capas, para de igual forma poder prolongar la liberación del ingrediente activo, como se muestra a continuación en la siguiente Figura 7.

Tabla 6. Ingredientes de formulados granulares de *Bacillus thuringiensis israelensis* elaborados. (Porcentaje en peso)

Ingrediente (% en p/p)	Granulado 1	Granulado 2	Granulado 3
Goma acacia	0	5	6.6
Pectina	10	5	3.3
β caroteno	1	1	1
Corcho	79	79	79
Bti	10	10	10

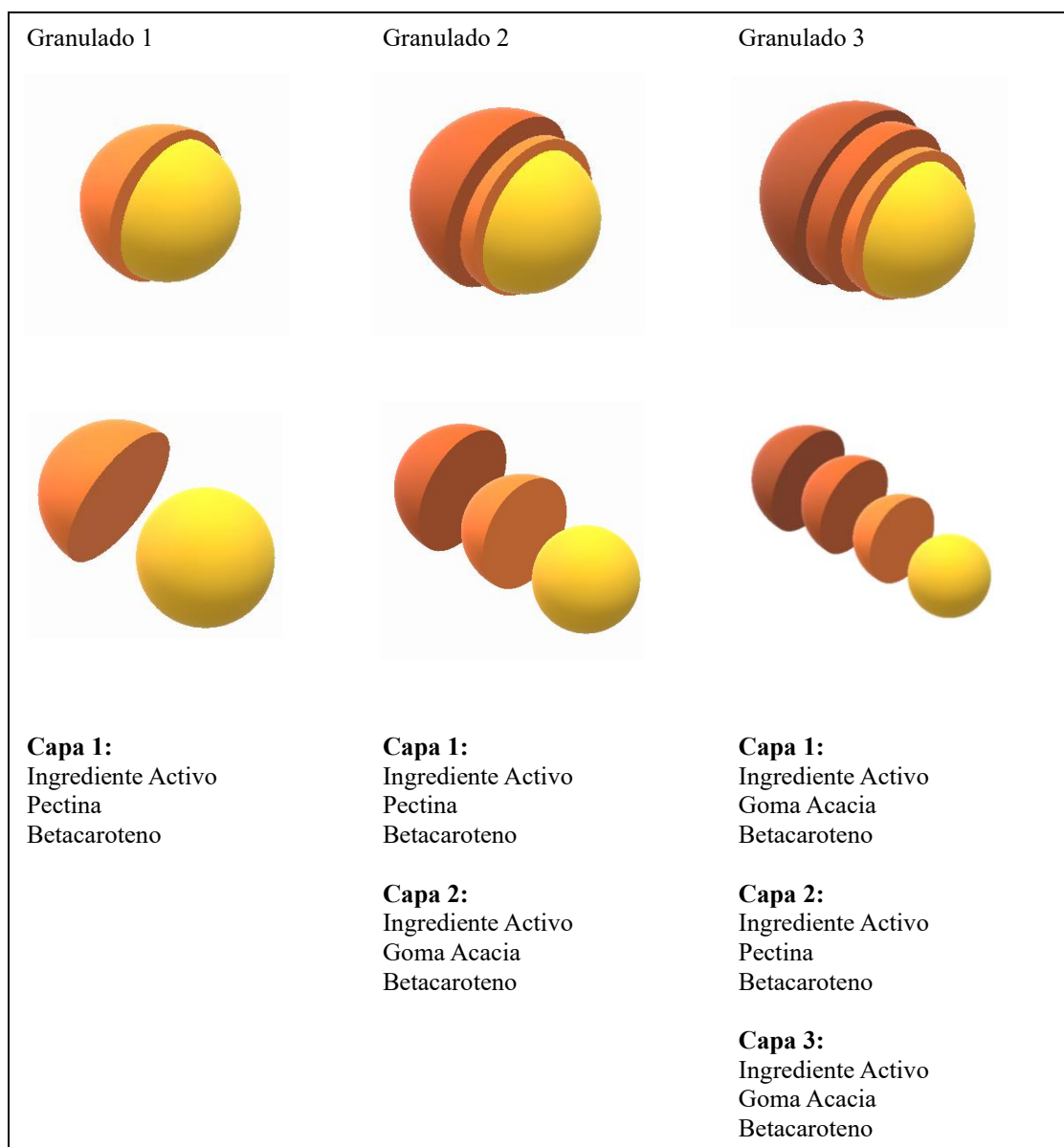


Figura 7. Esquema de la composición de las formulaciones granulares donde se muestra el amaranto como material acarreador y flotante siendo recubierto por capas del ingrediente activo, los polímeros y el fotoprotector.

6.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA RESIDUAL EN LABORATORIO DE LOS FORMULADOS PREPARADOS.

Para determinar la actividad residual, se llevaron a cabo una serie de bioensayos donde se utilizaron las formulaciones elaboradas con el extracto insecticida de Bti obtenido a partir del medio de cultivo nuevo soluble 1 con base en extracto de jarabe de maíz, líquido

de remojo de maíz y extracto de levadura: Tableta 1, Tableta 2, Tableta 3, Tableta 4, Granulado 1, Granulado 2, Granulado 3. Se incluyó para comparación, un Producto Comercial (VectoBac®), y el extracto insecticida sin formular, probados bajo las mismas condiciones y misma concentración que para los formulados. Se utilizó un control (sin extracto insecticida) para cada uno de los tratamientos. En la siguiente tabla 7 se describen cada uno de los nueve tratamientos:

Tabla 7. Tratamientos utilizados en la determinación de la actividad tóxica residual

Tratamiento	Composición	% de IA	[Conc.] utilizada de IA	Dosis del formulado
Tableta 1	10% de Pectina, 40% de Almidón y 40% de Carbonato de Calcio.	10%	1.4136 mg/l	16 mg/l
Tableta 2	5% de Pectina, 40% de Almidón y 40% de Carbonato de Calcio.	15%	1.4136 mg/l	10.6 mg/l
Tableta 3	5% de Pectina, 40% de Almidón y 40% de Carbonato de Calcio.	10%	1.4136 mg/l	16 mg/l
Tableta 4	5% de Goma Acacia, 40% de Almidón y 40% de Carbonato de Calcio.	15%	1.4136 mg/l	10.6 mg/l
Granulado 1	10% de Pectina, 1% de Betacaroteno y 79% de Amaranto.	10%	1.4136 mg/l	16 mg/l
Granulado 2	5% de Pectina, 5% de Goma Acacia, 1% de Betacaroteno y 79% de Amaranto.	10%	1.4136 mg/l	16 mg/l
Granulado 3	3.33% de Pectina, 6.66% de Goma Acacia, 1% de Betacaroteno, 79% de Amaranto.	10%	1.4136 mg/l	16 mg/l
(VectoBac®).	Producto Comercial, insecticida biológico: gránulos solubles en agua. 62.60% ingredientes inertes: preservantes y dispersantes.	37.40%	1.4136 mg/l	40.54 mg/l
IA sin formular	Complejo espora cristal de Bti obtenido del medio nuevo 1 con base en polvo del remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura. Utilizar: 3 veces la CL ₅₀ (0.4712 mg/l)	100%	1.4136 mg/l	--

Estos bioensayos se llevaron a cabo a lo largo de 1, 2, 3, 7, 10, 14, 18, 21, 24, 28, 35 y 42 días en condiciones de laboratorio (temperatura 20-35°C y 50-80% de humedad

relativa). El método de bioensayo fue similar al de Margalit et al (1984), con algunas modificaciones: Se colocaron recipientes de poliestireno (15.6 x 13.8 x 9 cm profundidad), a cada uno se agregó 1 litro de agua potable declorada y 3 veces la CL_{50} (0.4712 mg/l), es decir 16 mg/l de los formulados que contenían 10% de Ingrediente Activo y 10.6 mg/l de los formulados que contenían 15% de Ingrediente Activo. Del formulado comercial fue añadida la cantidad de 40.54 mg/l. Cada tratamiento se aplicó con cuatro repeticiones por tratamiento y un control no tratado. A cada recipiente se le colocaron 25 larvas de *Aedes aegypti* de 3er estadio; una vez registrada la mortalidad larval a las 24 horas postratamiento, tanto larvas vivas como larvas muertas fueron cuidadosamente removidas con una pipeta de plástico, contabilizadas y descartadas para luego colocar un nuevo lote de 25 larvas y continuar con los días posteriores del bioensayo. Los datos que se obtuvieron, corregidos contra controles, se sometieron al análisis de varianza de un factor en un diseño de bloques al azar para cada día de muestreo y se determinaron las diferencias de mortalidad entre los distintos tratamientos mediante la prueba de comparación de medias con el método de Tukey, al nivel 0.05.

6.12 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO Y FORMULADOS.

Para esta determinación, el ingrediente activo y los formulados (Tabla 7) se irradiaron durante 72 horas con una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm λ y una distancia de 5 cm. Se colocaron recipientes de poliestireno (15.6 x 13.8 x 9 cm profundidad), a cada uno se agregó 1 litro de agua potable declorada y 3 veces la CL_{50} (0.4712 mg/l), es decir 16 mg de los formulados que contenían 10% de Ingrediente Activo y 10.6 mg de los formulados que contenían 15% de Ingrediente Activo (Tabla 7). Cada tratamiento se aplicó con cuatro repeticiones por tratamiento y un control no tratado; así mismo para el extracto y los formulados no irradiados. Los bioensayos se realizaron en el laboratorio, a una temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y 50-80% de humedad relativa. A cada recipiente se le colocaron 25 larvas de *Aedes aegypti* de 3er estadio; una vez registrada la mortalidad larval a las 24 horas postratamiento, tanto larvas vivas como larvas muertas fueron cuidadosamente removidas con una pipeta de plástico, contabilizadas y descartadas. Estos datos se promediaron y expresaron como porcentaje de mortalidad: No irradiado, Irradiado y Porcentaje de Reducción. Los resultados se analizaron mediante una prueba T

de Student al nivel 0.05, mediante un programa computarizado (Olivares-Sáenz, 1994) para determinar diferencias entre extracto irradiado y sin irradiar.

6.13 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ALMACENAMIENTO EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS FORMULADOS DE BTI (TABLETAS Y GRANULADOS).

Los formulados preparados y el ingrediente activo sin formular (obtenido a partir del medio compuesto por polvo del remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura), se almacenaron a temperatura ambiente (23-25 °C) sin exposición a la luz para observar el efecto del almacenamiento sobre la actividad tóxica. De cada formulado se tomaron lotes a los 0, 25, 60, 90, 120, 240 y 365 días, con los cuales se realizaron bioensayos de la actividad tóxica utilizando 3 veces la CL_{50} ($0.4712 \text{ mg/l} \times 3 = 1.4136 \text{ mg/l}$), es decir 16 mg de los formulados que contenían 10% de Ingrediente Activo y 10.6 mg de los formulados que contenían 15% de Ingrediente Activo. Ya que se prepararon las alícuotas de cada tratamiento, éstas fueron añadidas en vasos de poliestireno con 1 litro de agua potable declorada, a las cuales posteriormente se les adicionaron los lotes de 25 larvas, las cuales fueron previamente seleccionadas. Para cada tratamiento se llevaron a cabo 4 repeticiones y un control. Después de 24 horas de exposición, se cuantificaron las larvas vivas y muertas, y estos datos fueron promediados y expresados como porcentaje de mortalidad. Los datos se analizaron mediante Análisis de varianza para un factor y diferenciación de medias por el método de Tukey al nivel 0.05.

6.14 PRUEBAS DE CAMPO DE LOS FORMULADOS SELECCIONADOS.

6.14.1 Preparación de los tratamientos.

Como no se presentó una colonización natural adecuada por parte del vector *Aedes aegypti*, se optó por un estudio de semicampo, donde se utilizaron larvas de la cría mantenida en laboratorio. Para este bioensayo se utilizó la cantidad equivalente a 6 veces la CL_{50} (0.4712 mg/l) de las formulaciones estudiadas más efectivas, un producto comercial, una formulación alterna y el ingrediente activo sin formular. Los tratamientos considerados para la evaluación fueron los siguientes (Tabla 8):

Tabla 8. Tratamientos utilizados en la determinación de la actividad tóxica residual a nivel semicampo.

Tratamiento	Composición	% de IA	[Conc.] utilizada de IA	Dosis del formulado
Tableta 2	5% de Pectina, 40% de Almidón y 40% de Carbonato de Calcio.	15%	3 mg/l	21 mg/l
Granulado 3	3.33% de Pectina, 6.66% de Goma Acacia, 1% de Betacaroteno, 79% de Amaranto.	10%	3 mg/l	32 mg/l
(VectoBac®).	Producto Comercial, insecticida biológico: gránulos solubles en agua. 62.60% ingredientes inertes: preservantes y dispersantes.	37.40%	3 mg/l	81 mg/l
Alterna	(Meléndez-López 2006). Contiene 10% del Ingrediente Activo, 10% de Pectina, 1% de Betacaroteno y 79% de Corcho, tamaño del gránulo/tamiz número 8.	15%	3 mg/l	32 mg/l
IA sin formular	Complejo espora critsal de Bti obtenido del medio nuevo 1 con base en polvo del reajo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura. Utilizar: 6 veces la CL ₅₀ (0.4712 mg/l)	100%	3 mg/l	--

6.14.2 Sitio y fecha de los experimentos en campo.

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad B. de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en un lugar con períodos alternados de sol y sombra, en los meses adecuados para esta prueba (octubre y noviembre del año 2015). El bioensayo se realizó por duplicado.

6.14.3 Colonización de los contenedores plásticos.

Ya que las cantidades fueron preparadas, éstas se añadieron a contenedores de plástico con capacidad de 20 litros, los cuales fueron llenados con 15 l de agua potable previamente declorada. A cada recipiente, se le adicionaron los lotes de 50 larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* que habían sido previamente separadas en el laboratorio, dichas larvas siempre fueron seleccionadas con cuidado en vasos desechables pequeños con

ayuda de una pipeta Pasteur desechable recortada de la punta, de tal manera que las larvas tuvieran el tamaño y las características del tercer estadio. Se reajustó la cantidad de agua de los contenedores cuando se observó una disminución del nivel original.

6.14.4 Diseño Experimental.

Se utilizó un diseño de bloques al azar, con 5 tratamientos, con cuatro repeticiones y un control no tratado.

6.14.5 Muestreo

Las larvas vivas y muertas fueron contabilizadas, registradas y descartadas por un nuevo lote a las 24 horas post aplicación en base a los días de muestreo y hasta donde se observó que la actividad tóxica era mínima o nula: 1, 2, 3, 7 y 10 días. Los resultados fueron analizados mediante Análisis de Varianza de un factor y diferenciación de medias por Tukey al nivel 0.05 para cada día de muestreo.

6.14.6 Medición de la actividad tóxica de sedimentos.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad tóxica residual que presentaron las muestras de agua que se obtuvieron de los contenedores tratados a los 14 días postratamiento, ya que la actividad tóxica mínima o nula que se observaba era a los 10 días.

Se tomaron muestras de agua y sedimentos de cada tratamiento y cada control. Esto se logró decantando cuidadosamente el contenido de los recipientes de plástico tratados, para que así las muestras fueran lo menos alteradas posible. El muestreo se llevó a cabo en bolsas plásticas con cierre hermético y fueron trasladadas al laboratorio. Se colocaron 150 ml de agua en vasos de plástico desechables de cada tratamiento, con cuatro repeticiones y un control. Después se adicionarán 25 larvas de *Aedes aegypti* de 3er estadio tardío a cada vaso las cuales fueron previamente seleccionadas y obtenidas en laboratorio, se dejaron 24 horas en exposición a temperatura ambiente del laboratorio (20-30°C). Después se registró el número de larvas vivas y muertas, se corrigieron contra los presentados por los controles y se compararon las medias con análisis de varianza para un factor y Tukey al nivel 0.05.

6.14.7 Registro de factores ambientales.

Se registraron los factores ambientales de pH (potenciómetro portátil Hanna Instruments® HI 9811-5), temperatura de los recipientes (termómetro de mercurio) y luz (Luxómetro Hanna Instruments® HI 97500), estos factores se midieron cada día durante la mañana y tarde. Los datos de las precipitaciones y temperatura ambiental durante el periodo de prueba fueron tomados de los reportes de la Comisión Nacional del Agua, Servicio Meteorológico Nacional (CONAGUA).

7. RESULTADOS

7.1 RENDIMIENTO DEL COMPLEJO INSECTICIDA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

El rendimiento obtenido de la fermentación de la cepa de Bti 225 en los nuevos medios y de referencia fueron en promedio 18.9 g/L para el medio de referencia con base en melaza, líquido del remojo de maíz y harina de soya; 1.8 g/L para el medio con base en extracto de levadura, líquido del remojo del maíz y jarabe de maíz; y de 6.6 g/L para el medio con base en sacarosa y harina de girasol. Estos resultados se expresan también en la siguiente Figura 8. (Anexo XVII y Anexo XVIII).

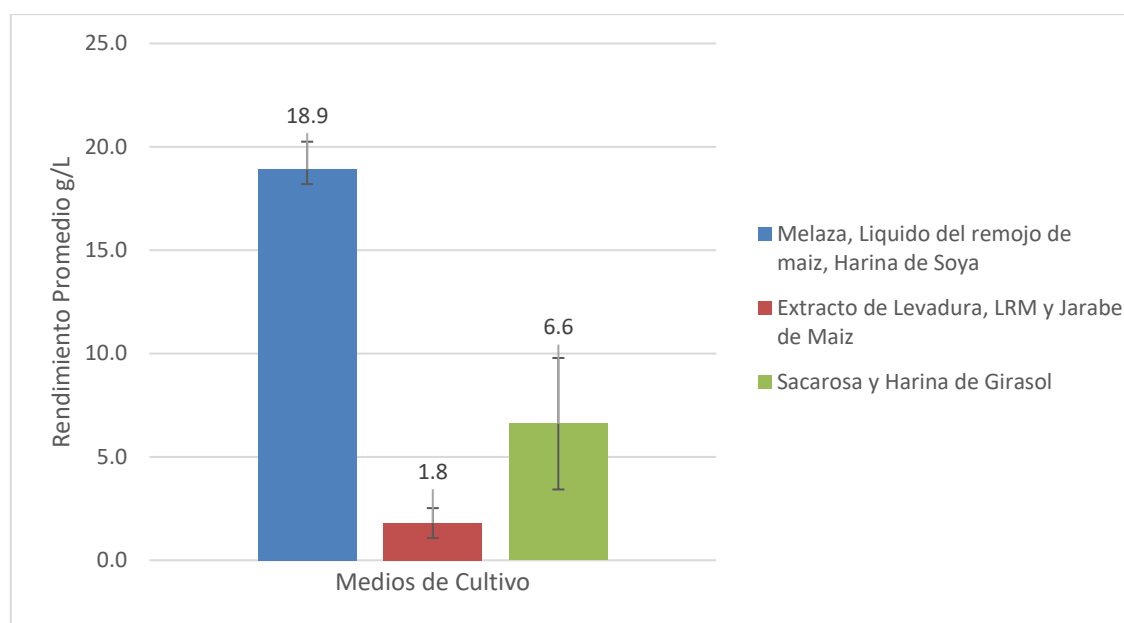


Figura 8. Rendimiento promedio en gramos por litro (g/l) del complejo espora-cristal de Bti 225 obtenido en los 3 medios: melaza, sólidos del remojo de maíz y harina de soya; sólidos de remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura; harina de semilla de girasol y sacarosa.

7.2 EVALUACIÓN DEL BIOINSECTICIDA DE BTI 225 PRODUCIDO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

Cuando los extractos insecticidas se probaron a concentración de 0.5 mg/l los mayores porcentajes de mortalidad promedio fueron obtenidos para los extractos preparados a partir del medio de cultivo con base en Jarabe de maíz, Polvo de remojo del

maíz y Extracto de levadura (100%), mientras que los extractos preparados en medios con Harina de Girasol y Sacarosa y Harina de Soya, líquido de remojo del maíz y melaza, presentaron 3% y 33% de mortalidad respectivamente. Cuando se usó una concentración de 0.05 mg/l del extracto obtenido en medio de Jarabe de maíz, Polvo de remojo del maíz y Extracto de levadura la mortalidad fue de 28%, mientras que, para los extractos preparados en medios con Harina de Girasol y Sacarosa y Harina de Soya, líquido de remojo del maíz y melaza, presentaron 1% y 2% de mortalidad respectivamente (Tabla 9). Según el análisis de varianza, el extracto preparado con base en Jarabe de maíz, Polvo de remojo del maíz y extracto de levadura mostró diferencia significativa probado a 0.5 mg/l de concentración, en comparación con los otros extractos obtenidos a partir de Harina de Girasol y Sacarosa, así como Harina de Soya, líquido de remojo del maíz y melaza; sin embargo cuando se probaron a 0.05 mg/l de concentración aplicada, los tres extractos preparados no mostraron diferencia significativa a 0.05 de nivel de significancia (Anexo XIX).

Tabla 9. Comparación de los porcentajes de mortalidad presentados por los extractos insecticidas de la cepa *Bti* 225 cultivada en dos nuevos medios solubles y uno de referencia, contra larvas de tercer estadio tardío de *Aedes aegypti*, a las 24, 48 y 72 horas post aplicación.

^d Tiempo en horas	% Mortalidad							
	Concentración 0.05 mg/l				Concentración 0.5 mg/l			
	Medio Referencia ^a	Medio 1 soluble ^b	Medio 2 soluble ^c	Control	Medio Referencia ^a	Medio 1 soluble ^b	Medio 2 soluble ^c	Control
24	1% ^b	24% ^a	1% ^b	0	29% ^b	100% ^a	3% ^b	0
48	2% ^b	28% ^a	1% ^b	0	33% ^b	100% ^a	3% ^b	0
72	2% ^b	28% ^a	7% ^b	0	34% ^b	100% ^a	11% ^b	0

Letras diferentes en los porcentajes de mortalidad indican diferencia significativa entre los medios de cultivo (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

Medio Referencia^a con base en melaza y harina de soya

Medio 1 soluble^b con base en jarabe de maíz y extracto de levadura

Medio 2 soluble^c con base en harina de girasol y sacarosa

^dTiempo de exposición a los extractos insecticidas

7.3 DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀

Para la determinación de la CL₅₀ sólo se probaron los extractos obtenidos a partir del medio de referencia y del medio nuevo 1, ya que son los que resultaron más tóxicos en los bioensayos preliminares. En la siguiente Tabla 10 [Anexo XX, XXI, XXII, y XXIII], se presentan los promedios estimados de los resultados de 4 bioensayos para la

determinación de la CL₅₀ de los extractos insecticidas obtenidos en los dos medios probados, donde se observa que la CL₅₀ promedio de extractos insecticidas producidos en el medio de referencia (melaza y soya) fue de 1.3114 mg/L a las 24 horas y de 1.0720 mg/L a las 48 horas, mientras que la CL₅₀ del extracto producido en medio nuevo 1 fue menor, obteniendo 0.5321 mg/L a las 24 y de 0.4712 mg/L a las 48 horas de exposición.

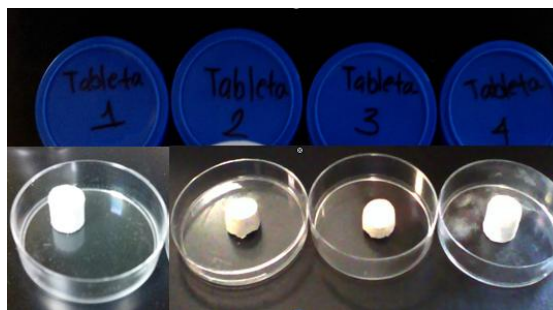
Tabla 10. Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* 225 obtenidos en medio de referencia y medio nuevo 1, a las 24 y 48 horas post aplicación.

Medio de Crecimiento	Medio de Referencia (Melaza-Soya)	Medio 1 (Jarabe de Maíz- Extracto de Levadura)	Medio de Referencia (Melaza-Soya)	Medio 1 (Jarabe de Maíz- Extracto de Levadura)
	24 horas de exposición		48 horas de exposición	
Cepa	Bti	Bti	Bti	Bti
na	100	100	100	100
Tiempo de expC	24 h	24 h	48 h	48 h
Desv. Est.	0.2927	0.0226	0.0472	0.0212
CL₅₀	1.3114	0.5321	1.0720	0.4712
IC 95%	0.2450 – 31.3396	0.3639 – 0.7781	0.3227 – 14.8826	0.3088 – 0.7387
CL₉₀	3.7885	1.2716	2.7317	1.0726
IC 95%	0.1670 – 70.6589	0.6505 – 3.5536	0.2765 – 74.0161	0.5784 – 2.4174
Pendiente +EE	5.69 ± 1.66	4.2387 ± 0.7366	5.1981 ± 1.4656	10.4677 ± 0.4312
X2	0.6039	3.1948	0.3825	3.3105
	t 4.8075 P <0.05 t 0.05 2.074 t 0.01 2.819		t 7.9577 P <0.05 t 0.05 2.074 t 0.01 2.819	

7.4 FORMULADOS BIOINSECTICIDAS OBTENIDOS

Con el ingrediente activo y diversos acarreadores y fotoprotectores se prepararon cuatro formulaciones en forma de tableta, dos de ellas con 10% de ingrediente activo y las otras dos con 15% de ingrediente activo, así como también tres formulaciones granulares con 10% de ingrediente activo y diferentes concentraciones de polímeros, los cuales se muestran en la Figura 9.

FORMULADOS EN TABLETA



FORMULADOS GRANULARES

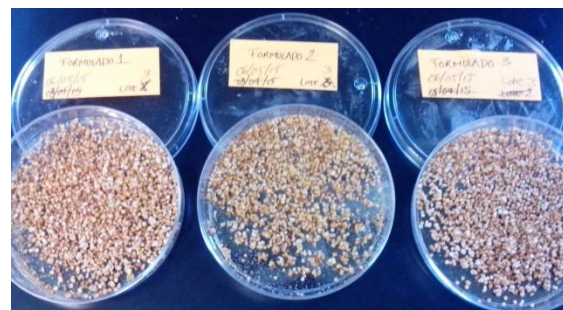


Figura 9. Formulados en forma de tableta y formulados granulares con diferentes concentraciones de ingrediente activo con base en *Bacillus thuringiensis israelensis* y otros ingredientes diversos como polímeros, adyuvantes y fotoprotectores.

7.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA RESIDUAL DE LOS FORMULADOS GRANULARES Y EN TABLETA CON BASE EN BTI CONTRA LARVAS DE *AEDES AEGYPTI* EN LABORATORIO.

En la evaluación de la actividad residual de los diferentes formulados en laboratorio, 9 tratamientos aplicados, 4 tabletas y 3 granulados, además del bioinsecticida comercial (Vectobac®) y el polvo técnico sin formular contra larvas de *A. aegypti*, (Figura 10), mostraron que en el primer día postaplicación, la Tableta 2, granulado 3, extracto de Bti sin formular y VectoBac®, presentaron casi 100 % de mortalidad, mientras que los restantes granulados y tabletas alcanzaron más del 90% de mortalidad, sin diferencias significativas entre tratamientos ($F= 2.16$, grados de libertad (g.l.)= 8,27; $p=0.063$) . En el día 2 postaplicación, el granulado 3, extracto sin formular y Vecto Bac conservaron casi el 100% de mortalidad; mientras que la tableta 2 y granulado 1 mostraron más del 90% de mortalidad, en tanto que las tabletas 1, 3 y 4 disminuyeron su actividad tóxica hasta cerca del 80% de mortalidad ($F= 4.94$; g.l.=8, 27; $p<0.001$). Para el día 3 postaplicación, solo los granulados 1, 2 y 3, junto con extracto sin formular y Vecto Bac conservaron alrededor del 90% de mortalidad, mientras que las tabletas mostraron menos del 60% de mortalidad, excepto para la tableta 2 que mostró casi 80% de mortalidad ($F= 13.33$; g.l.= 8, 27; $p<0.0001$). Para los 7 días postaplicación, solo el granulado 3 conservó alrededor del 60% de mortalidad, sin embargo, fue superado por VectoBac® y extracto de Bti sin formular, que presentaron 90 y 75 % de mortalidad respectivamente; todas las formulaciones en tableta presentaron menos del 60 % de mortalidad ($F= 17.64$; g.l.= 8, 27; $p<0.0001$). En

los siguientes días de muestreo, 14 ($F = 27.81$; g.l. = 8, 27; $p < 0.0001$) y 21 días ($F = 42.94$; g.l. = 8, 27; $p < 0.0001$) postaplicación, solo los granulados 2 y 3 mostraron más del 40% y alrededor de 25% de mortalidad respectivamente, mientras que el extracto sin formular bajó a 30 y 20% de mortalidad aproximadamente y únicamente el Vecto Bac se mantuvo en valores cercanos a 80%. Al final de la prueba, los formulados perdieron su actividad en 28 días, ($F = 127$; g.l. = 8, 27; $p < 0.0001$) mientras que el Vecto Bac conservó alrededor del 60% de mortalidad.

En resumen, de las formulaciones granulares más efectivas, el granulado 3 debido a que conservó de 98 al 54% dentro de los primeros 10 días postaplicación, y del 48 al 8% de mortalidad para los siguientes días, mientras que para los formulados en forma de tabletas los porcentajes de mortalidad de los primeros 10 días postaplicación fueron de 99 al 30%, y después empezó a disminuir significativamente del 20 al 1% de mortalidad para el resto del bioensayo. El extracto sin formular perdió más del 50% de su actividad a los 21 días, mientras que el producto comercial aún mostraba mortalidad del 50% a los 28 días. [Tabla 11 y Anexo XXIV].

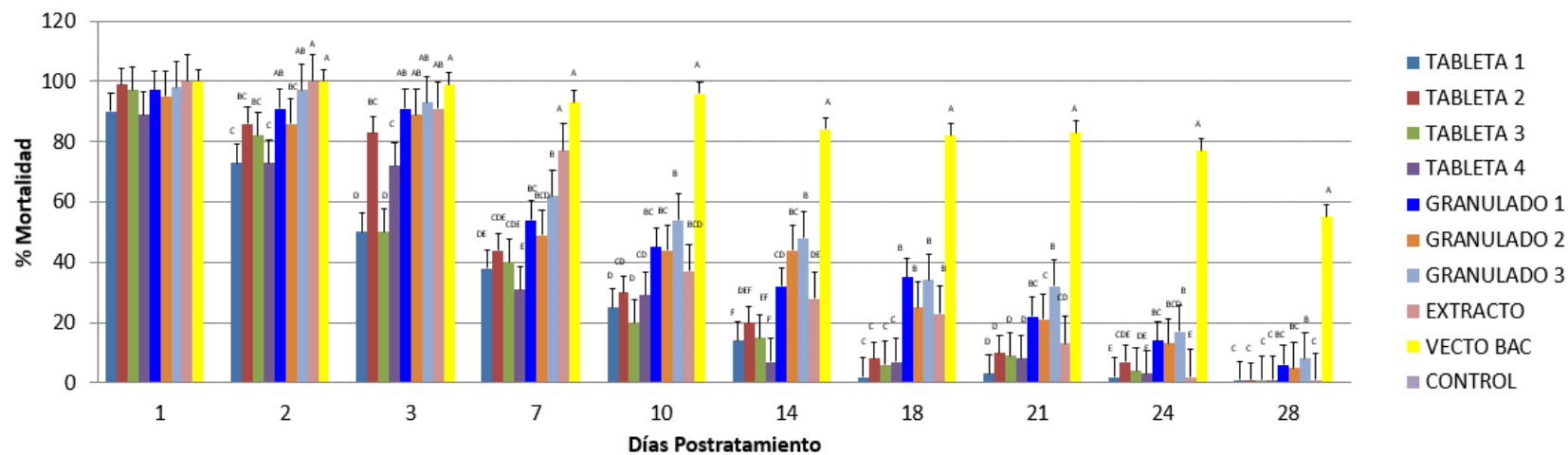


Figura 10. Actividad residual comparativa de formulaciones de Bti, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* en laboratorio. Letras diferentes en cada día de muestreo indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey (0.05) Anexo

Tabla 11. Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial (Vectobac®) y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* en laboratorio.

Formulación	Porcentajes de mortalidad									
	TABLETAS									
Días	1	2	3	7	10	14	18	21	24	28
TABLETA 1	90	73c	50d	38de	25d	14f	2c	3d	2e	1c
TABLETA 2	99	86bc	83bc	44cde	30cd	20def	8c	10d	7cde	1c
TABLETA 3	97	82bc	50d	40cde	20d	15ef	6c	9d	4de	1c
TABLETA 4	89	73c	72c	31e	29cd	7f	7c	8d	3e	1c
Formulación	GRANULARES									
	1	2	3	7	10	14	18	21	24	28
GRANULADO 1	97	91ab	91ab	54bc	45bc	32cd	35b	22bc	14bc	6bc
GRANULADO 2	95	86bc	89ab	49bcd	44bc	44bc	25b	21c	13bcd	5bc
GRANULADO 3	98	97ab	93ab	62b	54b	48b	34b	32b	17b	8b
Formulación	EXTRACTO SIN FORMULAR, PRODUCTO COMERCIAL Y CONTROL									
	1	2	3	7	10	14	18	21	24	28
EXTRACTO	100	100a	91ab	77a	37bcd	28de	23b	13cd	2e	1e
VECTO BAC ®	100	100a	99a	93a	96a	84a	82a	83a	77a	55a
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Letras diferentes en los porcentajes de mortalidad indican diferencia significativa entre las formulaciones aplicadas en cada día de muestreo (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$) Tukey.

7.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE IRRADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LAS FORMULACIONES GRANULARES Y EN TABLETA CON BASE EN Bti CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADÍO DE *Aedes aegypti* A NIVEL DE LABORATORIO.

Los resultados que se muestran en la Tabla 12, se observan reducciones de la actividad tóxica de los formulados que fueron irradiados, con respecto a los formulados no irradiados. El Bti sin formular mostró una reducción mayor del 32% después de la irradiación con luz UV, en comparación con los formulados irradiados que mostraron porcentajes de reducción similar, de 6 al 11% para los formulados granulares y de 5-12% para las formulaciones de tableta.

Tabla 12. Actividad tóxica comparativa de formulaciones de Bti sin irradiar e irradiados después de 72 h de exposición a luz ultravioleta y probadas contra larvas de *Aedes aegypti*.

Formulaciones	% Mortalidad ¹		% de reducción
	No Irradiado	Irradiado	
Tableta 1	92	80	12
Tableta 2	99	93	6
Tableta 3	97	85	12
Tableta 4	96	91	5
Granulado 1	100	92	8
Granulado 2	100	89	11
Granulado 3	100	94	6
Bti sin formular	100	68	32
Control sin toxina	0	0	0

¹ promedio de 4 repeticiones

7.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ALMACENAMIENTO EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS FORMULADOS DE Bti (TABLETAS Y GRANULADOS).

Después de los diferentes períodos de almacenamiento (0, 30, 60, 90, 120, 240 y 365 días), se puede observar que la actividad tóxica se mantiene estable, para los 4 tipos de formulados granulares y una ligera disminución en la actividad tóxica de las 3 formulaciones de tableta después del día 120 (1-9%) (Tabla 13 y 14).

Las formulaciones granulares preparadas con la cepa Bti 225, no mostraron

pérdida de la actividad insecticida contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* a nivel de laboratorio, durante 365 días a temperatura del laboratorio (23–25°C) (Tabla 13); similarmente, las formulaciones en forma de tableta, mostraron una disminución ligera en general a partir del día 120 (Tabla 14).

Tabla 13. Porcentajes de mortalidad presentados por 3 formulaciones granulares e ingrediente activo sin formular, de la cepa de *Bacillus thuringiensis israelensis*, almacenados a temperatura ambiente (23–25 °C) durante varios días, contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* a nivel laboratorio.

Formulación	Porcentaje de mortalidad ^c						
	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ^a						
Días	0	30	60	90	120	240	365
IA sin formular	100	100	100	100	100	100	100
Granulado 1 ^b	100	100	100	100	100	100	98
Granulado 2 ^b	100	100	100	100	100	100	100
Granulado 3 ^b	100	100	100	100	100	100	100
Control	0	0	0	0	0	0	0

^aAplicado a 3 veces la CL₅₀ (0.4712 mg/l x3 = 1.4136 mg/l)

^bFormulados con ingrediente activo de la cepa Bti obtenida del medio con base en polvo del remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura

^cPromedio de cuatro repeticiones

Tabla 14. Porcentajes de mortalidad presentados por 4 formulaciones en tabletas e ingrediente activo sin formular, de la cepa de *Bacillus thuringiensis israelensis*, almacenados a temperatura ambiente (23–25 °C) durante varios días, contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* a nivel laboratorio.

Formulación	Porcentaje de mortalidad ^c						
	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ^a						
Días	0	30	60	90	120	240	365
IA sin formular	100	100	100	100	100	100	100
Tableta 1 ^b	100	100	100	100	98	94	91
Tableta 2 ^b	100	100	100	100	99	97	94
Tableta 3 ^b	100	100	100	100	98	96	95
Tableta 4 ^b	100	100	100	100	97	95	92
Control	0	0	0	0	0	0	0

^aAplicado a 3 veces la CL₅₀ (0.4712 mg/l x3 = 1.4136 mg/l)

^bFormulados con ingrediente activo de la cepa Bti obtenida del medio con base en polvo del reojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura

^cPromedio de cuatro repeticiones

7.8 EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES GRANULARES Y EN TABLETA MÁS EFECTIVAS EN PRUEBAS DE SEMICAMPO CONTRA LARVAS DE TERCER ESTADÍO DE *Aedes aegypti*.

Para esta evaluación se llevó a cabo un bioensayo a nivel de semicampo y las formulaciones seleccionadas para evaluar la actividad tóxica fueron el granulado 3 (32 mg/l) y la tableta 2 (21 mg/l), por ser las formulaciones más efectivas a nivel laboratorio;

además se probó una formulación comercial VectoBac® (81 mg/l), y una cuarta formulación con base en pectina y corcho (32 mg/l) (elaborada por Meléndez 2006), así como también el extracto sin formular (3 mg/l). (Figura 11).

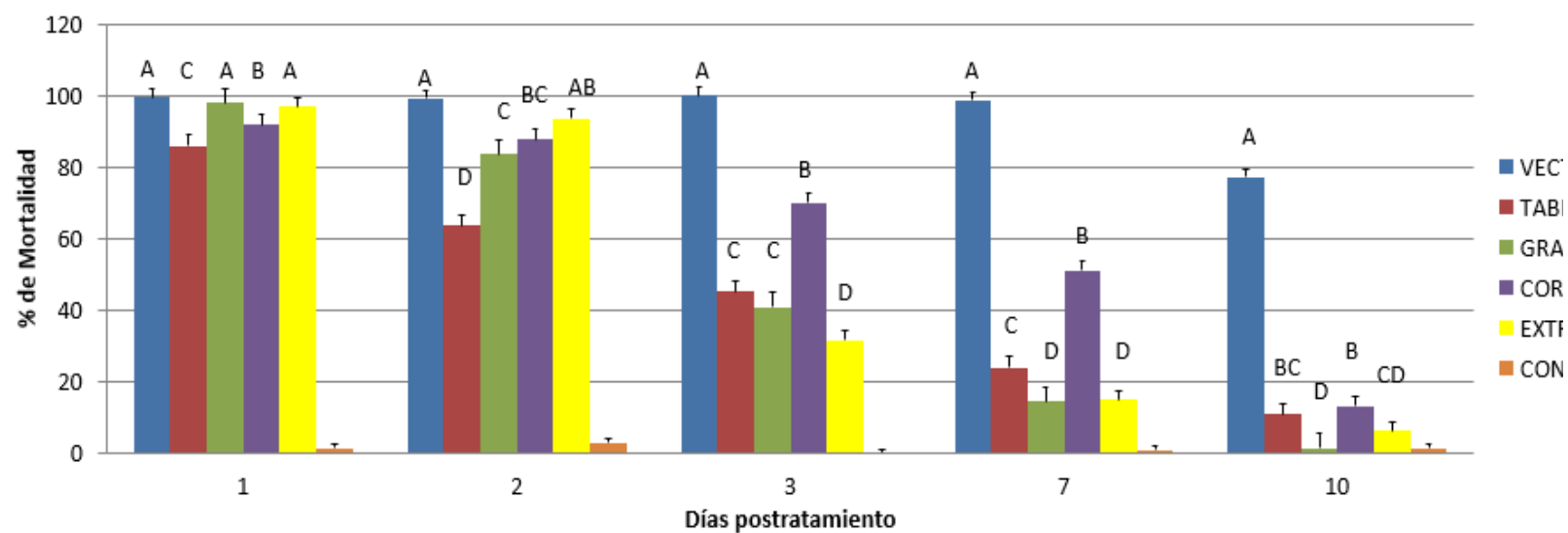


Figura 11. Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* en campo.

Letras diferentes en cada día de muestreo indican diferencia significativa entre tratamientos (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

Tabla 15. Actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* en semicampo.

Días	Porcentajes de mortalidad				
	1	2	3	7	10
VECTOBAC®	99.5a	99.25a	100a	98.75a	77a
TABLETA	85.75c	63.5d	45c	23.75c	10.75bc
GRANULADO	97.75a	83.5c	40.75c	14.25d	1.25d
CORCHO	91.75b	87.5bc	70b	51b	13b
EXTRACTO	96.75a	93.5ab	31.5d	14.75d	6cd
CONTROL	1.25	2.75	0	0.75	1.25a

Letras diferentes en los porcentajes de mortalidad indican diferencia significativa entre los tratamientos (ANOVA, DMS, $p \leq 0.05$).

En la Figura 25 y en la Tabla 15, se muestra la actividad residual comparativa de las formulaciones probadas en semicampo, así como la presentada por un producto comercial (Vectobac®) y una formulación con base en corcho, pectina y verde malaquita (Melendez 2006) aplicadas a la misma concentración de cinco veces la CL_{50} . (0.5 mg/l).

Durante el primer día postaplicación de los tratamientos se muestra una clara diferencia significativa entre la formulación granular (97.75%a) el producto comercial (99.5%a) y el extracto insecticida sin formular (96.75%a) en comparación a la formulación de tableta y de corcho.

Para el segundo día postaplicación, se vieron disminuidos los porcentajes de mortalidad para ambos tipos de formulaciones desarrolladas, tanto la tableta, como el granulado y la formulación de corcho mostraron diferencia significativa con respecto a al producto comercial VECTOBAC® y el extracto insecticida sin formular que denotan mayor efectividad.

La disminución en la efectividad de las formulaciones es evidente nuevamente al tercer día del bioensayo en semicampo, ya que los formulados granular y de tableta, elaborados en laboratorio, presentaron 40.75% y 45% de mortalidad. Por otro lado, el extracto insecticida sin formular presentó una gran disminución en su efectividad, de 31.5% de mortalidad, mientras que el formulado comercial VECTOBAC® se mantuvo estable con 100% de mortalidad y diferente significativamente a los restantes formulados y el formulado con base en corcho presentó 70% de mortalidad.

Los resultados para el día 7 postaplicación de los tratamientos indicaron nuevamente una gran estabilidad del producto comercial VECTOBAC® con 98.75% de

mortalidad, diferente significativamente a los restantes formulados que ya demuestran una efectividad mermada de 23.75% de mortalidad para la tableta y 14.25% para el granulado, mientras que el formulado con base en corcho presentó mayor mortalidad con 51% de efectividad; en contraste a estos resultados el extracto insecticida sin formular presentó 14.75% de mortalidad.

Por último, para el día 10 postaplicación de los tratamientos llevados a cabo a nivel de semicampo, ya se puede apreciar la disminución en la efectividad del producto comercial VECTOBAC® con 77%, sin embargo, es un porcentaje mucho mayor al que presentaron los demás tratamientos ya que los formulados elaborados en laboratorio resultaron con mortalidades menores.

En resumen, los formulados que presentaron mayores porcentajes de mortalidad en el transcurso de la prueba fueron el producto comercial (99.5% - 77%) y el formulado con base en corcho y pectina (91.75% - 13%), mientras que el extracto sólo sin formular mostró altos porcentajes los primeros dos días de la prueba (96.75% y 93.5%), disminuyendo hasta un 6% al día 10. Mientras que las formulaciones granulares y de tableta fueron significativamente menores a partir del día 3 del bioensayo, sin embargo, comparando entre éstas, la tableta aún conserva actividad residual del 10.75% al día 10, mientras que el granulado sólo del 1.25%.

7.8.1 Factores ambientales

Durante cada bioensayo se registraron la temperatura y pH del agua de los recipientes (°C), la intensidad de luz (unidades lux), y la temperatura ambiental (Figura 12). La medición de precipitaciones se obtuvo a través del informe de la CONAGUA. Cabe mencionar que uno de los bioensayos se repitió ya que desafortunadamente tuvimos interferencia y afectaciones por las tormentas, vientos y precipitaciones que alcanzaron al estado de Nuevo León debido al paso del huracán Patricia por la región durante el tiempo en el cual se realizaron las pruebas a nivel de semicampo. Según el informe de la CONAGUA, en Nuevo León hubo precipitaciones de 89.4 mm para el mes de octubre del y 20.1 mm para el mes de noviembre del mismo año.

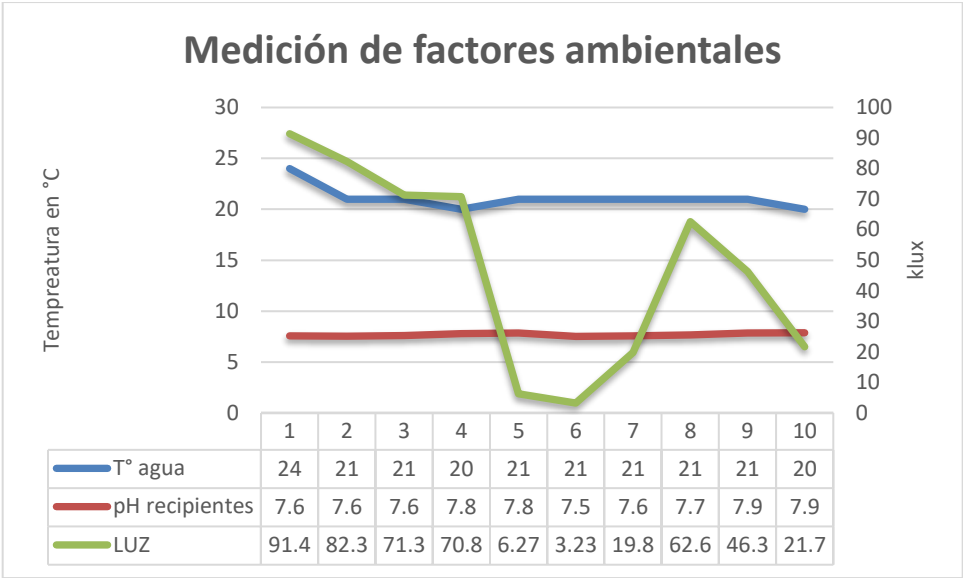


Fig. 12 Medición de factores ambientales (Temperatura y pH del agua de los recipientes y la luz, durante el día y durante la tarde).

8. DISCUSIONES.

La biotecnología, para la producción de bioinsecticida, es una relativamente área nueva en nuestro país, y es lógico esperar que por los problemas agrícolas y de salud pública que nos afectan, además del uso irracional de insecticidas químicos, promueven en el futuro el uso de estos productos biológicos, pues Bti tiene ventajas sobre los plaguicidas químicos por su especificidad para actuar sólo sobre especies de insectos plaga e insectos vectores de enfermedades, por su eficacia para eliminar aquellos insectos que han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos, y porque es ambientalmente seguro; siempre y cuando se integren técnicas de producción, y si fuese el caso, posteriormente a nivel industrial de escalamiento, que aseguren una excelente cantidad y calidad de la δ -endotoxina producida.

Para el desarrollo de la presente de investigación, nos planteamos como **primer y segundo objetivos** la producción y recuperación del extracto insecticida de Bti en nuevos medios de cultivo con base en ingredientes solubles económicos, así como su recuperación, es por ello que se emplearon ingredientes tales como: melaza, sacarosa, harina de soya, jarabe de maíz y líquido del remojo de maíz, entre otros. Observando así, que los resultados obtenidos con respecto al rendimiento de los medios de cultivo probados, el medio de referencia con base en melaza, sólidos del remojo de maíz y harina de soya, aunque mostró los mayores rendimientos de producción promedio de extracto insecticida de 18.9 g/L, este extracto no fue tan toxico para las larvas como lo fue el producido en el medio nuevo soluble 1, con base en extracto de levadura, líquido del remojo de maíz y jarabe de maíz, que mostró bajo rendimiento, apenas de 1.8 g/L en promedio, y finalmente, el medio nuevo 2, con base en sacarosa y harina de semilla de girasol, que mostró rendimiento de 6.6 g/L, aunque fue el menos tóxico para *Aedes aegypti*. Por su parte, Maldonado-Blanco (2001) obtuvo rendimientos de 15.7 g/L, utilizando ingredientes similares como melaza, líquido del remojo del maíz y pasta en polvo. Por otro lado, Prabakaran, & Balaraman, (2006), obtuvieron 7.8 g/L en el medio con base en 2.5% de harina de soya, 7.6 g/L en el medio con pasta cacahuete en polvo,

4.2 g/l en salvado de trigo y 3.0 g/L en el medio con levadura y sales. Estos últimos medios, se asemejan a nuestros resultados de rendimiento obtenidos en el medio nuevo 2 con base en harina de semilla de girasol. Sin embargo, como bien menciona el autor en su trabajo, la intención es desarrollar un medio rentable, basado en materia primas económicas y disponibles localmente, ya que la producción a gran escala de este bacilo puede ser costosa, básicamente debido al alto costo de los ingredientes de los medios de producción y la energía para producción. Otro autor menciona cómo redujo el costo del medio de producción de Bti en un 40%, al utilizar en la formulación harina de soya y melaza de azúcar de caña, con el cual lograron 19.77 g/L. (Socol, et al 2009).

Una vez obtenidos los extractos insecticidas de Bti en los tres medios de cultivo, nos planteamos como **tercer objetivo**, la evaluación y comparación de la actividad tóxica que presentaron dichos extractos contra larvas de tercer estadio tardío de *Aedes aegypti*, y los mejores resultados obtenidos durante éstos bioensayos fueron con el extracto insecticida resultante del medio de cultivo nuevo soluble 1, dicho extracto demostró una actividad tóxica del 100% de mortalidad contra *Aedes aegypti*) cuando se probó a concentración de 0.5 mg/L mientras que los otros dos extractos presentaron menores porcentajes de mortalidad. De igual manera, éste mismo extracto, mostró la menor CL₅₀ de 0.3748 mg/l a las 24 horas, lo que se significa que mostró una mayor actividad tóxica. Mientras que Gunasekaran et al (2004), obtuvieron una CL₅₀ de 1.74×10^{-3} ppm (0.00174 mg/L) para *Aedes aegypti*, 2.13×10^{-3} ppm (0.00213 mg/l) para *Anopheles stephensi* y 2.77×10^{-3} ppm (0.00277 mg/l) para *Culex quinquefasciatus*, los cuales fueron tratados con Teknar HP-D, una formulación biolarvicida de *Bacillus thuringiensis israelensis*, con 1,6% de ingrediente activo y 98,4% de ingredientes inertes. La potencia de la formulación es de 1200 UI/mg de producto. Las dosis recomendadas para llevar a cabo estudios de campo para evaluar su bioefectividad son 1, 1,5 y 2 L/ha. Esta formulación es de Thermo Triology Corporation, Columbia, Maryland y suministrado para evaluación en Bangalore, India. En cambio, Lee & Lee, (2004), determinaron la actividad tóxica de una formulación industrial: Bastosec®, la cual fue probada contra larvas de tercer estadio de 5 especies de mosquito: *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, *Culex pipiens pallens*, *Culex pipiens molestus* y *Ochlerotatus togoi*, las cinco especies de mosquito fueron susceptibles a la formulación, sin embargo, *Aedes aegypti* mostró la más alta susceptibilidad a la

formulación con una CL_{50} de 0.35 mg/l, seguido de *Oc. Togui*, *An. sinensis*, *Cx. pipiens molestus* y *Cx. pipiens pallens* con 0.62, 0.86, 1.10 y 1.32 mg/l en la CL_{50} , respectivamente. Su estudio demuestra que *Cx. pipiens molestus*, requiere 4 veces más de la formulación de Bti, para mostrar el 90% de mortalidad que el producto logró contra *Ae. aegypti* y por lo tanto tiende a ser menos susceptible que otros mosquitos. Esto demuestra que Bactosec®, gracias a su ingrediente activo de Bti, tiene mucho potencial para el control de mosquitos de importancia médica.

Con respecto a nuestro **cuarto objetivo**, para el diseño de los formulados, fue muy importante la selección de los ingredientes, ya que de ello dependía el aumento de la eficacia al momento de su aplicación. Es por ello que se realizaron 7 formulaciones, para de esta manera aumentar la actividad residual y de liberación del ingrediente activo mediante el uso de los polímeros utilizados (lenta y rápida disolución, pectina y goma acacia respectivamente) así como de otros compuestos orgánicos y a su vez inertes, necesarios para fungir como materiales acarreadores. No obstante, también se incluyeron compuestos que le conceden propiedades de fotoprotección, como lo es en el caso de la adición del β caroteno, para proteger la toxina de Bti.

Por otro lado, Ramírez-Suero, Robles-Olvera & Ramirez-Lepe (2005) realizaron suspensiones que contenían 0.25 y 1.25 g/litro del complejo de esporas-toxina el cual obtuvieron mediante secado por aspersión empleando ingredientes en su formulación como la maltodextrina DE-6, almidón de maíz y harina de maíz nixtamalizada (25 g/litro) como materiales para encapsular la endotoxina activa. El producto obtenido mediante secado por aspersión a 60° C y evaluado contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*, mostró que los valores de CL_{50} para maltodextrina DE-6 con 1 y 5% de complejo de espóra-toxina fueron de un 4 y un 10 % más altos en toxicidad, respectivamente, que los productos obtenidos del complejo de espóra-toxina sin formular y sin secado. Mientras tanto, el valor CL_{50} para el almidón de maíz con 1 y 5% de complejo de espóra-toxina también fue mayor en toxicidad (7 y 8% respectivamente). Sin embargo, los valores de CL_{50} para la harina de maíz nixtamalizado con complejo de esporas-toxina al 1 y 5%, fue de 81 y 55 % mayor en toxicidad, respectivamente.

Recientemente, en experimentos realizados con formulaciones “fly ash” de Bti, probados contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, (Tamilselvan et al 2017), se describió la preparación de 16 formulaciones de Bti, que fueron probadas en laboratorio, donde se encontró que la formulación conteniendo Bti y lignita 4.5 y carboximetilcelulosa al 1% fue la más efectiva, con valores de CL₅₀ de 0,0417, 0,0462 y 0,1091 mg/l contra *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti* y *An. stephensi*; respectivamente, sin embargo, no se reporta actividad residual de estas formulaciones en laboratorio.

Se ha mencionado también, que una de las desventajas de la incorporación de insecticidas biológicos para el control de insectos vectores, es la baja persistencia que presentan las formulaciones al ser evaluadas en el campo, esto probablemente sea debido a una alta tasa de sedimentación de las partículas tóxicas. Es por lo anterior, que la tendencia hacia el diseño de la mayoría de las formulaciones desarrolladas hoy en día se presentan en forma de gránulos, suspensión acuosa o polvo humectable; sin embargo, buena parte de las investigaciones que se realizan actualmente se han orientado hacia el desarrollo y evaluación de nuevas formulaciones con mayor flotabilidad, a fin de mantener por largos períodos el ingrediente activo del Bti en las zonas de alimentación primaria de las larvas (Cheung y Hammock 1985, Aly et al. 1987, Mullen y Hinkle 1988, WHO 1989).

Una vez que fueron diseñadas las 7 formulaciones, procedimos con el **quinto objetivo** de nuestra investigación, donde se probó la actividad residual en laboratorio, en el cual se observó que los formulados diseñados como granulados resultaron más efectivos contra larvas de *Aedes aegypti* en comparación con las formulaciones de tableta, que perdieron más rápido su actividad tóxica. En cambio, el extracto sin formular y el formulado en forma de tableta mostraron diferencias, incluso al haber sido irradiados con luz ultravioleta hasta por periodos de 72 horas en condiciones de laboratorio.

En los primeros dos días postaplicación todos los formulados presentaron por arriba del 80% de mortalidad, excepto las tabletas 1 y 4. Para el día 3 postaplicación, todos los formulados granulados, junto con extracto sin formular y Vecto Bac® conservaron alrededor del 90% de mortalidad, no así las tabletas que disminuyeron hasta menos del 60%. De esta manera, se observó una mejor toxicidad para los formulados granulados, que para las tabletas; de los granulados, solo el 3 conservó alrededor del 60% de

mortalidad para los 7 días postaplicación ; a partir del día 10 postaplicación comenzó a decaer la actividad del extracto sin formular, que fue superado por las formulaciones granuladas, de tal forma que para los 14 días éstas mostraron más del 40 % de mortalidad, mientras que el extracto solamente presentó alrededor del 25 % de mortalidad ;sin embargo todas las formulaciones fueron superadas por Vectobac®, que mantuvo su actividad tóxica por arriba del 80% hasta por 21 días disminuyendo gradualmente. En comparación con nuestros resultados, en otros trabajos, Araujo et al (2007) han obtenido resultados de actividad residual mucho mayor, hasta por 180 días en condiciones sin exposición a la luz solar, sin embargo, las cantidades usadas para las formulaciones (tabletas) también han sido mucho mayores (250 mg/tableta) comparadas con la cantidad que nosotros usamos (1.124 mg/L). Por su parte, se reportó la elaboración y evaluación de una tableta de 190 mg conteniendo 4.8% de ingrediente activo, con la que se logró reducciones en la formación de pupas desde 59.2 hasta 100% dependiendo de las condiciones de parcial exposición a la luz solar hasta exposición completa durante 16-12 semanas; sin embargo, no se reportó mortalidad de larvas en esos periodos (Armengol et al. 2006). La cantidad de ingrediente activo agregado representó poco menos de 9 mg de polvo técnico/ tableta, y tomando en cuenta que se agregaron 1, 2, 3, 5 o hasta 8 tabletas/contenedor, cada contenedor podría tener de 9-72 mg de ingrediente activo, valores que resultan también muy superiores en relación a nuestras tabletas conteniendo solamente 1.124 mg/L.

Como bien menciona Delgado Puchi (2005), la eficacia potencial de Bti depende además de factores ambientales, de factores intrínsecos de la especie a controlar y de la formulación en la cual se presenta la bacteria. Dentro de los factores ambientales que afectan la eficacia del Bti están la temperatura (Panbangred et al. 1979, Ignoffo et al. 1981; Wraight et al. 1981), la radiación solar (Mulla 1990, Mulla et al. 1990, Becker et al. 1992) y el pH del agua (Ignoffo et al. 1981, Margalit 1985). Igualmente, el comportamiento alimentario de las larvas puede afectar la eficacia potencial del Bti. Dicho comportamiento varía entre géneros y aún entre especies, encontrándose que, la baja o alta acumulación de toxina observada, quizás se deba a otros factores: como la selección ingestiva, la eficacia del filtrado u otras características del comportamiento alimentario (Ramoska y Pacey 1979, Ramoska y Hopkins 1981, Aly 1983, Kawhaleh et al. 1988, 1989). Así mismo, el

efecto del contenido de materia orgánica, la composición del sedimento y la turbidez del cuerpo de agua, han sido señalados como factores que reducen la eficacia y persistencia del Bti (Ramoska et al. 1982, Van Essen y Hembree 1982, Perich et al. 1989).

Ya que se obtuvieron los resultados de los bioensayos en condiciones de laboratorio, procedimos con el **sexto y último objetivo**, en el cual obtuvimos como resultado que la actividad tóxica de las formulaciones granulares y en tableta, empezó a decaer al tercer día postaplicación hasta menos del 50% en comparación con el Vectobac, que mantuvo valores cercanos al 100%, mientras que el formulado de corcho se mantuvo cerca del 70%. Posteriormente a los 7 días postaplicación, las formulaciones presentaron menos del 30% de mortalidad, mientras que la formulación de corcho se mantuvo alrededor de 50%, menor que el formulado comercial que alcanzó casi 100%. así como del extracto sin formular. Finalmente, la actividad toxica de las formulaciones disminuyó a cerca del 20% de mortalidad, mientras que Vectobac conservó 80% de mortalidad. Sin embargo, el formulado con base en corcho y pectina resultó con mejor actividad residual que los formulados preparados de tableta y granulado. Mientras que Gunasekaran et al (2004) probaron tres dosis recomendadas por el fabricante del bioinsecticida (Teknar HP-D 1, 1,5 y 2 l/ha), y estas produjeron el mismo efecto, logrando así más del 80% del control de *Aedes aegypti* al día 6 postratamiento además recomiendan realizar reaplicaciones semanales y utilizar las dosis según sea el campo de aplicación (pozos negros, pozos sin usar y desagües o drenajes).

En cambio, de Melo-Santos et al (2009), probaron dos formulaciones de un producto experimental con base en Bti-IPS82 (tabletas y polvo técnico) las cuales contenían una potencia de 750 ITU/mg, un peso de 250 mg y contenían 15% (p/p) del ingrediente activo (IA), mediante los cuales obtuvieron de 90 a 100% de eliminación de larvas de cuarto estadio en 48 horas, en condiciones de campo simuladas, tanto para el producto en tableta, polvo técnico y polvo técnico irradiado, además el autor menciona que la eficacia del producto persistió por 6 meses. Sin embargo, las cantidades usadas del Bti fueron mucho más grandes que las de nuestras formulaciones.

Mientras tanto, otros autores (Kim, et al. 2006) evaluaron otra formulación con base en Bti, briquetas flotantes, ya que ésta permitía una liberación lenta la cual es útil

para la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en agua. El tratamiento produjo continuamente 100% de reducciones de larvas de *An. sinensis* y *Cx. pipiens* con no más de 2 g de briquetas hasta los 20 y 25 días, respectivamente.

Otros autores (Rydzanicz, K., DeChant, P., & Becker, N. 2010), también pusieron a prueba la eficacia de formulaciones granulares comerciales marca VectoBac® cepa AM65-52 como ingrediente activo. En una de las evaluaciones, la aplicación de los formulados (VectoBac G and VectoBac TP sand granules (VectoBac TP-SG)), se llevó a cabo en helicóptero sobre los prados intermitentemente inundados con aguas residuales de la ciudad de Wroclaw, Polonia. Con la aplicación de dosis de 5 y 10 kg/ha en las praderas, se produjo entre un 70.9 % y un 97.4 % de mortalidad de larvas. En cambio, en Alemania, inundaciones de diferente índole, en este caso el deshielo en los elevados bosques pantanosos del Valle Rhine, también propicia hábitats ideales para otras especies de mosquito como *Aedes cantans*, *Ae. punctor*, *Ae. rusticus* y *Ae. Comunis*, con los cuales, a diferencia de Polonia, se llevó a cabo la aplicación de las formulaciones granulares de Bti de forma terrestre (VectoBac G, VectoBac TP-SG, and VectoBac WG IcyPearls (VectoBac WG-IP)), los cuales están diseñados para este tipo de hábitats, y cuando la temperatura del agua se encuentra aproximadamente a 7° C. Estos investigadores lograron así, que la mortalidad de las larvas a los 7 días posteriores a la aplicación fuera de entre el 90,9% (VectoBac TP-SG: 10 kg/ha) al 98,0% (VectoBac WG-IP: 15 kg/ha).

En lo que respecta a la irradiación con luz ultravioleta, se observó el efecto producido por el fotoprotector, ya que los formulados granulados y en tableta, presentaron menores reducciones en la actividad tóxica (5-12%) comparados con el extracto insecticida sin formular, que presentó mayores reducciones (32%) después de 72 h de irradiación con luz ultravioleta.

9. CONCLUSIONES

1. El mayor rendimiento promedio resultante de los 3 medios de cultivo estudiados se observó en el medio de referencia a base de harina de soya y melaza de 18.49 g/l, sin embargo, no presentó la mejor actividad tóxica.
2. EL extracto insecticida obtenido del medio nuevo soluble 1 a base de polvo de remojo de maíz, extracto de levadura y jarabe de maíz, presentó el mayor porcentaje de mortalidad de 100% a concentración de 0.5 mg/l aunque su rendimiento es menor.
3. La menor CL_{50} obtenida fue del medio nuevo 1 con base en jarabe de maíz, polvo del remojo de maíz y extracto de levadura, de 0.4712 mg/L a las 48 horas postaplicación y, por lo tanto, la que mostró una mayor actividad tóxica.
4. En el diseño de un formulado bioinsecticida de Bti es muy importante la selección estratégica de los ingredientes que se utilizaran para su composición, ya que de ello dependerá el aumento de la eficacia cuando se lleve a cabo su escalamiento, producción, comercialización, uso y aplicación.
5. La eficiencia potencial de Bti también depende de factores ambientales y de factores intrínsecos de la especie a controlar, como lo es la temperatura, la radiación solar, el pH del agua y el comportamiento alimentario de las larvas.
6. Las formulaciones granulares, preparadas con polímeros como goma acacia y pectina son las que conservan la actividad tóxica por más tiempo contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío en condiciones de laboratorio (98-54% a 10 días).
7. El extracto insecticida sin formular después de 72 horas de irradiación con luz ultravioleta presentó una reducción del 32% en la mortalidad de larvas de los insectos prueba.
8. Las formulaciones irradiadas presentaron menores reducciones (5-12% para tabletas, 6-11% para granulados) en la mortalidad de las larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* en comparación con las formulaciones no irradiadas.
9. Las formulaciones granulares y en tableta mantuvieron su actividad tóxica por más de 90 días sin pérdida significativa, almacenadas a temperatura de 23-25°C y 80% de Humedad relativa.
10. Los resultados para las formulaciones que se diseñaron en el laboratorio, indican que

el formulado granular número 3 mostró un mayor porcentaje de mortalidad en los primeros 3 días postaplicación (97.75% a 40.75%).

11. Las principales aportaciones del presente trabajo son: el establecimiento de metodologías para diseñar formulaciones experimentales a nivel de laboratorio y de semicampo, los cuales contienen Bti producido localmente; es posible diseñar nuevos medios de cultivo económicos y sostenibles con el medio ambiente para lograr el desarrollo del complejo de espora-cristal de Bti; así como también, diseñar nuevas formulaciones con ingredientes rentables, sencillos y locales, con Bti como ingrediente activo; las nuevas formulaciones experimentales se evaluaron contra la especie de mosquito que representa el mayor problema de salud en la región, en cuanto a enfermedades transmitidas por vectores como lo son los virus del Dengue, Dengue Hemorrágico, Chikungunya y Zika.
12. La comparación de bioplaguicidas con plaguicidas químicos convencionales suele realizarse únicamente desde la perspectiva de su eficacia y costo. Sin embargo, teniendo en cuenta los beneficios ambientales, incluida la seguridad para los seres humanos y otros organismos no objetivo, la reducción de residuos de plaguicidas en el medio acuático, el aumento de la actividad de la mayoría de los otros enemigos naturales y el aumento de la biodiversidad en los ecosistemas acuáticos, sus ventajas son numerosas.

10. PERSPECTIVAS

- **Perspectiva 1: Innovación biotecnológica en el control vectorial.** El presente trabajo contribuye significativamente al desarrollo de bioinsecticidas sostenibles mediante la optimización de medios de cultivo alternativos para *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). La incorporación de sustratos de bajo costo y alta disponibilidad, como jarabe de maíz, sólidos de remojo del maíz y harina de semilla de girasol, demuestra un enfoque innovador hacia la biotecnología aplicada con sustentabilidad económica. Este planteamiento permite reducir costos de producción y facilitar la escalabilidad industrial, haciéndolo viable para programas de salud pública en países en vías de desarrollo. Asimismo, la obtención de formulaciones en tableta y granuladas amplía las posibilidades de aplicación en diversos escenarios ecológicos. En conjunto, estos resultados consolidan un modelo de innovación biotecnológica alineado con los principios de bioseguridad y producción sustentable (Federici, 2005; Glare & O’Callaghan, 2019).
- **Perspectiva 2: Relevancia ecológica y sanitaria.** Desde un enfoque ecológico y sanitario, esta investigación refuerza las estrategias de control biológico frente a la creciente incidencia de enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*, tales como dengue, chikungunya y zika. Los resultados evidencian la eficacia del Bti bajo diferentes condiciones ambientales, así como su estabilidad ante factores físicos como la radiación ultravioleta y el almacenamiento prolongado. Dichas propiedades lo consolidan como una alternativa ecológicamente segura frente a los insecticidas químicos convencionales. La especificidad de acción y la baja probabilidad de generar resistencia en poblaciones de mosquitos representan un avance fundamental en la gestión integrada de vectores. De esta manera, los bioinsecticidas basados en Bti constituyen una herramienta eficaz para el control larvario con un impacto ambiental mínimo, contribuyendo a la sostenibilidad de los ecosistemas urbanos (Ben-Dov, 2014; Bravo, Likitvivatanavong, Gill & Soberón, 2011).
- **Perspectiva 3: Impacto científico y proyección futura.** Desde el punto de vista

científico, el trabajo sienta las bases para el perfeccionamiento de formulaciones microbianas mediante la integración de disciplinas como la microbiología aplicada, la ingeniería de bioprocesos y la toxicología entomológica. El diseño experimental que incluyó la determinación de la concentración letal media (CL_{50}), la evaluación del efecto de la radiación UV y la comparación entre formulaciones de distinta liberación, aporta evidencia sólida sobre la eficacia y estabilidad del bioinsecticida. A futuro, se propone la exploración de nuevas combinaciones de Bti con otros agentes biocontroladores o nanopartículas biodegradables que potencien su estabilidad fotoquímica y prolonguen su acción residual en campo. Estos avances permitirían generar formulaciones más resilientes, con liberación controlada y efectividad prolongada en ambientes tropicales y subtropicales (Park et al., 2019; Su & Mulla, 1999; Lacey, 2007).

11. REFERENCIAS CITADAS

- Abdel-Hameed, A., G. Calberg, and O. M. El-Tayeb. 1991. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt. IV. Characterization of fermentation conditions for endotoxin production. W. J. Microbiol. and Biotechnol:231-236.
- Alfaro-Tolosa, P., Clouet-Huerta, D. E., & Rodríguez-Morales, A. J. (2015). Chikungunya, the emerging migratory rheumatism. The Lancet Infectious diseases, 15(5), 510-512.
- Ali, A., Xue, R., Lobinske R. Y. N. Carandag. 1994. Evaluation of granular corn cob formulations of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* against mosquito larvae using a semi-field bioassay method. J. Am. Mosq. Control. Assoc.10:492-495.
- Álvarez Escobar, M. D. C., Torres Álvarez, A., Torres Álvarez, A., Semper González, A. I., & Romeo Almanza, D. (2018). Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. Revista Médica Electrónica, 40(1), 120-128.
- Aly C, Mulla MS, Xu B-Z, Schnetter W. 1988. Rate of ingestion by mosquito larvae (*Diptera: Culicidae*) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. J Med Entomol 25:191-196.
- Aly C, Mulla, M.S., & Federici, B.A. (1985). Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (*Diptera: Culicidae*). J Invertebr Pathol, 46, 251-258
- Aly C. 1988. Filter feeding of mosquito larvae (*Dipt., Culicidae*) in the presence of the bacterial pathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J Appl Entomol 105:160-166.
- Aly, C., M.S. Mulla, W. Shnetter, and B. Z. Xu. 1987. Floating bait formulations increase effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, against *Anopheles* larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3:583-588.
- Al-yahyaee, S. A. y Ellar, D. J. 1995. Maximal toxicity of cloned Cyt1A δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both N- and C-termini. Microbiology141:3141-3148.
- Araújo A. P., Varjal M. A., Oliviera S., Mariz E. M., Regis L. 2007. Evaluation of an experimental product base on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (*Diptera: Culicidae*). Biological Control 41: 339-347.
- Armengol G., Hernández J., Velez J. G. y Orduaz S. 2006. Long-Lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) control. J. Econ. Entomol. 99 (5): 1590-1595.
- Aronson A.I.; Angelo N. y S.C. Holt. 1971. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: Characterization of mutants produced altere amounts of protease. J. Bacteriol .106: 1016-1025.
- Aronson, A. L. W. Beckman, y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol Rev. 50: 1-24.
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus in Latin America. Acta pediátrica de México, 37(2), 111-131.
- Bauman, P., M. A. Clark, L. Bauman y A. H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxin. Microbiol. Rev. 55: 425-436.
- Beck M, Ludwig M, Becker N. 1996. Impact of microorganisms and water quality on the efficacy of *Bacillus sphaericus* Neide against *Culex pipiens* larvae in the laboratory. J Vector Ecol

21:25–30.

- Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F. 1992. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. J Am Mosq Control Assoc 8:285–289.
- Behle, R. W., M. R. McGuire, and B. S. Shasha. 1996. Extending the residual toxicity of *Bacillus thuringiensis* with caseinbased formulations. J. Econ. Entomol. 89: 1399–1405.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., William-Wint, G.R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J. & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. Nature, 496(7446), 504.
- Bohm H.A. and D. R. Friend 1988. Microcapsules containing insecticidal pathogen stabilized against UV light comprising acrylate-type encapsulating agent which retains sunscreen, e.g., malachite green. Lim Technical Laboratories. Patent N. WO8904170.
- Boisvert M, Boisvert J. 1999. Persistence of toxic activity and recycling of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cold water: field experiments using diffusion chambers in a pond. Biocontr Sci Technol 9:507–522.
- Boisvert, M. & Boisvert, J. (1999). Persistence of toxic activity and recycling of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cold water: field experiments using diffusion chambers in a pond. Biocontrol Science and Technology, 9, 507-522.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. y Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. Insect. Biochem. Mol Bio. 41:423–431.
- Bravo, A.; M. Soberón; I. Gómez; C. Muñoz; L. Pardo; L. Galán; H. Luna; A. Alcázar; B. Pereyra; J. A. Carrillo; R. García; L. Serrano; M. Patino; E. Galindo; M. C. del Rincón; J. E. Ibarra; 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev. Latinoam. Microbiol. 48(2):113-120.
- Carreras, B. 2003. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario. Tesis en opción al título de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana.
- Carroll, J. y Ellar, D. J. 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light scattering assay. Eur. J. Biochem. 214, 771-778.
- Castro-Franco R. 1994. Desarrollo de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* y extracto de *Agave lechugilla* para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith). Tesis inédita Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L.
- Castro-Franco, R., J. S. García Alvarado, and L. J. Galan Wong. 1998. An alternative bioinsecticide formulation to encapsulate *Bacillus thuringiensis* toxin and extracts of *Agave lechuguilla* for the control of *Spodoptera frugiperda* Smith. YTON 62: 71–77.
- Center for Disease Control (CDC). 1987. *Aedes aegypti* in the Americas: Biology, Distribution and Public Health Importance. Division of Vector-Born Viral Disease. Fort Collins, Colorado. pp. 50.
- Center for Disease Control (CDC). 1987. *Aedes aegypti*, Vector Topics No. 4 (U.S. Dept of Health Education and Welfare, Public Health Service) Atlanta, Georgia. pp. 80
- Chilcott C, Pillal BS. The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. Department of Microbiology, University of Otago; 1985.
- Christiansen JA, McAbee RD, Stanich MA, DeChant P, Boronda D, Cornel J. 2004. Influence of

- temperature and concentration of VectoBacH on control of the salt-marsh mosquito, *Ochlerotatus squamiger*, in Monterey County, California. J Am Mosq Control Assoc 20:165–170.
- Clouet-Huerta, D., Alfaro-Tolosa, P., & Rodríguez-Morales, A. J. (2014). Chikungunya en las Américas: Preparación, vigilancia y alerta en Chile. Revista chilena de infectología, 31(6), 761-762.
- Colón-González, F. J., Lake, I. R., & Benthall, G. (2011). Climate variability and dengue fever in warm and humid Mexico. The American journal of tropical medicine and hygiene, 84(5), 757-763.
- Connick W. J. 1988. Formulation of living biological control agents with alginate. In: Pesticide formulations: Innovations and developments. Cross B. and Scher H. B. Eds. American Chemical Society. Washington. D. C.
- Connick, W. J., Lewis, J. A. y Quimby, P.C. 1989. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 112.
- Couch T.L. y R. Ross. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. Biotech and Bioeng. 22:1297.
- Couch, T. L. y Ignoffo, C. M. 1981. Formulation of insect pathogens. H.D. Burges (Ed.). Microbial control of pests and plant diseases. Academic. Press, N.Y. 621-634.
- CRC, 1978. British Patent 1,501 563.
- Crickmore N, Zeigler D, R Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, et al. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev.62:807–813.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, B. Lambert, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean (1995) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Cry genes. Microbiol. Rev. En prensa.
- Darsie, R. E. G. and R. A. Ward. 1981. Identification and geographical distribution of the mosquito of North America, North of Mexico. Mosq. Syst. Suppl 1:1-313.
- De Barjac H, Larget-Thiery I. 1984. Characteristics of IPS-82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimeographed document. WHO/VBC/84.892. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- De Barjac H. y Larget-Thiery.1979. Proposals of the adaption of a standardized bioassay for the evaluation of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. WHO/VBC 79. 744.9p.
- De Barjac, H. 1978 (a). Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. israelensis serotype 14. C.r. hebdomadaire Seances Acad. Sci. Paris, serieD.
- De Barjac, H. 1978 (b). Etude cytologique de l'action de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis sur les larves de moustiques. C.r. hebdomadaire Seances Acad. Sci. Paris serie D 286: 1629-1632.
- De Barjac, H. 1978. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes; *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. Compte Rendu Acad. Sci. Paris Ser. D. 286:797-800.
- De Barjac, H. 1979 Note sur la préparation d'une formulation de référence, IPS-78, pour le titrage biologique des formulations expérimentales et industrielles du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. Mimeographed document WHO/VBC/79.741:1-6
- De Barjac, H. 1985. Standardized test for the determination of the susceptibility of mosquito larvae

- to bacterial toxins. WHO Report VBC/ECV/EC/85.25. Geneva, Switzerland.
- De Barjac, H., I. Larget-Thiéry, V. Cosmano-Dumanoir, H. Ripouteau, 1985. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains on the basis of toxicity to mosquito larvae, Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:85-90.
- De Melo-Santos MAV, Sanches EG, de Jesus FJ, Regis L. 2001. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz 96:859–860.
- De Melo-Santos, M. A. V., de Araújo, A. P., Rios, E. M. M., & Regis, L. (2009). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places are associated to bacteria recycling. Biological Control, 49(2), 186-191.
- Delécluse, A., C. Bourgoïn, A. Klier, and G. Rapaport. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. Mol. Gen. Genet. 214: 4-47.
- Delécluse, A., M. L. Rosso y A. Ragni (1995) No publicado. En GeneBank (Genomenet WWW server, 8 de noviembre de 1995).
- Despres, L., Lagneau, C. & Frutos, R. (2011) Using the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in mosquito control. Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment (ed. M. Stoytcheva), pp. 93–126. InTech, Rijeka, Croatia
- Donovan, W. P., C. C. Dankocsik, M. P. Gilbert, M. C. Gawron-Burke, R.G. Groat y B. C. Carlton 1988a. Amino acid sequence and entomocidal activity on the P2 crystal protein: an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. 263:561-567.
- Donovan, W. P., C. Dankocsik and M. P. Gilbert 1988c. Molecular Characterization of gene encoding a 72-kilodalton mosquito toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. bacteriol. 170:4732-4738.
- Drake, B. B & C. V. Smythe, 1963. U. S. patent. 3,087 865.
- Dulmage H.T.; Correa J.A. y Gallegos-Morales G. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standarization and fermentation development. In: Bacterial control of mosquitoes & black flies. Rutgers University Pries, 1990. P.110-131.
- Dulmage H.T.; Correa J.A. y Gallegos-Morales G. Production of bacteria for biological control of insects. In: Biological control of crop production, G.C. Papavizas. Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allenhed, Oamun and Co., Totowa. N.J. 5 :129. 1981
- Dulmage H.T.; Correa J.A. y Gallegos-Morales G. Production of spore-endotoxin complex by variants so *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Phatol. 18: 353-358. 1970.
- Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol 15:15-20.
- Dulmage, H. T. 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*. Serotype 3, in 3 fermentation media J. Invertebr Pathol. 18: 353-358.
- Dulmage, H. T. 1981. Production of bacteria for biological control of insects. En: Biological control of crop production, G. C. Papavizas (Ed.) Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanhed, Osmun and Co. Totowa, N. J.
- Dulmage, H. T., Correa, J. A. & Gallegos-Morales, G. 1990. Potential for improved formulations

- of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development. In Bacterial control of mosquitoes and black flies: biochemistry, genetics, and applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* (eds H. de Barjac & D. Sutherland), pp. 110-133. Rutgers University Press, New Brunswick.
- Dunckle, R. L. and B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol. 17:120-126.
- Ejiofor, A. O. 1991. Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of ÔspentÕ brewerÕs yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. Discov. Innov 3: 85Ð 88.
- EPA 1999, Agencia de protección ambiental de Estados Unidos, Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas, Quinta Edición. 1999. Capítulo 7: Insecticidas de origen biológico. 72 – 83.
- Faust, E. C., P. F. Russel, y R. C. Jung. 1974. Parasitología clínica. Reimpresión 1979. Salvat (Eds), S. A. Mallorca, España. p 88.
- Federici 1982
- Federici A. Site of action of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in mosquito and blackfly larvae. In: Basic biology of microbial larvicides of vector of human diseases. Special program for research and training in tropical diseases. Geneva, Switzerland: UNDP/WORLD BANK/WHO; 1982. p. 37-47.
- Federici, B.A., Luthy, P. & Ibarra, J.E. (1990). Parasporal body of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, structure, protein composition and toxicity. In: Bacterial control of mosquitoes and black flies (Editors, H. de Barjac. & D.J. Sutherland) pp 6-44. Rutgers University Press, New Jersey.
- Federici, B.A., Park, H.W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., & Johnson, J.J. (2003). Recombinant bacteria for mosquito control. J. Exp. Biol., 206, 3877-3885.
- Feitelson J. S., J. Payne y L. Kim. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Bio/technology 10:271-275, 1992.
- Fernández, Orietta, y Vega, Larrea. 2002. Tecnologías de Producción de *Bacillus thuringiensis*. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 63:110-115.
- Fernández-Salas I, Flores-Leal A. El papel del vector *Aedes aegypti* en la epidemiología del dengue en México; Salud Pública, Mex 1995; 37, supl., 45-52.
- Fernández-Salas, I., Danis-Lozano R, Casas-Martínez M: Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. Antiviral Research. 2015; 124:30-42.
- Fleischer, and M. N. Inscoe. 1996. Granular matrix formulation of *Bacillus thuringiensis* for control of corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 89: 1088Ð1094.
- Fleming G. Biología y ecología de los vectores de malaria de las Américas. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1986.
- Foo, A., and H. H. Yap. 1982. Comparative bioassays of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations against four species of mosquitoes in Malaysia. Southeast Asian J. trop. Med. Pub 206-210.
- Gala GA. La infección por virus Mayaro: algunos datos importantes sobre su epidemiología. Revisión. BOLIPK. 2010; 20 (22): 169-171.

- Galán-Wong, L.J. Rodríguez-Padilla C. y Luna-Olvera H. A. (Eds) grafo Print Editores, S. A. 63-113.
- Galán L.J.; J.A. García; Ellis S.M.; Quintero Z.I. y H.A. Luna O. 1996. Production of *Bacillus thuringiensis*. En: Avances en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico. 139-152.
- García, R., and B. Desrochers, 1979, Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to some California mosquitoes under different conditions. Mosquito News. 39: 541-544.
- García, R., B. Desrochers, W. Tozer and J. Mcnamara. 1983. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) var. *israelensis* for mosquito control. Proceedings and Papers of the fifty first Ann. Conf. of Calif. Mosq. And vec. Cont. Assoc. pp 25-29.
- Gašić, S., & Tanović, B. (2013). Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. Pesticidi i fitomedicina, 28(2), 97-102.
- Gloria I. Giraldo-Calderón, Mauricio Pérez, Carlos A. Morales, Clara B. Ocampo. 2008. Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. Biomédica 28:224-33.
- Goldberg I.; Sneh B.; Battat E. y D. Klein. Optimization of medium for high yield production of spore-cristal preparation of *Bacillus thuringiensis*. Effective against the aegyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd. Biotechnol. Lett. 2 :419-426. 1980.
- Goldberg, L. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37: 355-358.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernández, L., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M. y Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. Peptides 28(1):169-173.
- Gómez-Dantés, Rodríguez MH. 1994. Paludismo y Dengue: de la erradicación a las zonas de riesgo. Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud, México: 10, 55.
- Gould, F., Magori, K., & Huang, Y. (2006). Enfermedades transmitidas por mosquitos. Investigación y Ciencia, 359, 62-71.
- Guillet, P., et H. Escaffre. 1979 Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. I. Resultats des premiers essais raliss sur le terrain. Mimeographed document WHO/VBC/79.730.1-7.
- Guillet, P., H. Escaffre, y J.M. Prud, Hom. 1982. L'utilisation d'une formulation a base de *Bacillus thuringiensis* H-14 dans la lutte contre l' Onchocercose en Afrique de Ouest Efficacit et modalits d' application. Cach. O.R.S. TOM Ser. Ent. Med. Et Parasitol.
- Hall, I., and K. Arakawa 1980. Development of a standard bioassay method for determining potency of commercial *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* University of California, Mosquito Control Research, Ann Report. 63-65.
- Hall, I.M., K. Y. Arakawa, H.T. Dulmage, and J.A. Correa, 1977. The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and to *Culex* mosquitoes. Mosquito News 37: 246-251.
- Halstead SB. A re-examination of the history of etiologic confusion between dengue and chikungunya. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(11): e0004101.doi:10.1371/journal.pntd.0004101.

- Harwood RF y James MT. 1987. Entomología Médica y Veterinaria. UTEHA, Noriega Editores. México, D.F. pp. 201-272.
- Höfte, H, y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* Microbiol Revius. 53: 242-255.
- Ibarra, J.E., & Federici, B.A. (1986). Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. J. Bacteriol., 165, 527-533.
- Insell, J. P. 1983. Studies on the structure and origin of the parasporal inclusion of sporulating Bacilli. Ph.D. Thesis, University of Western Ontario, London, Ontario Canada.
- Ioos S, Mallet HP, Leparc-Goffart I, Gauthier, I., Cardoso, T., Herida, M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. Médecine et Maladies Infectieuses. 2014;44(11):302-7.
- James F. Harwood, Muhammad Farooq, Brent T. Turnwall, and Alec G. Richardson. 2015. Evaluating Liquid and Granular *Bacillus thuringiensis var. israelensis* Broadcast Applications for Controlling Vectors of Dengue and Chikungunya Viruses in Artificial Containers and Tree Holes. Journal of Medical Entomology 52(4), 663-671.
- Jarai, M. 1972. Oxygen transfer in the fermentations of primary and secondary metabolites. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today. 97-103.
- Jentes, E. S., Lash, R. R., Johansson, M. A., Sharp, T. M., Henry, R., Brady, O. J., Sotir, M. J., Hay, S.I., Margolis, H. S. & Brunette, G. W. (2016). Evidence-based risk assessment and communication: a new global dengue-risk map for travellers and clinicians#. Journal of travel medicine, 23(6), taw062.
- Karow, E. O., W. H. Bartholomew, and M. R. Sfat. 1953. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentation. J. Agric. Food Chem. 1: 302-306.
- Kawalek, M.D., S. Benjamin, H. L. Lee, and S. S. Gill, 1995, Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2965-2969.
- Khawaled K., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., & Barak, Z. (1990). The fate of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* in *B. thuringiensis var. israelensis*-killed pupae of *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Pathol. 56, 312–316.
- Khormi, H. M., & Kumar, L. (2014). Climate change and the potential global distribution of *Aedes aegypti*: spatial modelling using GIS and CLIMEX. Geospatial health, 8(2), 405-415.
- Kim, N. J., Kim, I. H., & Lee, D. K. (2006). Semi-field and Field Evaluations of Floating Briquette Formulation of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* against Three Mosquito Species in Republic of Korea. Journal of Asia-Pacific Entomology, 9(1), 67-73.
- Klowden, M. L., G. A. Held and L. A. Bulla. 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to adults of *Aedes aegypti* mosquitoes. App. Environ Microbiol 46: 112-115.
- Knowles BH 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxin. Adv Insect Physiol 24:275-308.
- Knowles, A. (2005). New developments in crop protection product formulation. (pp. 153-156). Agrow Reports UK: T and F Informa UK Ltd.
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* occurrence. Sci Data. 2015 Jul 7; 2:150035. Citado en PubMed; PMID: 26175912.
- Kramer VL, Garcia R, Colwell AE. 1988. An evaluation of *Gambusia affinis* and *Bacillus*

- thuringiensis* var. *israelensis* as mosquito control agents in California wild rice. J Am Mosq Control Assoc 4:470–478.
- Kramer VL. 1990. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, and methoprene against *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae) in tires. J Econ Entomol 83:1280–1285.
- Kroger, A., U. Dehlinger, G. Burkhardt, W. Atehortua, H. Anaya, and N. Becker. 1995. Community based dengue control in Columbia: people's knowledge and practice and the potential contribution of the biological larvicide Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*). Trop. Med. Parasitol. 46: 241-246.
- Lacey LA, Undeen AH. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. Ann Rev Entomol 31:265–296.
- Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Association, 23(sp2), 133-163.
- Lacey, L. A., H. Escaffre, B. Philippon, A. Sketeh and R. Guillet. 1982. Large River treatment with *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the Onchocerciasis Control Programme. Tropen Med Parasit 33: 97-101.
- Lacey, L.A, M. J. Urbina and C. M. Heitzman. 1984. Sustained release formulations of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) for control of container breeding *Culex quinquefasciatus*. Mosquito News. 44: 26-32.
- Lecadet M. M., E. Frachon, V. Cosmao Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent, I. Thiery. 1999. Updating the H- antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 86: 660-672.
- Lecadet, M.M. (1996). La lutte bactériologique contre les insectes: une vieille histoire très actuelle. Annales de l'Institut Pasteur, Actualités 7(4):207-216.
- Lednicky J, De Rochars VM, Elbadry M, Loeb J, Telisma T, Chavannes S et al. Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. Emerg Infect Dis. 2016; 22 (11): 2000-2002. doi. 10.3201/eid2211.161015.
- Lee, W. J., & Lee, D. K. (2004). Laboratory assessment of a formulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against five medically important species of mosquito larvae in Republic of Korea. Journal of Asia-Pacific Entomology, 7(1), 133-136.
- Lenau, T. A., Hesselberg, T., Drakidis, A., Silva, P., & Gomes, S. (2017, April). Mosquito inspired medical needles. In Bioinspiration, Biomimetics, and Bioreplication 2017 (Vol. 10162, p. 1016208). International Society for Optics and Photonics.
- Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C., & De Lamballerie, X. (2014). Chikungunya in the Americas. The Lancet, 383(9916), 514.
- Levy, R., C.M. Powel, B.C. Hertlein, and T.W. Miller J.R..1984. Efficacy of Arosurf MSF (Mononuclear surface film) base formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mixed populations of mosquito larvae and pupae: Bioassay and preliminary evaluations. Mosquito News 44: 537-543.
- Linek, V., P. Bernes, and V. Vacer. 1988. Measurement of the aereation capacity of fermenters. Chem. Eng. Techol.
- Liu, Y. T., M. J Sui, D. D Ji. I. H. Wu, C. C. Chou, and C. C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Invertebr Pathol. 62: 131 – 136.

- Lord JC, Undeen AH. 1990. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin by dissolved tannins. *Environ Entomol* 19:1547–1551.
- Lorence-Quiñones A. y Quintero- Ramírez R. 1996. Mecanismo molecular de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En: Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*.
- Luna, C.L., Lopes, C.E., Massarani, G., 2002. Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 25, 213-216.
- Lüthy, P., J. L. Cordier, and H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* a bacterial insecticide Basic considerations and application. En: Microbial and Viral pesticides, E. Kurstak (Ed), Marcel Dekker, New York, N. Y. pp 35.
- Lyn, M. E., Burnett, D., Garcia, A. R., & Gray, R. (2010). Interaction of water with three granular biopesticide formulations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(3), 1804-1814.
- Majori, G, and A. Ali. 1984. Laboratory and field evaluations of industrial formulations of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against some mosquito species of central Italy. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 316-323.
- Maldonado-Blanco. M. G., L. J. Galán-Wong, K. Arévalo-Niño, H. Medrano-Roldán, R. Tamez Guerra and C. Rodríguez Padilla. 1998. Production of δ -endotoxina by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 based on agroindustrial byproducts in Northeastern Mexico. *Israel J. of Entomol.* XXXII, 37-44.
- Maldonado-Blanco. M.G., 2001. Producción y Formulación de un Bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 para el control de mosquitos culicidos en el noreste de México. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Margalit J., A. markus and Z. Pelah 1984. Effect of encapsulation on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotype H-14. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:382-383.
- Martínez-Sánchez A, Martínez-Ramos EB, Chávez-Angeles MG: Panorama situacional de México ante la pandemia del virus chikunguña. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015; 53(2): 200-5.
- McGuire, M. R., B. S. Shasha, C. E. Eastman, and H. O. Sagedchi. 1996. Starch and flour-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 863-869.
- Megna J. C. 1963. U.S. Patent 3,073,749.
- Melo-Santos, M. A., E. G. Sanches, F. J. de Jesus, and L. Regis. 2001. Evaluation of a new Tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 859-860.
- Ministerio de Salud. Informe ejecutivo proyectado al 31- 12-98. Trujillo: MINSA, 1998.
- Morales, A. J. R. (2015). No era suficiente con dengue y chikungunya: llegó también Zika. *Archivos de Medicina*, 11(2), 3.
- Morales, L., M. McGuire, L. Galán, and F. Castro. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Southwest. Entomol.* 25: 59-67.
- Morales-Ramos LH, McGuire MR, Galán-Wong LJ. 1998. Utilization of several biopolymers for granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ Entomol* 91:1109-1113.
- Morales-Ramos, 1996. Formulación de Bioinsecticidas. En: Galán-Wong, L. J., Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. pp161.

- Mulla MS, Darwazeh HA, Zgomba M. 1990b. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. Bull Soc Vect Ecol 15:166–175.
- Mulla, M. S., B. A. Federici and H. A. Darwaseh. 1982. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against flood water mosquitos. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1288-1293.
- Mulla, M. S., U. Thavara, A. Tawatsin, and J. Chompoosri. 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. J. Am. Mosq. Control Assoc. 20: 64-73.
- Mulligan FS III, Schaefer CH. 1982. Integration of a selective mosquito control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H.14, with natural predator populations in pesticide-sensitive habitats. Proc Pap 49th An Conf Calif Mosq Vect ContrOL Assoc. April 26– 29, 1981, p 19–22.
- Mummigatti, S. G., and N. Raghunathan. 1990. Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 55: 147–151.
- Murat-Elcin Y. 1995. *Bacillus sphaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. Enzyme and Microbial Technology 17: 587-591.
- Murga G.M.A. 1983. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-2 en diferentes medios de cultivo. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México.
- Napolea-Pego P, Gomes LP, Provance-Jr DW, et al: Mayaro Virus Disease. J Hum Retrovirol (2008) 1(3): 00018. DOI:10.15406/jhvr.2014.01.00018).
- Narva K. E., J. Payne and J. S. Feilteson, 1994. Novel *Bacillus thuringiensis* toxins active against coleopteran larvae. No publicado. En GeneBank 85 (geneWorks 2.4, release 14.0 October 94).
- Navarrete-Espinosa J, Gómez-Dantés H: Arbovirus causales de fiebre hemorrágico en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2006;44 (4):347-353.
- Nayar JK, Knight JW, Ali A, Carlson DB, O'Bryan PD. 1999. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. J Am Mosq Control Assoc 15:32–42.
- Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. REF: PNSP/86-93. Washington, D.C: 50.
- Nicolas, L. 1992. Bacteriological control of mosquitoes and blackflies: present aspects and perspectives of research. Área de Informação da Sede-Artigo em periódica indexado (ALICE).
- Nicolas, L., Luquiaud, P., Lardeux, F., & Mercer, D. R. (1996). A polymerase chain reaction assay to determine infection of *Aedes polynesiensis* by *Wuchereria bancrofti*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90(2), 136-139.
- Obeta, J. N., and N. Okafor. 1984. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 863–867.
- Ohba, M. and K. Aizawa. 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis subsp. kyushuensis*. J. Invertebr Pathol. 33: 387-388.

- Okello, H. O., J. G. Brennan, M. J. Lewis, and S. Gilmour. 1998. Optimization of the spray drying of the enzyme polyphenol oxidase by response surface methodology, pp. 1913-1922. In *Drying '98*, Proceedings of the 11th International Drying Symposium, vol. C. 19-22 August 1998, Halkidiki, Greece.
- Oldstone MBA. 2002. Virus, pestes e historia. Fondo de Cultura Económica. México: 67 – 101.
- Olivares-Sáenz, Emilio. 1994. Paquete de Diseños Experimentales. FCUANL, versión 2.5 Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L.
- Ordúz, S., R. William, M. M. Correa, A. E. Montoya, and H. de Barjac, 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 99-103.
- Organización Panamericana de la Salud: Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas. Washington, D.C. 2011; 1: 1-148.
- Ortiz A, Braso A, Quintero R. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos. *Revista de la Universidad Ciencia y Tecnología* 1992; 3: 45-9.
- Olivares-Saénz, E. (1994), Paquetes de diseños experimentales FAUANL (computer Accepted program) Version 2.5 Statistics Software Program. Available from Agronomy Faculty, Autonomous University of Nuevo Leon. Marín, Nuevo León Mexico.
- Padilla, C., Pardo-Lopez, L., de la Riva, G., et al. (2006) Role of tryptophan residues in toxicity of Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 901-907.
- Padua, L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selective toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 44: 12-17.
- Padua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 36: 180-186.
- Pearson, D. and O. P. Ward. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.* 10: 451-456.
- Perich, M. j., J. T. Rogers and L. R. Boobar. 1987. Efficacy of Arosurf MSF and formulations of *B. thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles albimanus*. *Laboratory bioassay. J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3: 485-488.
- Platt KB, Linthicum KJ, Myint KSA, Innis BL, Lerdthusnee KI, Vaughn DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behaviour of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 57: 119 - 125.
- Poncet, S., Delécluse, A., Klier, A., & Rapoport, G. (1995). Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66(2), 131-135.
- Poopathi, S. 2005. Microbial fermentation process from bird feather for the production of bio-pesticides. Indian Patent Application No. 319/Del/2005.
- Poopathi, S., & Abidha, S. (2009). A Medium for the Production of Biopesticides (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) in Mosquito Control. *Journal of economic entomology*, 102(4), 1423-1430.
- Poopathi, S., and K. Anup Kumar. 2003. Novel fermentation medium for the production of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, in mosquito control. *J. Econ Entomol.* 96: 1039

Đ1044.

- Poopathi, S., and S. Abidha. 2007. Use of feather-based culture media for the production of mosquitocida bacteria. *Biol. Control* 43: 45Đ55.
- Poopathi, S., K. Anupkumar, L. Kabilan, and V. Sekar. 2002b. Development of low-cost media for th culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis. *Worl J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 209 Đ216.
- Poopathi, S., K. Anupkumar, N. Arunachalam, V. Sekar, and B. K. Tyagi. 2003. A small scale mosquito control Đeld trial with the biopesticides *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* produced from a new culture medium. *Biocontrol Sci. Technol.* 13: 743Đ748
- Poopathi, S., Mani, C., & Rajeswari, G. (2013). Potential of sugarcane bagasse (agro-industrial waste) for the production of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Tropical biomedicine*, 30(3), 504-515. Sekar 1986
- Prabakaran, G., & Balaraman, K. (2006). Development of a cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus thuringiensis var israelensis*. *Biological Control*, 36(3), 288-292.
- Priest, F. G. 1992. A review. Biological control of mosquitoes and other biting Đies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 357Đ369.
- Puchi, N. D. (2005). Factors affecting the efficiency and persistance of *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* on *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), a malaria vector in Venezuela.
- Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, L., Kaplan, H., Lessard, T., & Carey, P.R. (1991) The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochemical Journal* 273, 43-47.
- Ramírez-Suero, M., Robles-Olvera, V., & Ramirez-Lepe, M. (2005). Spray-dried *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. *Journal of economi entomology* 98(5), 1494-1498.
- Reicheldelfer K.H. 1981. Economic feasibility of biological control of crop pests in biological control in crop production, G.C. Papavizas, Beltsville Symposia in Agricultural Research, Allanheld, Osmun and Co., Totowa N.J. 5: 403.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG. 1995. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium - marked eggs. *Am J Trop Med Hyg* 52: 177 - 179.
- Reyes- Villanueva F. 1990. El Dengue, Binomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciencia* 41: 45-55.
- Rhodes, D.J., Powell, K.A., Macqueen, M.P. y Graves, M.P.1990. Controlled Delivery of Biological Control Agents. Capítulo 11. "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M Ed.) Taylor & Francis. London. N.Y. Philadelphia. 215- 231.
- Ridgway, R. L., V. L. Illum, R. R. Farrar, D. D. Calvin, S. J.
- Risch, S. J. 1995. Encapsulation: overview of uses and techniques, pp. 2Đ7. In Sara J. Risch and Gary A. Reineccius [eds.], *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. American Chemical Society, Washington, DC.
- Rodríguez-Domínguez, J. (2009). Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de la Facultad de Medicina*, 45(003).

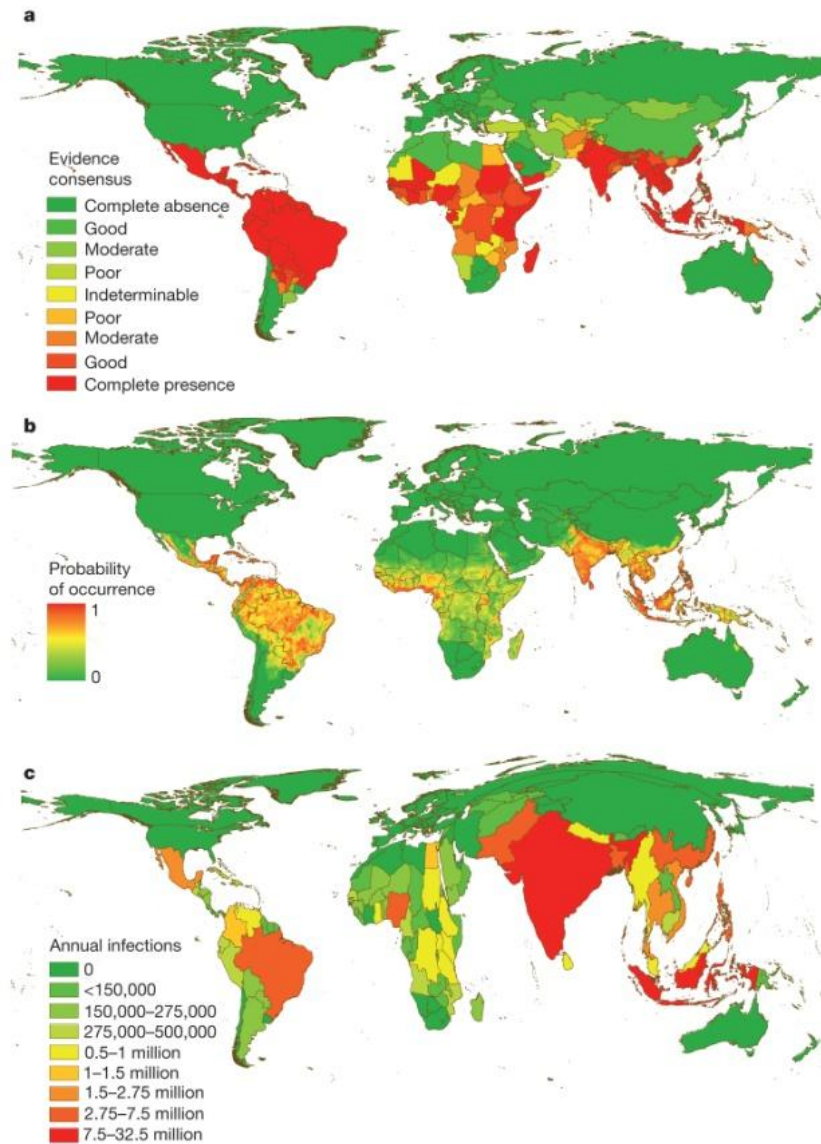
- Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB. et al. 1983 Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 32: 11108 1119.
- Rydzanicz, K., DeChant, P., & Becker, N. (2010). Field efficacy of granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis*-strain AM65-52 against floodwater mosquitoes in Poland and Germany. Journal of the American Mosquito Control Association, 26(3), 295-301.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H. T. Dulmage, and A. El-Sharaby. 1983a. Novel fermentation medium for production of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 41: 8 D19.
- Salma H.S. and O.N. Norris. 1983. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. Chap. 11 In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. Edited by P.F. Enwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. John Wiley & Sons Ltd. New York, N.Y.
- Santiago F.W., Halsey E.S., Silles C., Vilcarromero, S., Guevara, C., Silvas, J. A., Ramal, C., Ampuero, J. S., Aguilar. P. V. Long-Term arthralgia after Mayaro virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. PLoS Negl Trop Dis: 2015; 9(10): e0004104. doi: 10.1371 /journal. pntd.0004104 80.
- Satinder, K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi y J.R. Vale'ro. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochemistry 41:323–342.
- Schaefer, C. F. Mulligan, and W. Wilder. 1980. Operational evaluations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin. University of California, Mosquito Control Research, Ann Report 1980: 53-54.
- Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol.
- Schwartz, J., Potvin, L., Chen, X., Brousseau, R., Laprade, R. y Dean, D. 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. FEBS Lett 412:270-276.
- Secretaría de Salud. 2009. Manual para la vigilancia, Diagnóstico y Control del Dengue. México.
- Service MW. 1992. Importance of ecology in *Aedes aegypti* control. Southeast Asia J Trop Med Public Health 23: 681 - 689.
- Service, M. W. (Ed) 1986. Blood-sucking insects: vectors of disease. Edward Arnold.London.
- Shahidi, F., and X. Han. 1993. Encapsulation of food ingredients. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 33: 501D547.
- Shapiro, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. 82: 548-550.
- Siegel, J. P., A. R. Smith y R. J. Novak 1995. Cellular fatty acid analysis of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (ONR-60A) J. Am. Mosq. Control Assoc. 11: 176-185.
- Sikdar, D. P., M. K. Majumdar and S. K. Majumdar. 1991. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biotechnol. Lett. 13: 511 – 514.
- Sinègre G, Gaven B, Jullien JL. 1981. Contribution a`la normalization des epreuves de laboratoire concernant des formulations experimentales et commerciales du serotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. III – Influence separée ou conjointe de la densité larvaire, du volume ou profondeur de l'eau et de la presence de terre sur l'efficacité et l'action larvicide résiduelle

- d'une poudre primaire. Cah ORSTOM Entomol Me'd Parasito 19:157–163.
- Sinègre, G., Gaven, B., Julien, J.L., & Crespo, O. (1980). Effectiveness of the serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis* against the principal species of man-biting mosquitoes on the Mediterranean coast of France. *Parasitologia* 22:223-231.
- Skovmand O, Bauduin S. 1997. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African countries. *J Vect Entomol* 22:43–51.
- Skovmand, O., D. Hoegh, H. S. Pedersen y T. Rasmussen. 1997. Parameters influencing potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products. *J. Econ. Entomol.* 90:361-369.
- Smith, R. A. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* 28: 1089-1092.
- Soberón, M. y Bravo, A. 2003. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología Departamento de Biología Molecular. UNAM. [https://www.microbiología.org.mx/microbiosonline/CAPITULO_16/Capitulo 16.pdf](https://www.microbiología.org.mx/microbiosonline/CAPITULO_16/Capitulo%2016.pdf)
- Soccol, C. R., Pollom, T. E., Fendrich, R. C., Prochmann, F. A., Mohan, R., Blaskowski, M. M. M., ... & Soccol, V. T. (2009). Development of a low-cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* intended for biological control of *Aedes aegypti*. *Brazilian Archives o Biology and Technology*, 52, 121-130.
- Sparks, R. E., and I. C. Jacobs 1999. Selection of coating and microencapsulation processes, pp. 3Ð29. In Herbert B. Scher [ed], *Controlled-release delivery systems for pesticides*. Marcel Dekker, New York.
- Stoops CA. 2005. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). *J Vect Ecol* 30:41–44.
- Su, T. and M. S. Mulla 1999. Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex mosquitoes* in microcosms. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 356-365.
- Subsecretaría de prevención y promoción de la salud: Lista actualizada de productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir del 2015. Secretaría de Salud. [Acceso: 20 de diciembre del 2015]. Disponible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/ descargas/pdf>.
- Sutherst RW, Ingram JSI, Schem H. Global change and vector borne diseases. *Parasitology Today* 2001; 4(8): 297-299.
- Tadros, F. (2005). *Applied surfactants, principles and appli-cations*. (pp. 187-256). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.
- Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Shasha BS, Galán-Wong LJ.2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ Entomol* 93: 219-225.
- Tamez-Guerra, P., C. Garcí'a-Gutí'erez, H. Medrano-Roldan, L. J. Gala'n Wong, and C. F. Sandoval-Coronado. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varvesti mulsant*. *Southwest. Entomol.* 24: 37Ð 48.
- Thiéry, I. C. Back, P. Barbazan and G. Sinègre 1996. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* dans la demoustication et la lute contre les vecteurs de maladies tropicales. *Ann. Inst. Pasteur* 7: 247-260.

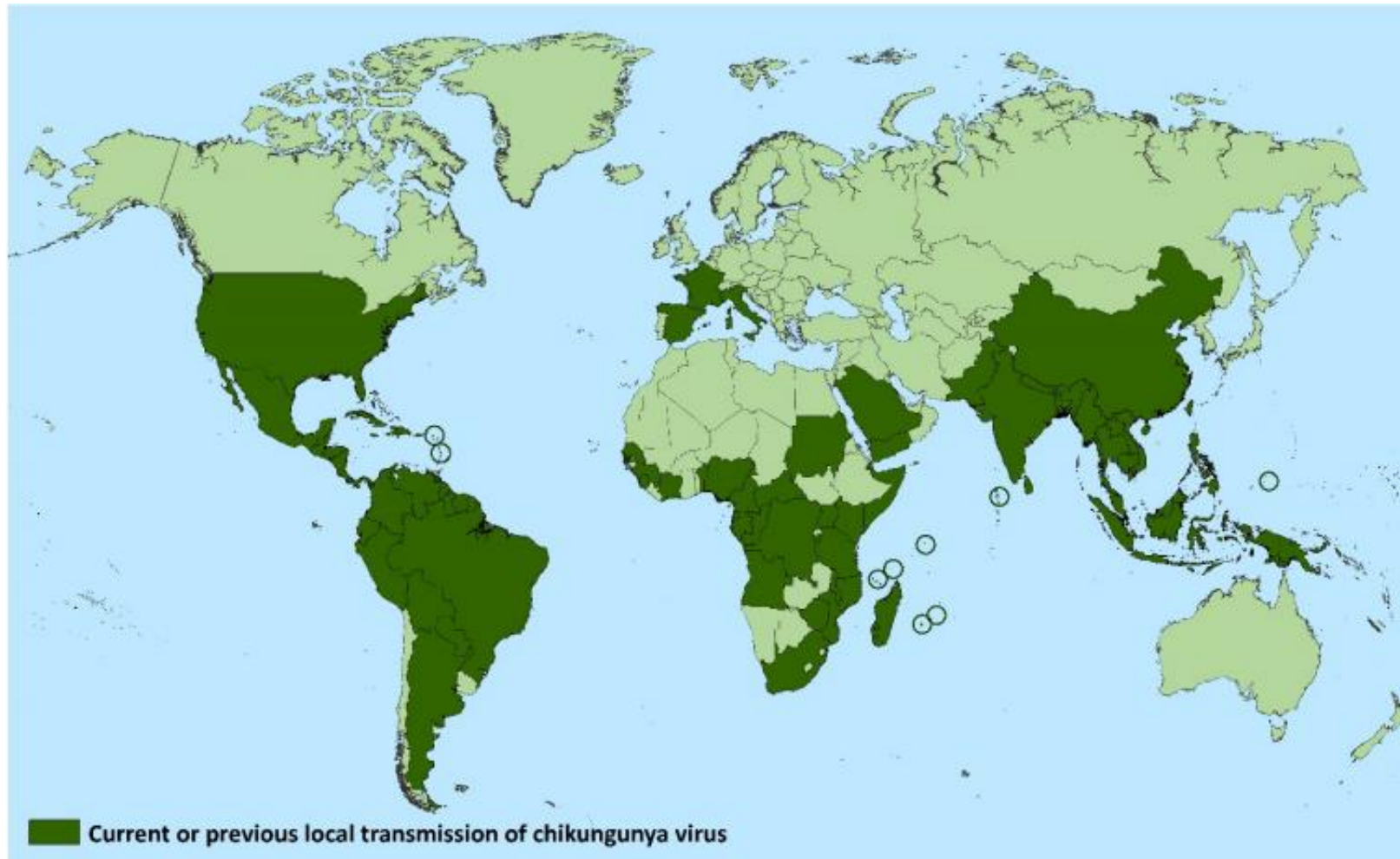
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R. A., et al. (2008). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis subsp israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. Plos One, 3(10).
- Toma, L., F. Secerini, A. Beñña, and R. Romi. 2003. A semifield evaluation of Vectobac DT (ABG – 6499), a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* for control of *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 19: 424-429.
- Tram, T., H. Nguyen, S. Tianyun, and M. S. Mulla. 1999. Mosquito control and bacteria flora in water enriched with organic matter and treated with *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations. J. Vector Ecol. 24: 138 D153
- Tyanyun, S., and M. S. Mulla. 1999. Field evaluation of new water dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquitos in microcosms. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 356 D361.
- U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control. Vector Topics No. 4. Biología y Control de *Aedes aegypti*. Ilustración 1, pg. 45., 1980.
- Undurraga EA, Betancourt Cravioto M, Ramos Castañeda J, et al. Economic and Disease Burden of Dengue in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9 (3). Citado en PubMed; PMID: 25786225.
- United States Applied and Environmental Health. Pest management Program 1989. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland.
- Uribarren-Berrueta T: Dengue, fiebre Chikungunya y otros arbovirus. Recursos en virología. México (2015). Acceso: 15 de noviembre del 2015. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>
- Van Essen, F. W. and S. C. Hembree. 1980. Laboratory bioassay of *Bacillus thuringiensis israelensis* against all instars of *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorynchus* larvae. Mosquito News. 40: 424-431.
- Van Essen, F. W. and S. C. Hembree. 1982. Simultated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, against mosquitoes. Mosquito News. 42: 66-72.
- Vandeker, M. and H. T. Dulmage. 1983. Guidelines for production of *B. thuringiensis* H-14. UNDP/World Bank/ W.H.O. Geneva, Switzerland.
- Velandia Romero, M. L., & Castellanos Parra, J. E. Virus del Dengue: estructura y ciclo viral. Infect [Internet]. 2011 Ene-Mar [citado 12 Dic 2014]; 15 (1): [aprox. 12 p.].
- Ventosilla P, Ruiz C, Guerra H, Marín D, Columbus I. Producción piloto usando cocos de *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* para el control biológico de *Anopheles* en áreas endémicas de malaria en el Perú. Rev Med Exp (2da época) 1997; XIV (2): 61.Lima, Peru.
- Vilarinhos, P. T., and R. Monnerat. 2004. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 20: 311-314.
- Walker, E. D. 1995. Effect of low temperature on feeding rate of *Aedes stimulans* larvae and efficacy of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (H-14) J. Am. Mosq. Control Assoc. 11: 107-110.
- Weiser J. 1991. Testing of activity of isolates. Chapter 13 En: Biological Control of vectors. J. Weiser (Ed). John Wiley & Sons: 89.
- WHO. 1979. Data sheet on the biological control agent *B. thuringiensis* serotype 14 De Barjac,

1978. Information document produced by the Who Division of Vector Biology and Control Who/VBC/79.750. Ginebra, Suiza: 1-12.
- WHO. 1982. Information document produced by the WHO Division of vector Biology and Control. The following is the first revision of the data sheet which appeared as WHO/VBC/79.750 and VBC/BCDS/79.01. Ginebra, Suiza: 1-44.
- Wirth, M.C., Delecluse, A., Federici, B.A. & Walton, W.E. (1998). Variable crossresistance to Cry 11B from *Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Applied Environmental Microbiology 64: 4174-4179.
- Wraight SP, Molloy DP, Singer S. 1987. Studies on the culicine mosquito host range of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis var. israelensis* with notes on the effects of temperature and instar on bacterial efficacy. J Invertebr Pathol 49:291–302.
- Yasri, S., & Wiwanitkit, V. (2015). New human pathogenic dengue like virus infections (Zika, Alkhumraand Mayaro viruses): A short review.
- Yousten, A. A., F. J. Genthner, and E. F. Benfield. 1992. Fate of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis serovar. israelensis* in the aquatic environment J. Am. Mosq. Control Assoc. 8: 143-148.
- Yu, Y. M., M. Ohba, and S. S. Gill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis subsp. fukuokaensis* crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1075-1081.
- Yu-Tien, L., S. Men-Ju, J. Dar-Der, W. I-Wang, C. Chin-Chi, and C. Cheng-Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. J. Invertebr. Pathol. 62: 131Ð136.
- Zamola, B., P. Valles, G. Meli, Miccoli, and F. Kajfez. 1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide base on *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol. Bioeng. 23: 1079-1086.
- Zárate-Nahón, E. A. 2012. Potencial de transmisión de dengue en zonas no domiciliarias a través de la búsqueda de hembras *Aedes aegypti* infectadas por virus del dengue en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Zúñiga Carrasco, I. R., & Caro Lozano, J. (2017). Virus Mayaro: una nueva amenaza para el continente americano. Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica, 30(1), 12-14.

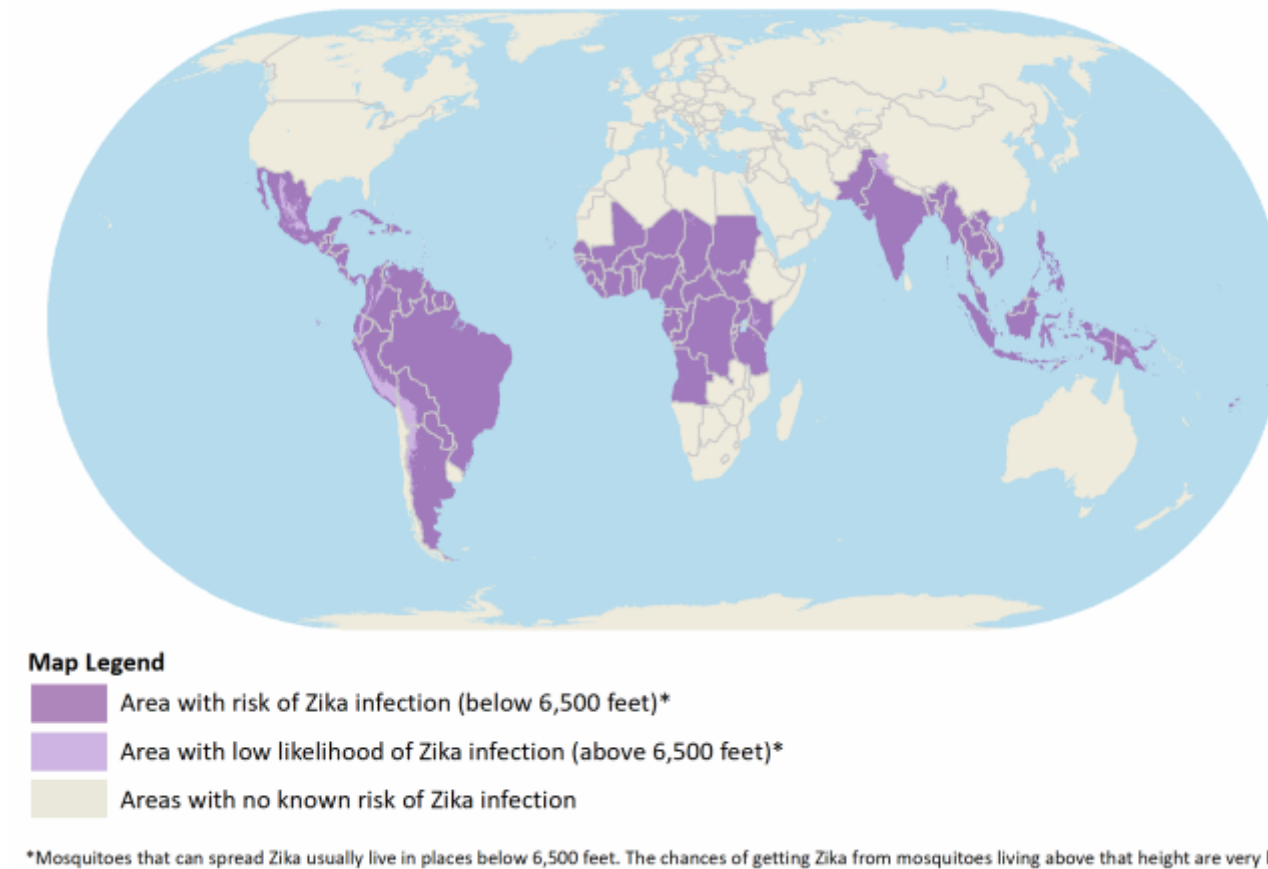
12. ANEXOS



Anexo I. Distribución geográfica global del Dengue. **a.** Evidencia de consenso nacional y subnacional sobre la ausencia completa (verde) hasta la presencia completa (roja) del dengue. **b.** Probabilidad de ocurrencia de dengue a 5 km × 5 km de resolución espacial del mapa pronosticado promedio (área bajo la curva del operador receptor de 0.81 ($\pm$ 0.02 s.d., n = 336)) de 336 modelos de árbol de regresión potenciados. Las áreas con una alta probabilidad de ocurrencia de dengue se muestran en rojo y las áreas con baja probabilidad en verde. **c.** Cartograma del número anual de infecciones para todas las edades como proporción del área geográfica nacional o subnacional (China). (Bhatt, et al 2013; Jentes et al 2016).



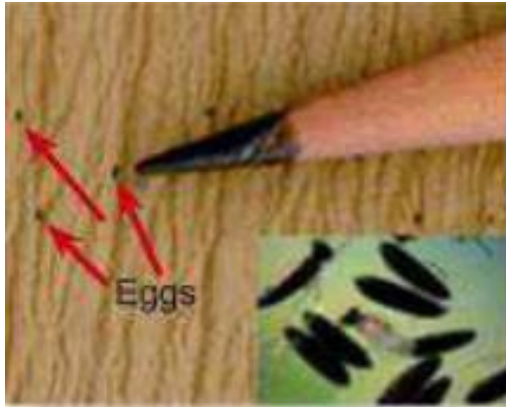
Anexo II. Distribución geográfica global del Chikungunya. Países y territorios donde casos del virus han sido reportados al 29 de mayo del 2018. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD).



Anexo III. Distribución geográfica global del Zika. Mapa mundial de áreas con riesgo de Zika. *Mosquitos que pueden diseminar el Zika usualmente viven en lugares por debajo de 6,500 pies. Las posibilidades de contraer Zika por mosquitos que viven por encima de esa altura son muy bajas. Septiembre 2018. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Division of Global Migration and Quarantine (DGMQ).



Anexo IV. Distribución global del mosquito *Aedes aegypti*. (Khormi et al 2014)



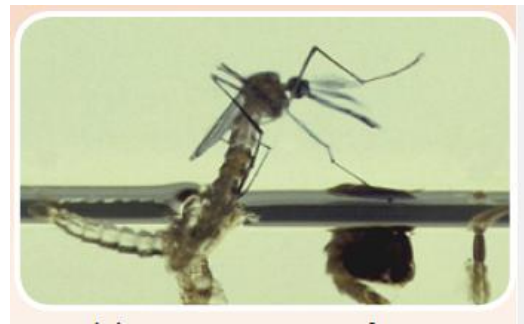
Anexo V. Tamaño de un huevecillo de *Aedes aegypti* y su eclosión. (Zárate-Nahón 2012)



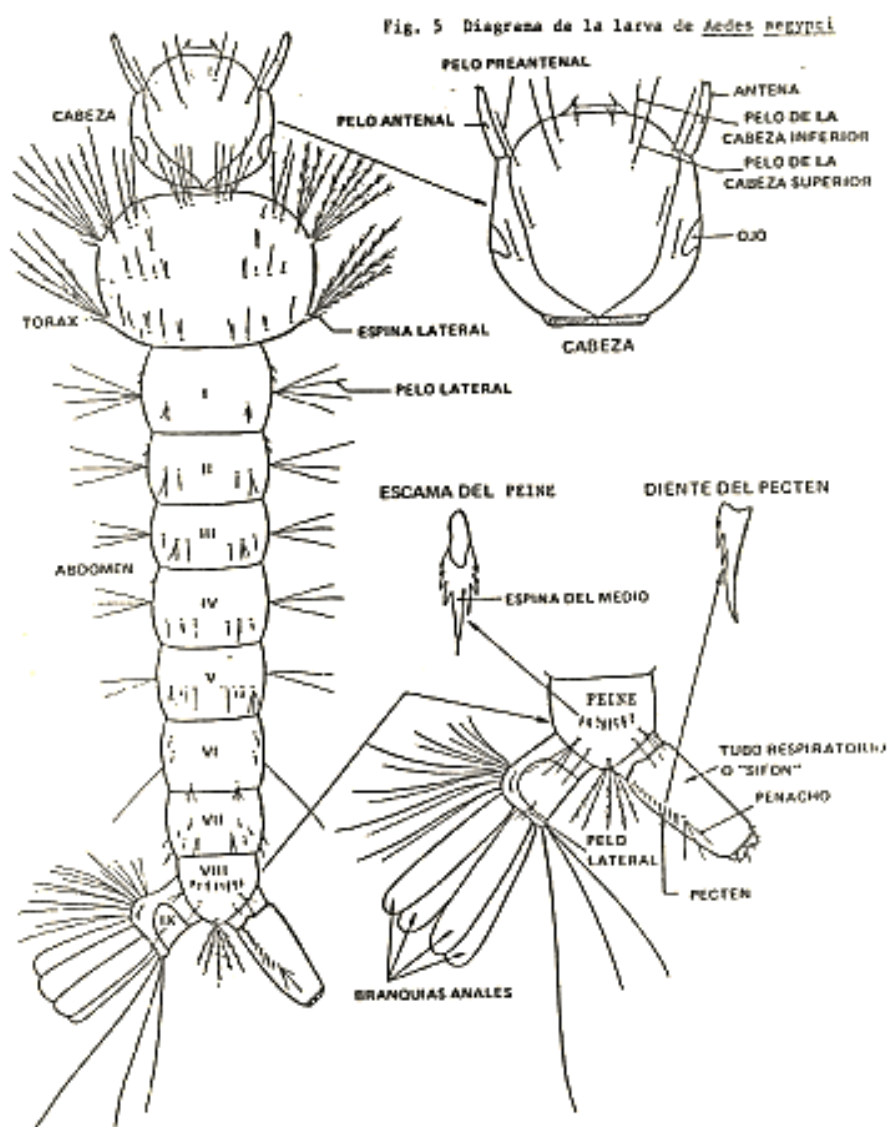
Anexo VI Huevo de *Aedes aegypti* observado al microscopio estereoscópico (Zárate-Nahón 2012)



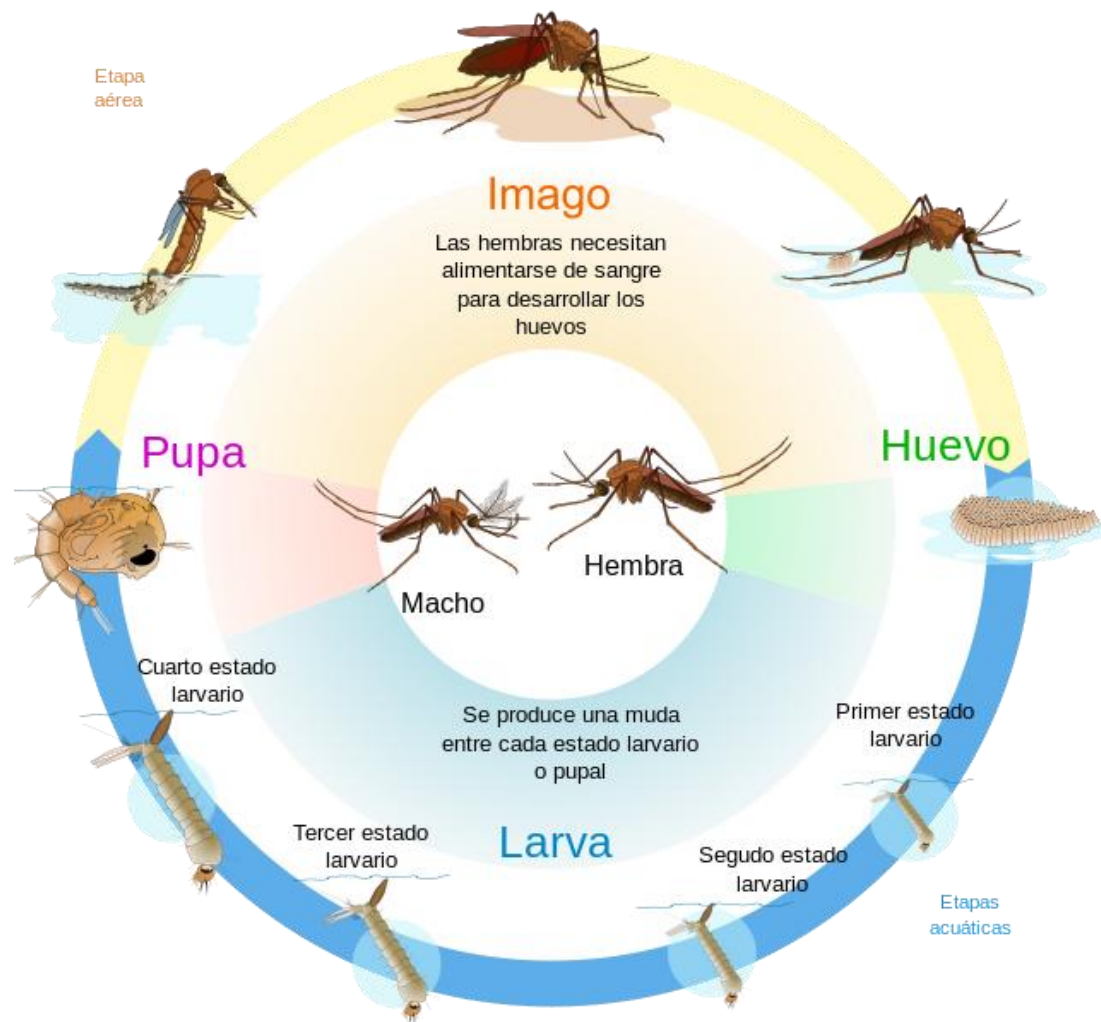
Anexo VII. Pupa de *Ae. Aegypti*, observada en el microscopio estereoscópico (Zárate-Nahón 2012).



Anexo VIII. Emergencia del adulto de *Aedes aegypti*. www.cdc.gov/dengue



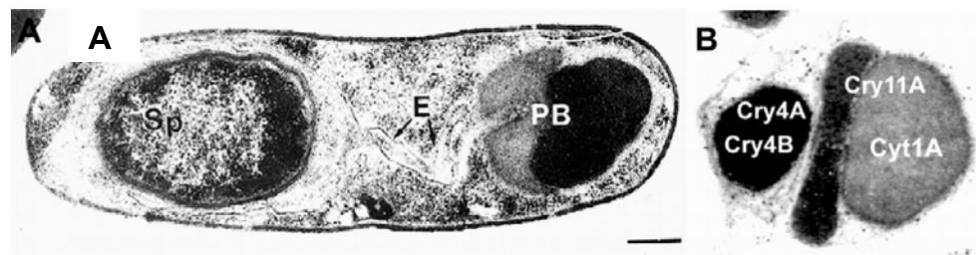
Anexo IX. Diagrama de la larva de *Aedes aegypti*. (HHS 1980, Nelson 1986).



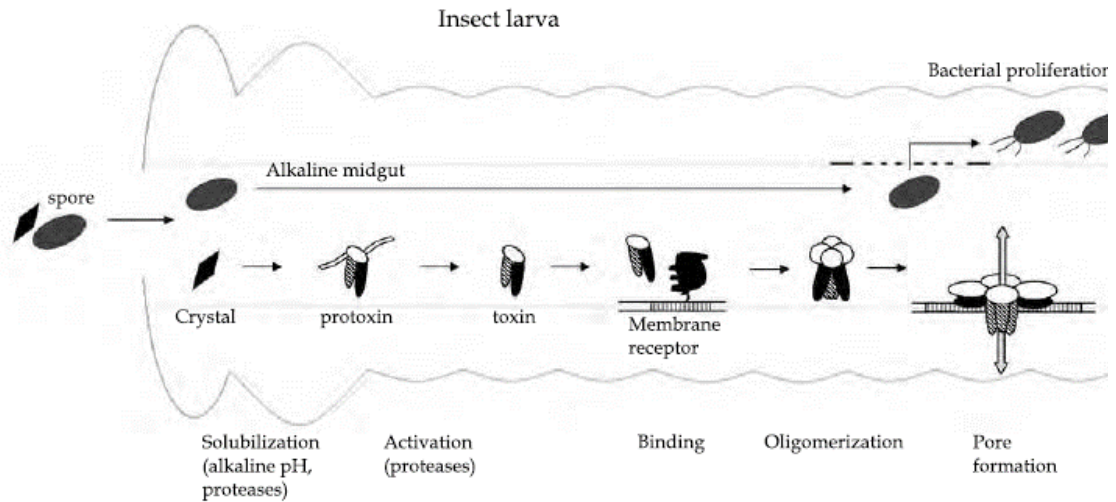
Anexo X. Ciclo Biológico de *Aedes aegypti*. Huevo, Larva: 1er, 2do, 3er, 4to estadio, Pupa y Adulto. Línea azul: Fase acuática. Línea amarilla: Fase aérea o terrestre. (www.cdc.gov/chikungunya, www.cdc.gov/dengue, www.cdc.gov/Zika).



Anexo XI. Izquierda: Adulto macho de *Aedes aegypti*, nótese el patrón de colores y la antena de tipo plumosa. **Derecha: Hembra de *Aedes aegypti*** alimentándose, posee el mismo patrón de colores que el macho, sin embargo, posee antena de tipo filiforme, lo cual, la identifica como hembra (Zárate-Nahón 2012).



Anexo XII. Sección ultraestructurada de una célula esporulada de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (A) y de un cuerpo de inclusión purificado (B). Sp: espora; E: exosporio; PB: cuerpo parasporal. (Federici et al 2003).



Anexo XIII. Modelo del modo de acción de la toxina Bti Cry en el intestino medio del insecto. El cristal es ingerido por la larva, las protoxinas se solubilizan en el intestino medio alcalino y se activan a las toxinas que se unen a receptores de membrana específicos, se oligomerizan y forman un poro que permite a las bacterias proliferar en la larva del huésped. Recientemente se propuso otro modelo que no involucra oligomerización y formación de poros. Después de la muerte de la larva, las bacterias se liberan en el medio ambiente y esporulan aun cuando encuentran otro huésped. Los dos mecanismos de resistencia principales son modificaciones en la actividad de las proteasas del intestino medio y en los sitios receptores (Despres et al 2011).

Anexo XIV. Los diferentes tipos de adyuvantes/ aditivos usados en formulaciones microbianas.

Adyuvante/aditivo	Función	Ejemplo	Referencia
Dispersante	Dispersión de la formulación en el medio dispersante	Amilosa, aluminio, silicato, glicolato sódico de almidón	Prabakaran <i>et al.</i> , 2001
Agentes tensioactivos y humectantes	Mejora la emulsión, dispersión, pegado o humectación del biopesticida.	Ethoxilatos (Tween/Triton series), polietileno glicol	Lisansky <i>et al.</i> 1993
Espaciadores y pegadores	La adhesión de los plaguicidas sobre el follaje, proteger del lavado de la lluvia y la difusión de manera uniforme para una máxima cobertura	Gelatina, gomas, melazas, Leche desnatada, geles vegetales, aceites vegetales, ceras, polímeros solubles en agua.	Parekh <i>et al.</i> , 2000 Cross <i>et al.</i> , 1996 Behle <i>et al.</i> , 1999 Farrar Jr <i>et al.</i> , 1995 Jankevica <i>et al.</i> , 1997 Tamez-Guerra <i>et al.</i> , 1999
Agentes de control de desviación/ antievaporantes/ humectante	Reducirla pulverización, incluyéndolos causados por el vehículo que lleva el equipo de aspersión y el control de la espuma mientras se mezcla	Poliacrilamidas, polisacáridos y cierto tipo de gomas, sorbitol, melazas, glicerol, polietileno glicol.	Behle <i>et al.</i> , 1996 Smirnoff <i>et al.</i> , 1983 Shasha <i>et al.</i> , 1998 Carr <i>et al.</i> , 1993 Morris <i>et al.</i> , 1994
Agentes espesantes	Modificar la viscosidad de las soluciones de pulverización y reducir la deriva	Polímeros humectables, hidroxietil celulosa y gomas de polisacáridos	Couch <i>et al.</i> , 1981 Angus <i>et al.</i> , 1954 Morris <i>et al.</i> , 1994
Buffers de pH	Mejorar la dispersión o solubilización en la formulación, controlar su estado iónico y aumentar la compatibilidad adyuvante	Fosfato sódico, fosfato de potasio	Prabakaran <i>et al.</i> , 2001 McMullan, 2000 Montermini <i>et al.</i> , 1993
Agente antiespumante	Reducirla tensión superficial, reventar las burbujas de aire físicamente y debilitar la estructura de espuma	Dimetopolisiloxano, Silica, alcohol y aceites.	Dunkle <i>et al.</i> , 1988 Ejiofor <i>et al.</i> , 1991
Anti-Radiación UV	Proteger de la degradación solar de la formulación	Rojo congo, ácido fólico, lignina, melazas, Ácido p-aminobenzoico, fenoles de alquilo.	Behle <i>et al.</i> , 1997 Taborsky V., 1992 Yang <i>et al.</i> , 1995 Smith <i>et al.</i> , 1998 Lebo Jr. <i>et al.</i> , 1996 Bohm <i>et al.</i> , 1990 McGuire <i>et al.</i> , 1991
Fagoestimulante	Estimular la alimentación de las formulaciones por las plagas	Harina de maíz, sacarosa, germen de trigo, germen de maíz, harina de soya, caseína, aceite comestible, glutamato, melaza	McGuire <i>et al.</i> , 1990. McGuire <i>et al.</i> , 1994 McGuire <i>et al.</i> , 1991 Shapiro <i>et al.</i> , 1995 Munson <i>et al.</i> , 1996 Alexander <i>et al.</i> , 1992
Sinergistas	Complementa otros componentes de formulación	Sorbitol, ácido sórbico, fosfato de sodio, estilbeno, tinopal, silicato, inhibidores de	Berto <i>et al.</i> , 2002

		proteasas, ácido oléico, ácido linoléico.	
Agentes antimicrobianos	Suprime el crecimiento de otros microorganismos y mantiene el formulado puro	Ácido sórbico, propiónico, cristal violeta.	Teera-Arunsiri <i>et al.</i> , 2003
Acarreadores	Ayuda en la entrega de la formulación a la plaga blanco.	Alginato, carragenina, acrilato y acrilamida, tierra de diatomeas.	Yardin <i>et al.</i> , 2000
Enlazadores	Unión de partículas en gránulos.	Gomas, melazas, resinas.	Teera-Arunsiri <i>et al.</i> , 2003
Agentes de suspensión	Mantiene la formulación en suspensión	Sorbitol, soya, polisacáridos, Glicolato de almidón, sucrosa.	www.dropdata.net/download/P estiSci_L3_6.PDF , 2004
Atrayentes	Actúa como cebos para atraer a las plagas	Feromonas, cucurbitacina y varios alcaloides, plastisol, aceite de semilla de algodón.	Losel <i>et al.</i> , 1998
Multiuso	Realiza varias funciones al mismo tiempo	Melaza, almidón, lignina.	Shasha <i>et al.</i> , 1998

Anexo XV. Formulaciones actualmente disponibles en el mercado europeo y estadounidense, su respectiva potencia, dosis de aplicación y usos principales. Los fabricantes recomiendan las dosis más altas cuando predominan las larvas tardías del tercer estadio y principios del cuarto estadio, las poblaciones de mosquitos son altas, el agua está muy contaminada y / o las algas son abundantes.

(Despres, L., Lagneau, C., & Frutos, R. 2011).

Tipo de formulación	Nombre del Producto	Potencia (UTI/mg)	Dosis registrada / Unidad de superficie	Principales usos
Bti solo				
Polvo técnico (TP)	VectoBac®	6000		Producto fabricado con destinado a la formulación de producto de uso final
	Aquabac®	7000		
Concentrado en suspensión (SC)	Primary powder			Todos los criaderos de mosquitos por aplicación terrestre o aérea: acequias de irrigación, acequias en las carreteras, agua de inundación, estanques, estanques de bosques, estanques de deshielo, pastos, cuencas de captación, áreas de retención de aguas pluviales, agua de marea, marismas y arrozales.
	VectoBac®12AS	1200	0.25-1-2 pts/acre	
	AquaBac®XT	1200	0.25-1-2 pts/acre	
	Teknar®HD-P	1200	0.25-1-2 pts/acre	
Granulado dispersable en agua (WG)	VectoBac®WDG	3000	1.75-7-14 oz/acre	Agua estancada que contiene larvas de mosquitos, en campos de cultivo (alfalfa, almendras, espárragos, maíz, algodón, dátiles, uvas, melocotones y nueces) Agua contaminada (como lagunas de aguas residuales, lagunas de desechos animales). También se recomiendan las formulaciones líquidas para el control de la mosca negra en los arroyos y las moscas molestas (<i>Psychoda spp.</i> , <i>Chironomus spp.</i>) En las instalaciones de tratamiento de aguas residuales que utilizan
	Aquabac® DF 3000	3000	1.75-7-14 oz/acre	
Granulado (GR)	VectoBac® G	200	2.5-10-20 lb/acre	
	Aquabac® 200G	200	2.5-10-20 lb/acre	
	Aquabac® 400G	400	1.5-5-8 lb/acre	
	Mosquito Bits®	200	0.5 lb/2178 ft²	

				sistemas de filtración por goteo.
Tableta (TB)	VectoBac® DT	3400	1 tab./50 l	Contenedores artificiales (terracota, hormigón, hierro, plástico), macetas, cuencas colectoras y una variedad de pequeños criaderos.
Briqueta (BR)	Mosquito Dunk® Summit Bti Briquets™	7000 7000	1 br/25-100 ft². 1 br/25-100 ft².	Aplicaciones al aire libre cerca del hogar donde el agua se acumula y permanece durante períodos de tiempo, zanjas, huecos de árboles, canalones de techo para recolectar agua de lluvia, macetas, abrevaderos de animales, etc. o uso en interiores como pozos de ascensor, sótanos que se inundan, bombas de sumidero y cualquier área de drenaje dentro de los edificios
<i>Bti + Bacillus sphaericus</i>				
Granulado (GR)	VectoMax® CG VectoMax® G VectoMax® WSP	nc y 50 nc y 50 nc y 50	5-20 lbs/acre (0.5-2 lbs/1000 ft² in used tires)	Efluentes de aguas residuales, lagunas de aguas residuales, lagunas de oxidación, fosas sépticas, lagunas de desechos animales, aguas residuales incautadas asociadas con el procesamiento de frutas y verduras. Zanjas de drenaje, zanjas a lo largo de carreteras, estanques de retención, detención y filtración, agua de marea, marismas, manglares, estuarios, sitios acuáticos naturales y artificiales, llantas de desecho almacenadas en botaderos, vertederos, plantas de reciclaje y otros sitios similares. Las briquetas se recomiendan en recipientes de
Briqueta (BR)	FourStar™ Briquets 45 FourStar™ Briquets 90 FourStar™ Briquets 180	70 y 60 70 y 60 70 y 60	1 br/≤100 ft² 1 br/≤100 ft² 1 br/≤100 ft²	

retención de aguas naturales y
artificiales bastantes pequeños.

VectoBac®, Teknar® son marcas comerciales registradas de Valent BioSciences Corp., Illinois, EE.

UU.; AquaBac® es una marca registrada de Becker Microbial Products Inc., Florida, EE. UU.;

Mosquito Dunk®, Mosquito Bits® son marcas comerciales registradas de Summit Chemical Co,
Maryland, EE. UU.; Fourstar™ es una marca registrada de Fourstar Microbials LLC, Nueva York, EE.

UU. nc = no comunicado

Anexo XVI. Ejemplos del uso de formulaciones de Bti para el control de larvas de mosquitos en varios hábitats. (Lacey 2007).

FORMULACIÓN	HÁBITAT	PRINCIPALES ESPECIES OBJETIVO	REFERENCIAS
Granulares ¹	piscinas artificiales	<i>Aedes vexans</i> ,	Clarke and Rowley
	campo de arroz	<i>Ochlerotatus trivittatus</i>	1984
	estanques	<i>Anopheles</i>	Lacey and Inman
	experimentales	<i>quadrimaculatus</i> , <i>An.</i>	1985
	pastos inundados	<i>crucians</i>	Mulla and
	llantas	<i>Culex tarsalis</i> , <i>Cx. peus</i>	Darwazeh 1985
	lagunas y piscinas	<i>Psorophora columbiae</i>	Mulla et al. 1985
	hábitats de	<i>Ae. aegypti</i>	Novak et al. 1985
	inundaciones	<i>Cx. pipiens</i>	Berry et al. 1987
	zanjas y	<i>Ae. vexans</i>	
	alcantarillas	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. restuans</i> ,	
	campos de arroz	<i>Cx. tarsalis</i>	Kramer et al. 1988
	salvaje	<i>Cx. tarsalis</i> , <i>An. freeborni</i> ,	Ali et al. 1994
	contenedores	<i>An. franciscanus</i>	Lawler et al. 1999
	manglar	<i>Oc. taeniorhynchus</i>	Skovmand and
	pozos negros	<i>Oc. taeniorhynchus</i>	Sanago 1999
	charcos de lluvia	<i>Cx. quiquefasciatus</i>	
	bañeras	<i>An. gambiae</i>	Su and Mulla 1999
	experimentales	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx.</i>	Batra et al. 2000
	neumáticos y	<i>stigmatosoma</i> , <i>Cx. tarsalis</i>	Dennett and
	neveras	<i>Ae. aegypti</i>	Meisch 2000
	parcelas de arroz	<i>An. quadrimaculatus</i>	Siegel et al. 2001
	llantas	<i>Oc. triseriatus</i>	Russell et al. 2003
	piscinas	<i>Cx. annulirostris</i>	Christiansen et al.
	contaminadas	<i>Oc. squamiger</i>	2004
	piscinas de marea	<i>Ae. aegypti</i>	Vilarinhos and
	contenedores		Monnerat 2004

Gránulos de hielo (perlas heladas) Polvo humectable Concentrado fluido	bosque ribereño	<i>Ae. vexans</i>	Becker 2003
	hábitats	<i>An. stephensi</i>	Kumar et al. 1998
	peridomésticos	<i>Culex tarsalis, Cx. peus</i>	Mulla and
	estanques	<i>Cx. pipiens</i>	Darwazeh 1985
	experimentales	<i>Ae. vexans</i>	Berry et al. 1987
	acequias y	<i>Culiseta incidens</i>	Gharib and
	alcantarillas	<i>Cx. quinquefasciatus, Cx.</i>	Hilsenhoff 1988
	hábitats de	<i>stigmatosoma, Cx. tarsalis</i>	Kramer 1990
	inundaciones	<i>Oc. stimulans, Oc.</i>	Mulla et al. 1993
	llantas	<i>intrudens, Oc. provpcans,</i>	Knepper et al. 1994
	estanques de campo	<i>Oc. canadensis</i>	Becnel et al. 1996
	piscinas del bosque	<i>Ae. albopictus</i>	Skovmand and
	llantas	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Sanago 1999
	pozos negros	<i>An. gambiae</i>	
	charcos de lluvia	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Hallmon et al. 2000
Concentrado fluido de volumen ultra bajo (ULV, siglas en ingles)	piscinas artificiales	<i>Cx. annulirostris</i>	Russel et al. 2003
	piscinas		
	contaminadas		
Concentrado fluido de volumen ultra bajo (ULV, siglas en ingles)	campo de arroz	<i>An. quadrimaculatus</i>	Yates 1984
	campo de arroz	<i>An. quadrimaculatus</i>	Sandoski et al. 1985
	llantas,	<i>Ae. aegypti, An. maculates,</i>	
	contenedores	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Lee et al. 1996
	contenedores	<i>Ae. aegypti, Ae. albopictus, Cx. quinquefasciatus</i>	Yap et al. 1997
Aceite + polvo técnico	parcelas de arroz experimentales	<i>An. quadrimaculatus</i>	Dennett et al. 2000
Tabletas / pellets flotantes	Contenedores	<i>Cx. quinquemaculatus</i>	Lacey et al. 1984
	Estanques de bosque	<i>Oc. cataphylla, Oc. cantans</i>	Shovman and Eriksen 1993
	Contenedores	<i>Ae. albopictus</i>	Nasci et al. 1994
	Neumáticos y enfriadores	<i>Ae. aegypti</i>	Batra et al. 2000
	evaporativos	<i>Ae. aegypti</i>	de Melo-Santos et al. 2001
	Contenedores de agua	<i>Ae. albopictus</i>	Toma et al. 2003
		<i>Ae. aegypti</i>	Mulla et al. 2004
	Contenedores de agua	<i>Ae. aegypti</i>	Vilarinhos and Monnerat 2004

	Contenedores de agua Contenedores		
Briquetas	Contenedores grandes Piscinas del bosque Estanques de granja Contenedores Piscinas de tierra dambo	<i>Ae. aegypti</i> <i>Cx. territans</i> , <i>Cx. restuans</i> <i>Coquilletidia perturbans</i> <i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. coronator</i> <i>Oc. macintoshi</i> , <i>Cx. antennatus</i>	Novak et al. 1985 Apperson et al. 1986 Walker 1987 Neri-Barbosa et al. 1997 Logan & Linthicum 1992
Cebo flotante	contenedores	<i>Anopheles spp.</i>	Aly et al. 1987
Microencapsulación	laboratorio	<i>An. freeborni</i>	Cheung and Hammock 1985
Bioencapsulación	laboratorio	<i>An. stephensi</i>	Manasherob et al. 1996

¹Los granulares incluyen gránulos dispersables en agua, sémola de mazorca de maíz, gránulos de arena

Anexo XVII. Mililitros de rendimientos obtenidos a partir de las fermentaciones en los tres medios de cultivo utilizados [Medio 1, Medio 2 y Medio de Referencia]

Matraz	Corrida	Medio 1 [Extracto de levadura, líquido del remojo de maíz y jarabe de maíz]	Medio 2 [Sacarosa y Harina de Girasol]	Medio de Referencia [Melaza, líquido del remojo del maíz, harina de soya]
1	1	81	97	87
2	1	82	97	76
3	1	85	95	83
4	1	77	96	76
5	1	76	97	56
6	1	79	98	84
1	2	61	93	81
2	2	74	92	90
3	2	76	90	82
4	2	73	93	85
5	2	83	90	83
6	2	70	90	85
1	3	90	90	83
2	3	85	90	80
3	3	87	90	80
4	3	76	90	90
5	3	81	92	85
6	3	88	90	87
1	4	79	90	85
2	4	79	90	82
3	4	83	95	90
4	4	79	94	81
5	4	83	92	77
6	4	78	94	84

Anexo XVIII. Gramos de extracto insecticida de Bti obtenidos a partir de la coprecipitación con lactosa y acetona de las fermentaciones obtenidas con los tres medios de cultivo utilizados [Medio 1, Medio 2 y Medio de Referencia]

Matraz	Corrida	Medio 1 [Extracto de levadura, líquido del remojo de maíz y jarabe de maíz]	Medio 2 [Sacarosa y Harina de Giraol]	Medio de Referencia [Melaza, líquido del remojo del maíz, harina de soya]
1	1	0.1342	0.3247	1.3169 (3 matraces)
2	1	0.1978	0.7025	1.2983 (3 matraces)
3	1	0.1738	0.5929	
4	1	0.2440	0.5220	
5	1	0.2741	0.6336	
6	1	0.3304	0.8150	
1	2	0.1436	0.3817	1.6941 (3 matraces)
2	2	0.1893	0.2327	1.6777 (3 matraces)
3	2	0.1466	0.3615	
4	2	0.0754	0.2935	
5	2	0.1219	0.2377	
6	2	0.1057	0.2100	
1	3	0.0924	0.5314 (2 matraces)	1.5745 (3 matraces)
2	3	0.0925		1.7048 (3 matraces)
3	3	0.0995	0.6421 (2 matraces)	
4	3	0.1133		
5	3	0.1074	0.5206 (2 matraces)	
6	3	0.1082		
1	4	0.0941	0.9278 (2 matraces)	1.6736 (3 matraces)
2	4	0.0971		1.5239 (3 matraces)
3	4	0.1161	1.0003 (2 matraces)	
4	4	0.0963		
5	4	0.1124	1.0822 (2 matraces)	
6	4	0.1491		

Anexo XIX. Porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos preliminares de los extractos insecticidas de Bti obtenidos a partir los tres medios de cultivo utilizados [Medio 1, Medio 2 y Medio de Referencia] a concentración de 0.05 y 0.5 mg/l a las 24, 48 y 72 horas postaplicación.

Tiempo de Bioensay	Repetición	Medio 1 [Extracto de levadura, líquido del remojo de maíz y jarabe de maíz]						Medio 2 [Sacarosa y Harina de Girasol]						Medio de Referencia [Melaza, líquido del remojo del maíz, harina de soya]					
		[0.05 mg/l]			[0.5 mg/l]			[0.05 mg/l]			[0.5 mg/l]			[0.05 mg/l]			[0.5 mg/l]		
		1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C
24 h.	1	4%	4%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
48 h	1	12%	12%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	0%	0%	4%	0%	0%
72 h.	1	12%	12%	0%	100%	100%	0%	16%	24%	0%	20%	24%	0%	4%	0%	0%	4%	0%	0%
24 h.	2	32%	36%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	0%	40%	48%	0%
48 h	2	36%	36%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	0%	40%	56%	0%
72 h.	2	36%	36%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	0%	0%	4%	0%	44%	56%	0%
24 h.	3	32%	36%	0%	100%	100%	0%	0%	4%	0%	16%	0%	0%	0%	4%	0%	40%	48%	0%
48 h	3	36%	36%	0%	100%	100%	0%	0%	4%	0%	20%	0%	0%	0%	4%	0%	40%	56%	0%
72 h.	3	36%	36%	0%	100%	100%	0%	0%	4%	0%	20%	0%	0%	0%	4%	0%	44%	56%	0%

Anexo XX. Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenidos en medio de referencia, a las 24 horas post aplicación.

Medio de Referencia								
Cepa	n ^a	^d Tiempo de exp	^b CL ₅₀	IC 95%	^b CL ₉₀	IC 95%	Pendiente +EE	X ²
Bti	100	24 h	1.4846	0.5874 - 3.7524	5.3057	0.6418 - 146.6247	2.32 ± 0.7208	1.2857
Bti	100	24 h	0.9852	0.2777 - 3.4948	1.8153	0.0650 - 6.7269	4.835 ± 1.4817	0.0220
Bti	100	24 h	0.8944	0.8944 - 0.8944	0.9903	0.9903 - 1.1377	28.9974 ± 5.326	- 0.0000
Bti	100	24 h	1.3063	0.0099 - 172.3333	3.7966	0.0010 - 236.9379	2.7695 ± 1.1961	0.0062
Bti	100	24 h	2.8862	9.1999E-7 - 9054970	14.8387	2.6245E-12 - 1547523	1.8046 ± 1.2359	0.0113
Bti	100	24 h	0.9464	0.0776 - 11.5365	2.1814	0.0072 - 20.6006	3.5387 ± 1.1651	0.0036
Bti	100	24 h	1.2795	0.0982 - 16.6672	2.5675	0.0066 - 26.7905	4.2428 ± 1.7145	0.0114
Bti	100	24 h	1.1553	0.1467 - 9.0970	2.3600	0.01306 - 18.2408	4.1367 ± 1.5357	0.0449
Bti	100	24 h	0.8924	0.3014 - 2.6420	1.6665	0.0872 - 5.3199	4.7308 ± 1.3711	5.2338
Bti	100	24 h	1.1537	0.1288 - 10.3339	2.4969	0.0083 - 23.5136	3.827 ± 1.4672	0.0149
Bti	100	24 h	1.2014	0.1496 - 9.6457	2.2698	0.0166 - 15.7130	4.6445 ± 1.739	0.0092
Bti	100	24 h	1.5515	0.0230 - 104.338	5.1736	0.0002 - 275.6423	2.4534 ± 0.9987	0
^c Promedio			1.3114		3.7885			

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en en mg/l del complejo espora-cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^dTiempo de exposición

Anexo XXI. Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenidos en el medio nuevo 1, a las 24 horas post aplicación.

Medio Nuevo 1 (soluble)								
Cepa	n ^a	^d Tiempo de exp	^b CL ₅₀	IC 95%	^b CL ₉₀	IC 95%	Pendiente +EE	X ²
Bti	100	24 h	0.6436	0.4886 - 0.6918	1.1046	0.6918 - 1.9026	5.4696 ± 0.9265	3.3637
Bti	100	24 h	0.6329	0.4249 - 0.9425	2.6188	1.0586 - 13.3857	2.0805 ± 0.3577	12.4350
Bti	100	24 h	0.3953	0.2943 - 0.5311	1.1600	0.7113 - 2.7986	2.7453 ± 0.3784	3.7434
Bti	100	24 h	0.4017	0.2804 - 0.5752	1.1292	0.6393 - 2.7602	2.8587 ± 0.4877	5.2159
Bti	100	24 h	0.3393	0.1933 - 0.5954	0.9698	0.4326 - 2.4779	2.8136 ± 0.4489	1.5555
Bti	100	24 h	0.3694	0.2343 - 0.5823	1.5882	0.6523 - 6.4286	2.026 ± 0.3801	0.0489
Bti	100	24 h	0.3953	0.2207 - 0.7080	1.0636	0.5179 - 2.4544	2.9855 ± 0.5355	0.1236
Bti	100	24 h	0.6709	0.5267 - 0.8547	1.0441	0.7128 - 1.6267	6.6823 ± 1.1345	1.6515
Bti	100	24 h	0.6907	0.5316 - 0.8973	1.1423	0.7233 - 1.9424	5.8734 ± 1.0289	1.8525
Bti	100	24 h	0.7456	0.4229 - 1.3143	1.0096	0.4492 - 1.3885	9.7456 ± 1.8226	0.1161
Bti	100	24 h	0.4570	0.2747 - 0.7603	1.1848	0.5406 - 2.9484	3.1021 ± 0.523	6.0547
Bti	100	24 h	0.6436	0.4684 - 0.8842	1.2443	0.6758 - 2.5290	4.4821 ± 0.8155	2.1770
^c Promedio			0.5321		1.2716			

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en en mg/l del complejo espora-cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^dTiempo de exposición

Anexo XXII. Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenidos en medio de referencia, a las 48 horas post aplicación.

Medio de Referencia								
Cepa	n ^a	^d Tiempo de exp	^b CL ₅₀	IC 95%	^b CL ₉₀	IC 95%	Pendiente +EE	X ²
Bti	100	48 h	1.5145	0.6686 - 3.4306	6.4937	1.0535 - 171.8323	2.0298 ± 0.5409	2.8139
Bti	100	48 h	1.2888	0.5409 - 3.0704	3.0405	0.4326 - 29.3056	3.4425 ± 1.0821	0.8080
Bti	100	48 h	0.8861	0.8861 - 0.8861	1.0111	1.0111 - 1.2053	22.3861 ± 4.5726	- 0.0000
Bti	100	48 h	1.1157	0.0153 - 81.0953	3.7319	0.0001 - 224.5917	2.4473 ± 1.0265	0.0026
Bti	100	48 h	1.1094	0.5303 - 2.3207	2.9047	0.4776 - 23.6624	3.0699 ± 0.8726	0.4752
Bti	100	48 h	1.2544	0.0029 - 53.9269	4.1440	0.0000 - 367.4593	2.4727 ± 1.2977	0.0055
Bti	100	48 h	0.9363	0.3193 - 2.7454	1.6584	0.1013 - 4.9811	5.169 ± 1.4745	0.0006
Bti	100	48 h	1.1196	0.2117 - 5.9191	2.0322	0.0353 - 10.0049	4.9569 ± 1.7033	0.0067
Bti	100	48 h	0.8336	0.3457 - 2.0103	1.4374	0.1652 - 3.3669	5.4239 ± 1.3879	0.0764
Bti	100	48 h	1.1537	0.1288 - 10.3339	2.4969	0.0083 - 23.5136	3.827 ± 1.4672	0.0149
Bti	100	48 h	0.8306	0.0876 - 7.8690	2.1005	0.0074 - 19.3388	3.1848 ± 1.0196	0.0004
Bti	100	48 h	0.8211	0.1352 - 4.9835	1.7292	0.0261 - 9.0034	3.9675 ± 1.1425	0.0037
^c Promedio			1.0720		2.7317			

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en en mg/l del complejo spora-cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^dTiempo de exposición

Anexo XXIII. Actividad tóxica comparativa de los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenidos en medio nuevo 1, a las 48 horas post aplicación.

Medio nuevo 1 (soluble)								
Cepa	n ^a	^d Tiempo de exp	^b CL ₅₀	IC 95%	^b CL ₉₀	IC 95%	Pendiente +EE	X ²
Bti	100	48 h	0.5101	0.3880 - 0.6705	1.3456	0.8156 - 3.3155	3.0463 ± 0.4768	11.7304
Bti	100	48 h	0.5411	0.4090 - 0.7160	0.9153	0.6056 - 1.4790	5.6226 ± 0.8929	2.1378
Bti	100	48 h	0.6026	0.2819 - 1.2884	0.8967	0.3302 - 1.3286	7.4348 ± 1.4658	0.1348
Bti	100	48 h	0.4699	0.3359 - 0.6573	1.6887	0.8690 - 5.5877	2.3098 ± 0.3487	9.3029
Bti	100	48 h	0.3522	0.2651 - 0.4679	0.9491	0.6201 - 2.0428	2.9809 ± 0.3925	5.7795
Bti	100	48 h	0.3926	0.2736 - 0.5633	1.1005	0.6289 - 2.6512	2.8669 ± 0.4852	4.0117
Bti	100	48 h	0.2898	0.1594 - 0.5269	0.8780	0.3803 - 2.3212	2.6664 ± 0.4285	2.9015
Bti	100	48 h	0.3067	0.2089 - 0.4504	0.8936	0.5255 - 2.0576	2.7633 ± 0.43312	1.2533
Bti	100	48 h	0.3953	0.2207 - 0.7080	1.0636	0.5179 - 2.4544	2.9855 ± 0.5355	0.1236
Bti	100	48 h	0.6802	0.5173 - 0.8944	1.1635	0.7144 - 2.0507	5.505 ± 0.9632	0.1618
Bti	100	48 h	0.7371	0.4240 - 1.2812	0.9775	0.4661 - 1.3082	10.4677 ± 1.9332	0.0064
Bti	100	48 h	0.3766	0.2215 - 0.6402	0.9985	0.4674 - 2.4123	3.0304 ± 0.4839	2.1825
^c Promedio			0.4712		1.0726			

n^a número de individuos probados en el bioensayo

^b CL₅₀ y CL₉₀ en en mg/l del complejo espora-cristal por gramo de dieta, IC Intervalo de confianza.

^c promedio de tres repeticiones

^dTiempo de exposición

Anexo XXIV. Lecturas de la actividad residual comparativa de las formulaciones producidas, una formulación comercial y el extracto insecticida sin formular contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti* en laboratorio.

FORMULADO	DIAS TRANSCURRIDOS										DE
	1	2	3	7	10	14	18	21	24	28	
TABLETA 1	90	73	50	38	25	14	2	3	2	1	6.248
TABLETA 2	99	86	83	44	30	20	8	10	7	1	5.503
TABLETA 3	97	82	50	40	20	15	6	9	4	1	7.701
TABLETA 4	89	73	72	31	29	7	7	8	3	1	7.728
GRANULADO 1	97	91	91	54	45	32	35	22	14	6	6.322
GRANULADO 2	95	86	89	49	44	44	25	21	13	5	8.438
GRANULADO 3	98	97	93	62	54	48	34	32	17	8	8.711
EXTRACTO	100	100	91	77	37	28	23	13	2	1	8.953
VECTO BAC	100	100	99	93	96	84	82	83	77	55	3.910
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000

13. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Candidato para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA

Tesis: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS
FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis israelensis* PARA
EL CONTROL DE LARVAS DE *Aedes Aegypti*.

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 24 de mayo del año 1987. Hija de Francisco Fernández Pérez y María Elena Peña Treviño.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas como Licenciado en Ciencias de los Alimentos.

Experiencia Profesional: Recursos Humanos y Capital Humano (2 años); Calidad Total (4 meses), Investigación y Desarrollo de Nuevos Productos de Panificación (7 meses); Responsable de Planta Procesadora de Alimentos (5 años); Análisis de Datos y Control de Documentos (2 año).

14. TRABAJOS Y EXPOSICIONES

Presentaciones de Poster:

- Primera Exposición de Carteles de Proyecto en Biotecnología – Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. 23 mayo 2014
 - *Producción de Bioinsecticida de Bacillus thuringiensis israelensis en dos medios de cultivo contra larvas de Aedes aegypti.*
- IV Congreso Latinoamericano de Aracnología y XLIX Congreso Nacional de la SME – Morelia, Michoacán. 20 al 25 julio 2014.
 - *Producción de Bioinsecticida de Bacillus thuringiensis israelensis en dos medios de cultivo contra larvas de Aedes aegypti.*
- III Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde. Desarrollo sustentable, salud y ambiente. Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Cintermex. 22 al 24 de abril del 2015.
 - *Producción de Bioinsecticida de Bacillus thuringiensis serovar. israelensis y su evaluación contra larvas de Aedes aegypti.*
- VI Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Área de Química, México, D.F. 23 al 25 de septiembre del 2015.
 - *Producción de Bioinsecticida de Bacillus thuringiensis serovar. israelensis y su evaluación contra larvas de Aedes aegypti.*

Premios:

- Premio 1er Lugar Categoría Enfermedades transmitidas por vector. 22 Concurso Estatal de Investigación en Salud 2019. 22 y 23 de octubre del 2019. Universidad del Valle de México, Campus Cumbres. Modalidad trabajo en extenso.
 - *“Producción, diseño y evaluación de formulados de Bacillus thuringiensis israelensis contra larvas de Aedes aegypti”*
- Premio UANL a la invención. Reconocimiento a la Propiedad Industrial Edición 2020. 19 de agosto del 2020. UANL.
 - *Por haber obtenido el Título de Patente No. 367778: “Extracto insecticida de Bacillus thuringiensis israelensis contra larvas de Aedes aegypti y su proceso de obtención”*

Patentes:

- Patente No. 367778: “Extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* y su proceso de obtención”

Artículos publicados:

- Gabriela Fernández Peña, María Guadalupe Maldonado Blanco, Ariadna Rodríguez Castro, María del Socorro Flores-González, Myriam Elias-Santos, Ma. Guadalupe Rojas-Verde, Luis Jesús Galán-Wong. Production, design, and evaluation of *Bacillus thuringiensis* serov. *israelensis* formulations against *Aedes aegypti* larvae. Int J Mosq Res 2022;9(4):25-31.
- Maldonado-Blanco, M. G., Gallegos-Sandoval, J. L., Fernández-Peña, G., Sandoval-Coronado, C. F., & Elías-Santos, M. (2014). Effect of culture medium on the production and virulence of submerged spores of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against larvae and adults of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Biocontrol Science and Technology, 24(2), 180-189.

14.1 CONSTANCIAS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Otorga el

RECONOCIMIENTO

A: *Gabriela Fernández Peña*

Por su participación en la Primera Exposición de carteles de Proyectos en
Biotecnología Organizado por el Cuerpo Académico de Biotecnología

Alere Flammam Veritatis
Cd. Universitaria a 23 de Mayo de 2014

M.C. Antonio Guzman Velazco
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Luis J. Galán Wong
Coordinador del Instituto de Biotecnología



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Responsable del Cuerpo Académico de Biotecnología





AA Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana
Azcapotzalco

Otorga la presente
Constancia

a: **Gabriela Fernández Peña**
 por presentar la ponencia
PRODUCCIÓN, DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMULADOS DE Bacillus thuringiensis serovar. Israelensis CONTRA LARVAS DE Aedes aegypti en modalidad cartel dentro del

VI Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química 2015
 celebrado los días 23, 24 y 25 de septiembre de 2015.
 Coautor (es) **Fernández-Peña Gabriela, Sandoval-Coronado Carlos Francisco**
 México, D.F., a 23 de septiembre de 2015.

Dr. Luis Enrique Noreña Franco
 Director de la
 División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dr. David Elizarraz Martínez
 Jefe del
 Departamento de Ciencias Básicas

Dra. María Teresa Castañeda Briones
 Presidenta del Comité Organizador
 VI Congreso de Internacional de Química



La Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León

Otorga el presente

Reconocimiento

A:

Gabriela Fernández Peña, Ma. Guadalupe Maldonado Blanco,
Ariadna Rodríguez Castro

Por su participación con el **Trabajo de Investigación** en el:

«22 Encuentro Estatal de Investigación en Salud 2019»

en la Categoría de Enfermedades Transmitidas por Vector; con el Trabajo
«PRODUCCIÓN, DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMULADOS DE Bacillus thuringiensis
serovar. israelensis CONTRA LARVAS DE Aedes aegypti»

Obteniendo el **PRIMER LUGAR**

22 y 23 de Octubre, 2019

Dr. Manuel Enrique de la O Cavazos
SECRETARIO DE SALUD
DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
DIRECTOR DE ENSEÑANZA,
INVESTIGACIÓN EN SALUD Y CALIDAD



DEISC/CAP - No. Curso: 041



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

otorga el

PREMIO UANL A LA INVENCION
RECONOCIMIENTO A LA PROPIEDAD INDUSTRIAL 2015

a

Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco
L.C.A. Gabriela Fernández Peña

Con la invención titulada: "Extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* y su proceso de obtención", con solicitud de registro de Patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial: MX/a/2015/009629.

"ALERE FLAMMAM VERITATIS"

Monterrey, Nuevo León, a 15 de marzo de 2016


MTRO. ROGELIO G. GARZA RIVERA
Rector



14.2 PATENTE

(11) **MX 367778 B**

(12)

PATENTE

(43) Fecha de publicación: 30/08/2019 (51) Int. Cl: **A01N 63/02** (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
 (22) Fecha de presentación: 24/07/2015 **A01P 7/04** (2006.01)
 (21) Número de solicitud: 2015009629 **C07K 14/325** (2006.01)

(71) Solicitante:
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
Av. Pedro de Alba S/N Torre de Rectoría 66451 SAN
NICOLAS DE LOS GARZA Nuevo León MX

(72) Inventor(es):
MARIA GUADALUPE MALDONADO BLANCO
Cerrada Norte, 4212 GUADALUPE Nuevo León 67185
MX
GABRIELA FERNANDEZ PEÑA

(74) Representante:
Lorena Nohemi GONZÁLEZ PACHECO
Av. Pedro de Alba S/N, Torre de Rectoría, Piso 4 San
Nicolás de los Garza Nuevo León 66455 MX

(54) Título: **EXTRACTO INSECTICIDA DE BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS CONTRA LARVAS DE AEDES AEGYPTI Y SU PROCESO DE OBTENCIÓN.**

(54) Title: **BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS INSECTICIDAL EXTRACT AGAINST AEDES AEGYPTI LARVAE AND ITS PRODUCTION PROCESS.**

(57) Resumen

La presente invención se refiere a el uso de insecticidas químicos por alternativas de control biológico que eviten los riesgos ecológicos y de salud causados por los químicos. Dentro de los agentes de control biológico más importantes está *Bacillus thuringiensis israelensis* que se ha usado extensivamente para el control de larvas de mosquitos debido a sus atributos ampliamente conocidos tales como alta eficacia, especificidad, bajo desarrollo de resistencia y seguridad ambiental. La presente invención provee un extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* y su proceso de obtención. Se provee una composición del medio de cultivo para la fermentación de Bti que permite obtener extractos insecticidas con 100 % de toxicidad a las 24 h de su aplicación contra larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*.

(57) Abstract

The present disclosure is related to an insecticidal extract used to substitute chemical insecticides, in favor of biological control alternatives to avoid the ecological and health risks caused by chemicals. Among the most important biological control agents is the *Bacillus thuringiensis israelensis* which has been extensively used for controlling the mosquito larvae due to its widely known attributes; such as high efficiency, specificity, low development of resistance and environmental safety. The present invention provides a *Bacillus thuringiensis israelensis* based insecticidal extract against *Aedes aegypti* larvae and its production process. A culture medium composition for the Bti fermentation of is provided, allowing to obtain insecticidal extracts with 100% toxicity after 24 hours of its application against third stage *Aedes aegypti* larvae.



TÍTULO DE PATENTE No. 367778

Titular(es): UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Domicilio: Av. Pedro de Alba S/N, Torre de Rectoría, Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, MÉXICO
Denominación: EXTRACTO INSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis israelensis* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti* Y SU PROCESO DE OBTENCIÓN.
Clasificación: CIP: A01N63/02; A01N63/00; A01P7/04; C07K14/325
 CPC: A01N63/02; A01N63/00; C07K14/325
Inventor(es): MARÍA GUADALUPE MALDONADO BLANCO; GABRIELA FERNÁNDEZ PEÑA

SOLICITUD

Número:
MX/a/2015/009629

Fecha de Presentación:
24 de Julio de 2015

Hora:
16:00

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 24 de julio de 2035

Fecha de Expedición: 30 de agosto de 2019

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso i), 4º y 12ª fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso i), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 30 de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|000100000405397295|Servicio de Administración Tributaria|56|MX/2019/79972|MX/a/2015/009629|Título de patente norma|1223|GAGV|Pág(s) 1|F8h2Jb1dVSKF3m8H8|OKIDc=

Sello Digital:
YSt6fQwF6OefHsbBgkoeU7VyttraXU3g12hd3/cakPgOd4dmVQq8P8G8CgXu54n@wp+1tqR+efUvGVk
n8b77HJUI3+eum0ehPSUSPCdvCJ6d4UQ3u8BkFXmDFPQauJg5qkEushhH5dXKKAW6K+wtbW4yU2G3
xVMVp8718UJ9uSP8DwKzE3v1F9Kz45ED6Tgh8QFogTVGyhuVfTOky8osTmMdrMZXP06vREzEUphAq36t3
+8gEL25+rf4WJuwXNP7FBPQMkeOnasAj0859u8C8BaYVJ+2qyzbCQK6WZsSystemEdw=

Arenal 550, Santa María Tepepan, Kochimilco, C.P. 16020, CDMX.
www.gob.mx/impl

Creatividad para el Bienestar



MX/2019/79972



1

**EXTRACTO INSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis israelensis* CONTRA
LARVAS DE *Aedes aegypti* Y SU PROCESO DE OBTENCIÓN**

DESCRIPCIÓN

5

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es proveer un extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti*. Adicionalmente, la presente invención provee el proceso de obtención de dicho extracto insecticida.

10

ANTECEDENTES

Actualmente se busca sustituir el uso de insecticidas químicos por alternativas de control biológico que eviten los riesgos ecológicos y de salud causados por los químicos. Dentro de los agentes de control biológico más importantes está *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), la cual se ha usado extensivamente para el control de larvas de mosquitos debido a sus atributos ampliamente conocidos, tales como alta eficacia, especificidad, bajo desarrollo de resistencia y seguridad ambiental.

Los mosquitos son insectos que se encuentran distribuidos en todo el mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde las larvas y pupas siempre son acuáticas (Faust, E. C., P. F. Russel, y R. C. Jung. 1974. *Parasitología clínica. Reimpresión 1979. Salvat (Eds), S. A. Mallorca, España. p 88*), dentro de la subfamilia *Culicidae* destacan cuatro géneros de importancia médica, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* y *Armigeres*; *Culex quinquefasciatus* es un



2

vector importante de filariasis, *C. tritaeniorhynchus* transmite la encefalitis japonesa (Service, M. W. (Ed) 1986. *Blood-sucking insects: vectors of disease*. Edward Arnold, London. Su, T. and M. S. Mulla 1999. *Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of Bacillus thuringiensis ssp. israelensis and*

5 *Bacillus sphaericus against Culex mosquitoes in microcosms*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 356-365), en tanto que *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) es un vector de enfermedades virales como la fiebre amarilla, dengue clásico y dengue hemorrágico. El empleo de tácticas efectivas de control del

10 estos insectos sean prevenidas o controladas (World Health Organization. 1982. Information document produced by the WHO Division of Vector Biology and control. WHO/VBC/79.750 and VBC/BCDS/79.01. Geneva Switzerland: 1-44).

Entre los agentes de control biológico destacan las bacterias entomopatógenas, entre las cuales se encuentra *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14, la cual

15 es efectiva y posee las ventajas de seguridad ambiental, especificidad, bajas expectativas de desarrollo de resistencia en los insectos, además de la relativa facilidad de su producción a gran escala así como la estabilidad de almacenamiento y larga vida media (Su, T. and M. S. Mulla 1999. *Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of Bacillus thuringiensis ssp.*

20 *israelensis and Bacillus sphaericus against Culex mosquitoes in microcosms*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 356-365).

Sin embargo, a pesar de su relativa facilidad de producción, este proceso resulta costoso debido a los actuales medios fermentación, por lo que se busca



3

desarrollar medios que permitan la producción a gran escala a un costo razonable y que permitan obtener extractos con alta actividad insecticida.

- Por ejemplo, Maldonado Blanco en 2001 obtuvo formulaciones de *Bacillus thuringiensis israelensis* para el control de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex* spp,
- 5 en donde el medio de fermentación para la producción del extracto insecticida de Bti estaba compuesto a base de melaza (10 g/l), sólidos de remojo de maíz (10 g/l), pasta en polvo (30 g/l) y sales minerales, para el cual obtuvo rendimientos desde 9.1 hasta 15.7 g/l. Los extractos obtenidos fueron evaluados para determinar su actividad tóxica donde se obtuvieron valores promedio de 47.2 y
- 10 59.75 % de mortalidad con la concentración de 0.05 mg/l, contra larvas de *Aedes aegypti* de cuarto estadio temprano. Asimismo, se obtuvieron valores promedio de CL₅₀ de entre 0.2675 y 0.0685 mg/l del extracto insecticida obtenido por fermentación en el medio propuesto (Maldonado Blanco, M.G. (2001). *Producción y Formulación de un bioinsecticida de Bacillus thuringiensis subsp. israelensis H-*
- 15 *14 para el control de mosquitos culicidos en el noreste de México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León*). Cabe destacar que aunque se reportaron altos rendimientos, esto probablemente no represente la cantidad de proteína tóxica total, ya que posiblemente se recuperan residuos (proteína no utilizada) del medio de cultivo junto con la proteína tóxica.
- 20 Por otra parte, Prabakaran y Balaraman en 2006 desarrollaron un medio a base de harina de soya para la producción de un extracto insecticida de Bti, en donde obtuvieron un rendimiento de 7.8 g/l, una CL₅₀ de 8.89 ng/ml contra larvas de tercer estadio de *Culex quinquefasciatus* y un total de 0.48×10^{11} c.f.u./ml de



4

esporas (Prabakaran, G. & Balaraman, K. (2006). *Development of a cost-effective medium for the large scale production of Bacillus thuringiensis var israelensis*. *Biol Control* 36:288–292).

- 5 Por otra parte, existen solicitudes de patente y patentes que se han enfocado a la obtención de nuevas cepas de Bti con actividad contra larvas del orden Diptera, así como a la preparación de formulaciones que comprenden los extractos insecticidas de dichas cepas (por ejemplo EP0409438; WO2002065835; US20110243906; BR0003314; RU2122791).

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Rendimiento (g/l) del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis israelensis* 225 obtenido en el medio de referencia a base de melaza, sólidos del remojo de maíz y harina de soya.

- 15 Figura 2. Rendimiento (g/l) del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis israelensis* 225 obtenido en el medio soluble a base de sólidos de remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura.

Figura 3. Comparación de CL_{50} de extractos de *Bacillus thuringiensis israelensis* 225 producidos en los medios melaza-soya y jarabe de maíz-extracto de levadura contra larvas de *Aedes aegypti* a las 24 horas de exposición.

- 20 Figura 4. Comparación de CL_{50} de extractos de *Bacillus thuringiensis israelensis* 225 producidos en los medios melaza-soya y jarabe de maíz-extracto de levadura contra larvas de *Aedes aegypti* a las 48 horas de exposición.



DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee un extracto insecticida espora-cristal de *Bacillus thuringiensis israelensis*, para el control de *Aedes aegypti*. Adicionalmente, la
5 presente invención provee el método de obtención de dicho extracto insecticida.

En la presente invención se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis israelensis* T14 225, perteneciente al Cepario del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., la cual fue obtenida del Centro Internacional de
10 *Bacillus* Entomopatógenos del Instituto Pasteur. Las características generales del *Bacillus thuringiensis israelensis* se refieren a un bacilo Gram positivo que presenta cristales paraesporales conformados por distintos polipéptidos: cry 4A (125 kDa), cry 4B (135 kDa), cry 11A (65 kDa) y cyt 1A (28 kDa).

Dicha cepa fue activada en agar nutritivo durante 24 horas para la posterior
15 inoculación del medio de cultivo para la producción de biomasa insecticida.

El proceso de obtención del extracto insecticida espora-cristal de *Bacillus thuringiensis israelensis* se comprende de las siguientes etapas:

a) Fermentar *Bacillus thuringiensis israelensis* T14 225 activada, en
20 medio líquido para la producción de esporas y cristales con actividad insecticida;

El medio de cultivo líquido para la producción de esporas y cristales con actividad insecticida presenta un pH inicial de 7.0 ± 0.2 y se comprende de:



6

Ingredientes solubles en g/l: Jarabe de maíz (10), sólidos de remojo del maíz (10) y extracto de levadura (10);

Sales minerales en g/l: CaCO_3 , 1.0, MgSO_4 , 0.3, ZnSO_4 , 0.02, FeSO_4 , 0.02 y MnSO_4 , 0.02.

5 La fermentación se lleva a cabo en agitación continua a una temperatura de 30 °C y un pH inicial de 7, hasta obtener entre un 80 y un 100 % de esporas y cristales.

En el escalamiento en biorreactores deberá tomarse en cuenta que las condiciones de agitación y aireación se establecerán de acuerdo al valor de la $K_L a$, la cual se mantiene constante y de tal forma que permita un 20 % de saturación de oxígeno a lo largo del proceso de fermentación.

b) Recuperar la biomasa con actividad insecticida, complejo espora-cristal, producida en la etapa a), mediante un proceso conveniente de recuperación.

15 En el escalamiento en biorreactores, dicha recuperación se realiza a través de secado por aspersión, teniendo en consideración en el *spray-dryer* las siguientes condiciones: temperatura de entrada de 150 °C, temperatura de salida 60 °C y una presión de 0.1. Mientras que en la producción del extracto insecticida a nivel laboratorio, dicha recuperación se realiza preferentemente mediante el método descrito por Dulmage *et al.* en 1970 (Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. (1970) Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 15:15-20).



El extracto espora-cristal de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenido mediante el proceso anteriormente descrito es efectivo como agente insecticida contra larvas de *Aedes aegypti*.

5

EJEMPLO 1. REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Proceso de obtención del extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis*

Se utilizó la cepa *Bacillus thuringiensis israelensis* T14 225 y su producción se
10 llevó a cabo en matraz de 500 ml en agitación, conteniendo un medio de cultivo
formulado a base de ingredientes solubles y sales minerales (Tabla 1). Para fines
comparativos, se describe la obtención de un extracto de *Bacillus thuringiensis israelensis* en un medio de referencia reportado anteriormente por Maldonado
Blanco en 2001 (Maldonado Blanco, M.G. (2001). *Producción y Formulación de un*
15 *bioinsecticida de Bacillus thuringiensis subsp. israelensis H-14 para el control de*
mosquitos culicidos en el noreste de México. Tesis de Doctorado. Universidad
Autónoma de Nuevo León) (Tabla 1).

Se inoculó el cultivo de *Bacillus thuringiensis israelensis* T14 225 previamente
activado en matraces Erlenmeyer conteniendo los dos diferentes medios de cultivo
20 para la producción del extracto insecticida, los cuales fueron incubados en
agitador rotatorio para la fermentación a 30 °C, 200 rpm y pH inicial 7, durante 72
horas. Se incluyeron 4 repeticiones por cada medio utilizado y éstos se repitieron 3
veces sucesivas. Para determinar el final de las fermentaciones, se realizaron



8

- frotis del cultivo para observar la producción de esporas y cristales, utilizando tinción con cristal violeta al 2 %, para corroborar que los cristales se hayan formado y hayan sido liberados completamente del cuerpo del bacilo (Saleh, S. M. Harris, R. F, & Alien, O.N. (1970). *Recovery of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis from field soils. J. Invertebr. Pathol.* 15:55-59). Posteriormente, se obtuvo el complejo espora-cristal de acuerdo al método descrito por Dulmage *et al.* en 1970 (Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. (1970) *Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol.* 15:15-20), mediante coprecipitación con lactosa y acetona.
- El caldo de fermentación se ajusta a pH de 7.0 mediante la adición de ácido clorhídrico diluido al 1 %, enseguida se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min, posteriormente se descarta el sobrenadante y se agregan 1.7 volúmenes de lactosa al 4-6 %, se agita por 30 min y se agrega lentamente 3.34 volúmenes de acetona, se agita 30 min y posteriormente se deja sedimentar y se filtra posteriormente con vacío, se deja secar.
- Una vez obtenidos los extractos, se calcularon los rendimientos del insecticida producido en los dos medios en gramos por litro. Los resultados mostraron que se obtuvieron rendimientos con ligera variación con un promedio de 18.9 g/l para el medio de referencia (Figura 1) compuesto por melaza y harina de soya, mientras que para el medio compuesto por jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura los rendimientos variaron de 1.2 a 2.8 g/l (Figura 2).



9

Ingredientes Medio 1) Referencia	g/L	Ingredientes del Medio Soluble	g/L
Harina de Soya	10	Jarabe de Maiz	10
Sólidos de remojo de maiz	10	Sólidos de remojo de maiz	10
Melaza	10	Extracto de Levadura	10
CaCO ₃	1	CaCO ₃	1
MgSO ₄	0.3	MgSO ₄	0.3
ZnSO ₄	0.02	ZnSO ₄	0.02 ^b
FeSO ₄	0.02	FeSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.02	MnSO ₄	0.02
pH inicial 7		pH inicial 7	

Tabla 1. Composición de los medios de fermentación para la producción de insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

10

Ensayos de actividad insecticida contra larvas de *Aedes aegypti*

El ensayo se llevó a cabo contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio criadas en laboratorio, de acuerdo al método reportado por De Barjac y Larget-Thiery en 1984 (De Barjac H, Larget-Thiery I. 1984. Characteristics of IPS-82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimeographed document WHO/VBC/84.892. Geneva Switzerland: World Health Organization).

Para ello se utilizaron vasos con 150 ml de agua declorada a los cuales se les aplicó la cantidad necesaria del insecticida producido. Las concentraciones que se utilizaron en los ensayos fueron 0.05 y 0.5 mg/l del complejo espora-cristal utilizando diluciones a partir de una suspensión *stock* conteniendo 50 mg/l. A cada vaso se colocaron 25 larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío, tres repeticiones por cada concentración y un control no tratado. Los vasos se mantuvieron a temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa del 50-70 %.



10

registrándose la mortalidad a las 24 y 48 horas. Para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) se utilizaron seis concentraciones a partir de la solución stock con 50 mg/l: 1.00, 0.8, 0.5, 0.3, 0.1 y 0.05 mg/l. Estos tratamientos fueron aplicados a vasos conteniendo 25 larvas tercer estadio tardío y 150 ml de agua destilada y también se registró la mortalidad a las 24 y 48 horas. Los resultados se analizaron mediante un programa de Probit computarizado (*United States Applied and Environmental Health. 1989. Pest Management Program. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland*).

Los resultados de ensayos mostraron que el extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* producido en el medio de referencia a base de harina de soya y melaza presentó baja mortalidad a las 24 y 48 horas respectivamente, aplicado a la concentración de 0.05 mg/l (Tabla 2) mientras que cuando se aplicó a 0.5 mg/l mostró mayor mortalidad de 29 y 33 % a las 24 y 48 horas, respectivamente; mientras que el medio soluble conteniendo jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura presentó 100 % de mortalidad a las 24 y 48 horas aplicado a la concentración de 0.5 mg/l, y causó 24 y 28 % de mortalidad a las 24 y 48 horas respectivamente, con 0.05 mg/l (Tabla 3). Ninguno de los controles no tratados presentó mortalidad durante los ensayos.

En relación a la CL_{50} , en promedio se obtuvo 1.3114 mg/l para el extracto producido en el medio de referencia a base de harina de soya y melaza y 0.5321 mg/l para el insecticida obtenido en el medio a base de jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura, ambas CL_{50} a las 24 horas; mientras que a las 48 horas, se obtuvo un promedio de 1.0720 mg/l con el extracto producido en



11

el medio a base de harina de soya y melaza y 0.4712 mg/l para el medio a base de jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura. Estos promedios fueron comparados mediante una prueba T (Student) al nivel de 0.05, demostrando una diferencia altamente significativa entre los extractos, donde el insecticida más tóxico fue obtenido en el medio soluble (Figuras 4 y 5).

Tiempo	0.05 mg/L	0.5 mg/L	Control
24 hrs	1%	29%	0%
48 hrs	2%	33%	0%
72 hrs	2%	34%	0%

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad promedio de larvas de tercer estadio tardío de *Aedes aegypti*, presentados por los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenidos en el medio de referencia.

Tiempo	0.05 mg/L	0.5 mg/L	Control
24 hrs	24%	100%	0%
48 hrs	28%	100%	0%
72 hrs	28%	100%	0%

Tabla 5. Porcentajes de mortalidad promedio de larvas de *Aedes aegypti*, presentados por los extractos insecticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis* obtenidos en el medio soluble objeto de la presente invención.



12

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito de forma suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

5

1. Un proceso de obtención de un extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* que presenta un 100% de mortalidad contra *Aedes aegypti*, en donde el proceso se caracteriza porque comprende las siguientes etapas:

10

a. Fermentar *Bacillus thuringiensis israelensis* T14 225 activada, en medio de cultivo líquido para la producción de esporas y cristales con actividad insecticida, donde el medio de cultivo tiene un pH inicial de 7.0 ± 0.2 y se comprende de g/L: jarabe de maíz (10), sólidos de remojo del maíz (10), extracto de levadura (10) y sales minerales en g/L: CaCO_3 (1.0), 1.0, MgSO_4 (0.3), ZnSO_4 (0.02), FeSO_4 (0.02) y MnSO_4 (0.02); hasta obtener entre un 80 y un 100% de esporulación, en agitación constante que permita un 20% de saturación de oxígeno,

15

b. Recuperar la biomasa con actividad insecticida, complejo espora-cristal, producida en la etapa a), mediante co-precipitación con lactosa y acetona.

20



13

2. Un extracto de *Bacillus thuringiensis israelensis* que presenta un 100% de mortalidad contra *Aedes aegypti*, caracterizado porque se obtiene mediante el proceso descrito en la reivindicación 1.
- 5 3. El extracto de conformidad con la reivindicación 2, para usarse como agente insecticida contra *Aedes aegypti*.
4. Un medio de cultivo para la obtención de un extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* que presenta un 100% de mortalidad contra *Aedes aegypti* descrito en la reivindicación 1 y 2 caracterizado porque tiene un pH inicial de 7.0 ± 0.2 y se comprende de g/L:
- 10 a. Jarabe de maíz (10),
b. Sólidos de remojo del maíz (10),
c. Extracto de levadura (10), y
15 d. Sales minerales en g/L: CaCO_3 (1.0), 1.0, MgSO_4 (0.3), ZnSO_4 (0.02), FeSO_4 (0.02) y MnSO_4 (0.02).
- 20



14

RESUMEN

Actualmente se busca sustituir el uso de insecticidas químicos por alternativas de control biológico que eviten los riesgos ecológicos y de salud causados por los químicos. Dentro de los agentes de control biológico más importantes está *Bacillus*
5 *thuringiensis israelensis* que se ha usado extensivamente para el control de larvas de mosquitos debido a sus atributos ampliamente conocidos, tales como alta eficacia, especificidad, bajo desarrollo de resistencia y seguridad ambiental.

La presente invención provee un extracto insecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* y su proceso de obtención. Se provee
10 una composición del medio de cultivo para la fermentación de Bti que permite obtener extractos insecticidas con 100 % de toxicidad a las 24 h de su aplicación contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*.

15

20



1/2

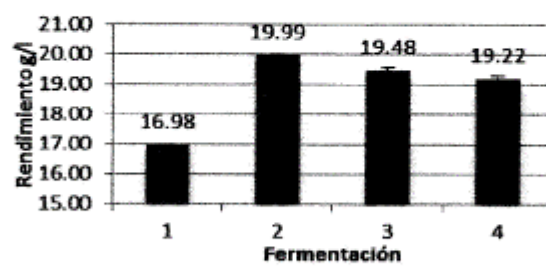


Figura 1

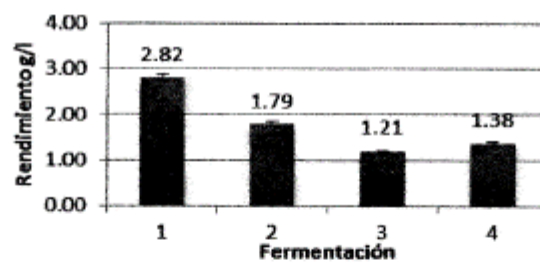


Figura 2



2/2

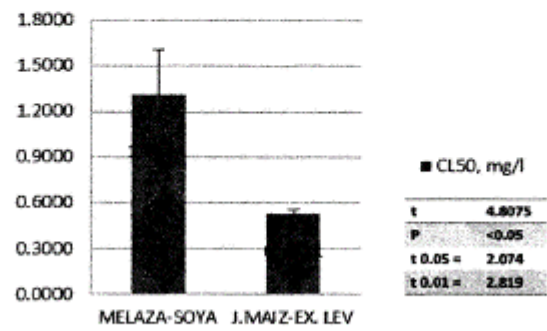


Figura 3

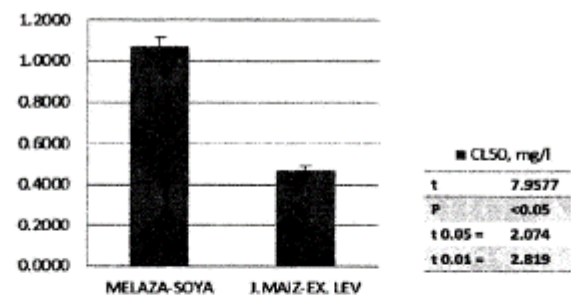


Figura 4

14.3 ARTÍCULO

International Journal of Mosquito Research 2022; 9(4): 25-31



International Journal of
Mosquito Research

ISSN: 2348-5906
CODEN: IJMRK2
IJMR 2022; 9(4): 25-31
© 2022 IJMR
www.digiprjournal.com
Received: 15-04-2022
Accepted: 18-05-2022

Gabriela Fernández Peña
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

María Guadalupe Maldonado Blanco
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

Ariadna Rodríguez Castro
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

María del Socorro Flores-González
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Entomología.

Myriam Elias-Santos
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

Ma. Guadalupe Rojas-Verde
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

Luis Jesús Galán-Wong
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

Corresponding Author:
María Guadalupe Maldonado Blanco
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología, Av.
Universidad S/N Ciudad Universitaria,
CP 66455, San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México

Production, design, and evaluation of *Bacillus thuringiensis* serov. *israelensis* formulations against *Aedes aegypti* larvae

Gabriela Fernández Peña, María Guadalupe Maldonado Blanco, Ariadna Rodríguez Castro, María del Socorro Flores-González, Myriam Elias-Santos, Ma. Guadalupe Rojas-Verde and Luis Jesús Galán-Wong

DOI: <https://doi.org/10.22271/23487941.2022.v9.i4a.619>

Abstract

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) was cultured on three culture media: a reference medium and two new media. Then, spore-crystal complexes were recovered and evaluated against *Aedes aegypti* larvae. After two formulations, tablets and granulates, were prepared, then irradiated with ultraviolet light and evaluated for larval mortality and residual activities. The most toxic extract was obtained in soluble medium 1 showing the lowest LC₅₀ of 0.3748 mg/L. When Bti extract was formulated and tested in the laboratory, the granulated formulations, presented approximately 90%–100% mortality, during the first 3 days post-application, whereas tablets showed <60% mortality. At 14 days post application, only granulates 2 and 3 showed >40%, whereas unformulated extract presented 22% mortality. The formulations showed reduced mortality of 5%–12% (tablets) and granular (6%–11%) after 72 hours of exposure to UV light; otherwise, reductions in the unformulated Bti extract were higher (32%).

Keywords: *Bacillus thuringiensis israelensis*, formulations, larval control, mosquitoes, *Aedes aegypti*

1. Introduction

Mosquitoes are widely distributed insects worldwide, mainly in tropical and subtropical regions, where larvae and pupae are aquatic [1]. Among the various species of mosquitoes, *Aedes Aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) is the most common and vector of viral diseases such as yellow fever, dengue classic and hemorrhagic, Chikungunya, and Zika. The global dengue cases are estimated as 390 million infections/year; 96 million of these are considered clinical infections [2]. In the Americas, the Pan American Health Organization (PAHO) reported 693,489 suspected cases of Chikungunya in 2015, with 37,480 confirmed cases. The majority of these cases were reported from Colombia, with 356,079 suspected cases [3].

In 2016, the WHO Regional Office in the Americas reported 349,936 suspected cases, with 146,914 confirmed. Most cases occurred in Brazil (265,000 suspects), followed by Bolivia and Colombia (19,000 suspects). In contrast, a large outbreak of exanthematous disease was reported in Brazil in March 2015, which was quickly identified as a result of infection with the Zika virus, and in July 2015, an outbreak was described to be associated with Guillain-Barré syndrome. In October 2015, the association between this infection and microcephaly was also described in Brazil. Outbreak and evidence of transmission in the Americas, Africa, and other regions of the world soon occurred. To date, 86 countries and territories have reported cases of infection by the mosquito-borne Zika virus [4].

Dengue is one of the most serious public health problems that cause a major impact on the economy of the affected populations, requiring vector control as the most important actions both in their larval and adult states, which has been traditionally performed using chemical larvicides such as Temephos (Abate) that yield good results. However, cases of resistance have already been reported [5, 6, 7]. In addition, these chemicals have an effect of the ecosystem due to their lack of selectivity, causing damage to other life forms.

Based on these drawbacks, other alternatives for vector control such as the use of several

biological control agents, such as *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), have been introduced in some countries for more than three decades already, with target insects not presenting resistance [8,9].

To date, different preparations of Bti have been used, including liquids, powders, granules, pellets, microgranules, and others, which are applied to breeding sites depending on the species of the mosquito [10].

Studies have reported several formulations, i.e., wettable powders or emulsifiable liquids, which have shown efficiency but reduced the activity for periods of not >2–3 weeks [11, 12], whereas granular formulations have presented residual activity between 30 and 78 days [13, 11]. Other formulations such as tablets have been developed with variable residual activities [14].

In this study, the production of Bti strain 225 bioinsecticide was carried out in three economical and available culture media, after recovering the larvicidal extracts; in addition, these extracts were evaluated against *A. aegypti* larvae: first, elaboration of two formulations, tablets and granules; then the formulations were exposed to ultraviolet (UV) light; and finally, its residual activity was evaluated in the laboratory.

2. Material and Methods

2.1 Strain

The 225 Bti strain was obtained from our collection of *Bacilli* Entomopathogenic from the Institute of Biotechnology; Biological Sciences Faculty, Autonomous University of Nuevo León (FCB-UANL) and was selected in a previous study [15].

Table 1: Composition of culture media for Bti production of larvicidal extracts.

	Ingredients (g/L)		
	Reference Medium	Soluble Medium 1	Medium 2 Sunflowers
Soybean meal	10	0	0
Corn steep solids	10	10	0
Molasses	10	0	0
Corn syrup	0	10	0
Yeast Extract	0	10	0
Sunflower seed flour	0	0	10
Sucrose	0	0	10
CaCO ₃	1	1	1
MgSO ₄	0.3	0.3	0.3
ZnSO ₄	0.02	0.02	0.02
FeSO ₄	0.02	0.02	0.02
MnSO ₄	0.02	0.02	0.02
pH	7	7	7

2.2 Fermentation for the production of the larvicidal extract

The Bti strain, maintained in slants with nutritive agar, was activated in tubes with the same medium and incubated at 30 °C for 24 h. Subsequently, each three different culture media (shown in Table 1), i.e., 1) reference medium, 2) soluble medium 1, and 3) sunflower medium, were inoculated with Bti strain, incubated in agitation at 200 rpm and 30 °C for 72 h (Lab-Line environ shaker, model 3527). This procedure was repeated four times. At the end of fermentation, spores and crystals were harvested following the methodology described previously [16] using lactose and acetone. The final product, Bti extract, was dried, ground in mortar, and then the yield obtained (g/L) was calculated. Then, extracts were evaluated for larvicidal activity.

2.3 Mosquito species tested

The late third-stage *A. aegypti* larvae, San Nicolas strain, was used for bioassays. The strain has been reared for several years at the Institute of Biotechnology (FCB-UANL) at 25±3 °C, 14:10 h light: dark photoperiod and 70%–80% relative humidity.

2.4 Evaluation of larvicidal extracts produced in the three-culture media

The extracts obtained from the three culture media were evaluated against late third-stage larval *A. aegypti* according to methodology described previously [17]. For the experiment, stock solution containing 5000 mg/liter of the Bti extract was used. Ten glass beads were added to the stock solution, and each batch was vortexed for 2 min. Then, 1 and 0.1 ml were

taken to prepare 1:10 (500 mg/L) and 1:100 (50 mg/L) dilutions, respectively, to obtain the corresponding quantities (in microliters) and test concentrations of 0.5 and 0.05 mg/L to apply to plastic cups containing 150 mL of distilled water. Each dose was applied to groups of 25 larvae, with 4 replications per dose. Four cups with only distilled water were used as untreated controls. The cups were kept at 25±3 °C and 14:10 h light/dark photoperiod. The mortality data were recorded after 24 and 48 h. The experiments were repeated 3 times on different days.

The dose range to obtain the median lethal concentration (LC₅₀) was selected according to the results of previous experiments. For this, serial dilutions ranging from 1.0 to 0.1 mg of the extract per liter were used (5–6 doses). These treatments, in the same way, were applied to cups containing 25 late third-stage larvae and 150 mL of distilled water with four repetitions per dose and for untreated control. These bioassays were repeated four times on different days.

Table 2: Ingredients (as % of total weight) used for preparation of Bti formulations (tablets and granules)

Ingredient (% w/w)	Tablets (T)				Granules (G)		
	T1	T2	T3	T4	G1	G2	G3
Acacia gum	0	0	10	5	0	5	6.6
Pectin	10	5	0	0	10	5	3.3
CaCO ₃	40	40	40	40			
Starch	40	40	40	40			
β carotene					1	1	1
Ground cork					79	79	79
Unformulated Bti extract	10	15	10	15	10	10	10
Total weight	100	100	100	100	100	100	99.99

2.5 Preparation of formulations

Two types of formulations were designed: 1) tablets and 2) granules, with compositions shown in Table 2. For tablets, Bti extract was included as an active ingredient at 10 and 15% w/w and two polymers: pectin (food grade) and acacia gum (Desarrollo de Especialidades Químicas, S.A. de C.V., Monterrey, N. L. Mexico). Other ingredients included were calcium carbonate (Tecnología Industrial Química, S. A. de C.V. Escobedo, N. L. Mexico) and soluble starch (Jalmek, S. A. de C.V. San Nicolás de los Garza, N. L. Mexico). For granular formulations, polymers and floating materials (ground cork, Intergasket S. A. de C. V. San Nicolás de los Garza, N. L. Mexico) as well as a solar protectant (β carotene obtained from Industrial Orgánica S. A. de C.V: Monterrey, N. L. México) were used. Formulations were prepared by dissolving each one of the polymers in distilled water; then, the Bti extract was incorporated and homogenized with agitation; subsequently, the protectant was added in the granulated formulations and mixed and dried at room temperature. For tablets, the mixture was pressed to achieve a compressed form. Besides, was included unformulated Bti extract (UBE) for comparison in tests.

2.6 Evaluation of formulations before and after UV irradiation

To test the effects of UV light on the larvicidal activity of unformulated and formulated Bti extracts, the formulations prepared as tablets and granules and unformulated Bti extract were irradiated for 72 h with a Spectroline UV light lamp of 75 mW intensity (Model ENF-280 C, Spectronics Corp. Westbury, N. Y.) at 254 nm λ . Bioassays were performed using 50 mg of the Bti larvicidal extract irradiated and non-irradiated and were suspended in 10 mL distilled water (5,000 mg/L) after was taken 1 mL to prepare 1:10 dilution (500 mg/L). From this dilution were taken the corresponding quantities (as microliters) in order to obtain the test concentration of 1.6 mg/L and then placed in polystyrene containers (15.6 $\times$ 13.8 cm and 9 cm high) filled with 1 liter of dechlorinated water. The same dose of active ingredients (1.6 mg/L) was also applied for formulations prepared with Bti extract, irradiated and nonirradiated, corresponding to 16 mg of formulation containing 10% of Bti extract and 10.6 mg from the formulation containing 15% of Bti extract. Groups of 25 late third-stage larval *A. aegypti* were placed into each container, four repetitions for the treatment and untreated control. Bioassays were performed thrice. Larval mortality in each treatment was recorded after 24 h. Results were

expressed as mortality percentages.

2.7 Evaluation of residual activity of the formulations

Bioassays were carried out in laboratory (25 ± 3 °C temperature and 14.10 h light/dark photoperiod), and 7 formulations (4 tablets, T1 to T4 and 3 granulates, G1 to G3) prepared with the most toxic extract were tested. In addition, an unformulated Bti extract (UE) was also included for comparison and tested at the same concentration (1.6 mg/L) and conditions. The bioassay method was similar to that reported previously^[18] and modified as follows: 25 late third-stage larval *Ae. aegypti* were placed into each container following the same steps in testing the effect of UV irradiation. Then, different treatments were administered. Unformulated Bti extract at 1.6 mg/L dose, with formulations containing 10% Bti extract (16 mg), as well as those containing 15% Bti extract (10.6 mg), were used at the same proportion of the active ingredient. Four repetitions per treatment were applied, and an untreated control was included. Larval mortality in each treatment was recorded after 24 h, and all living or dead larvae from each treatment were carefully removed using a dropper and then counted and discarded. A new batch of 25 larvae was introduced into each treatment container at 1, 2, 3, 7, 10, 14, 18, 21, 24, and 28 days post-treatment, mortality was evaluated 24 h after the introduction in each case, and data were recorded.

2.8 Statistical analysis

Yield means (g/L) of larvicidal extracts obtained from the three culture media were analysed through a one-way analysis of variance (ANOVA) and least significant difference method at 0.05 level. The number of dead larvae (average) in bioassays was recorded after 24 h and analysed using a one-way ANOVA, and means were compared with the least significant difference (LSD) method at $p \leq 0.05$ to determine differences in the mortality of larvae produced by different larvicidal extracts obtained from three tested media. Subsequently, LC_{50} and LC_{90} were determined using the PROBIT analysis program^[19]. To test the effects of UV light on the larvicidal activity of formulations, the number of dead larvae were analyzed using the Student's *t*-test at 0.05 level, for each sample before and after UV irradiation. To evaluate the residual activity, the average dead larvae obtained in each sampling day was analysed using a one-way ANOVA, and means were compared using the least significance difference method at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Yield and toxicity of larvicidal extracts

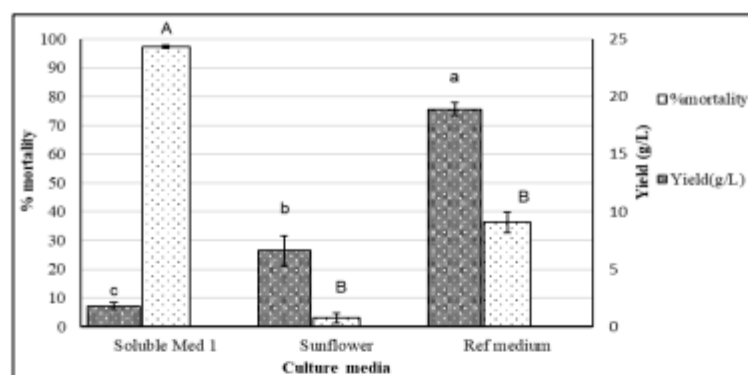


Fig 1: Means of yield (g/L) and toxicity (% mortality) $\pm$ standard error, presented by Bti larvicidal extracts produced on different culture media. Means (4 repetitions) followed by the same letter are not significantly different (ANOVA, LSD 0.05). Uppercase letters correspond to comparison of mortality and lowercase letters to comparison of yield.

Yields obtained in the fermentation media varied, with an average of 18.9 g/L for the reference medium composed of molasses and soybean meal; approximately 1.8 g/L for the soluble medium 1 composed of corn syrup, corn steep solids, and yeast extract; and 6.6 g/L for the medium 2 composed of sunflower seed flour and sucrose. However, the mortality percentage presented in Bti larvicidal extracts, tested to 0.5 mg/L concentration against *A. aegypti* larvae, was higher for

those obtained in soluble medium 1 than for medium 2 and reference medium (Fig. 1). The preliminary test of mortality against *A. aegypti* showed high mortality for Bti extracts obtained in soluble medium 1 with corn steep solids and yeast extract, whereas extracts obtained in the reference medium and sunflower seed flour presented low mortality, when applied at 0.5 mg/L concentration.

Table 3 ¹Larvicidal activity of Bti extracts produced in two culture media against *Aedes aegypti* larvae (95% confidence limits in parentheses)

Culture Media	Exposure Time	Number tested larvae	² LC ₅₀	² LC ₉₀
Reference Medium	24	2400	0.9296 (0.07-11.53)	1.6633(0.007-20.60)
Medium Soluble 1	24	2400	0.3748 (0.19-0.70)	1.1954(0.43-6.42)

¹ in mg/L

² Average of four bioassays

3.2 Determination of LC₅₀

The laboratory activity shown by two Bti extracts, 1) obtained from the reference medium and 2) soluble medium 1, is presented in Table 3. Bti extract obtained in medium 2 did not determine the LC₅₀ because of low mortality. Bti extract produced in the reference medium was less toxic than that produced in soluble medium 1. Averages of four bioassays were compared using a *t* test (Student) at 0.05 level, demonstrating a highly significant difference between them (*t*

value = 21.3185, $t_{0.05} = 2.447$, $t_{0.01} = 3.707$, *df* = 6) where the most toxic extract was obtained from soluble medium 1.

3.3 Irradiation of formulations and Bti extract with UV light

After 72 h of UV light exposure, the mortality was reduced by 5%–12% in tablets and 6%–11% in granules; otherwise, the reduction was higher in unformulated Bti extract (32%), as shown in Table 4.

Table 4: Mortality means $\pm$ standard error of *Aedes aegypti* caused by Bti formulations (tablets as T and granules as G), after 72 h exposure to uv light (irradiated) compared with nonirradiated

Formulation	% Mortality ¹		% Reduction
	Non-Irradiated	Irradiated	
T1	92 $\pm$ 5.6	80 $\pm$ 16.3	12
T 2	99 $\pm$ 2	93 $\pm$ 9.4	6
T 3	97 $\pm$ 3.8	85 $\pm$ 16.4	12
T 4	96 $\pm$ 3.2	91 $\pm$ 8.8	5
G1	100	92 $\pm$ 5.6	8
G 2	100	89 $\pm$ 8.2	11
G3	100	94 $\pm$ 5.1	6
Unformulated Bti	100	68 $\pm$ 5.6	32
Untreated Control	0	0	0

¹ Average of 4 repetitions

3.4 Evaluation of the residual activity of formulations

Formulations and unformulated Bti extract tested against *A.*

aegypti larvae, as presented in Fig. 2, showed that tablet 2, granulate 3, unformulated Bti extract, presented nearly 100%

mortality on the first post-application day, while the remaining granulates and tablets reached >90% mortality, without significant differences between treatments ($F = 1.9193$; $df = 7, 24$; $P = 0.110$; coefficient of variation [C.V.] = 6.14%). On the second post-application day, granulate 3, unformulated Bti extract, retained nearly 100% mortality, whereas tablet 2 and granulate 1 showed >90% mortality; however, tablets 1, 3, and 4 had decreased toxic activity to approximately 80% mortality ($F = 4.9714$; $df = 7, 24$; $P = 0.002$; C.V. = 10.40%). On the third post-application day, only granulates 1, 2, and 3, along with the unformulated Bti extract, retained approximately 90% mortality, whereas tablets showed <60% mortality, except for tablet 2 that showed nearly 80% mortality ($F = 11.5278$; $df = 7, 24$; $P < 0.0001$; C.V. = 13.83). On the 7 post-application day, granulate 3 presented residual activity of approximately 60% mortality, whereas unformulated Bti extract still showed 77% mortality; and all tablet formulations presented <50% mortality ($F = 6.4433$; $df = 7, 24$; $P < 0.0001$; C.V. = 23.58%). In the following sampling days, 14 ($F = 13.3487$; $df = 7, 24$; $P < 0.0001$; C.V. = 31.93%) and 21 ($F = 6.6911$; $df = 7, 24$; $P < 0.0001$; C.V. = 51.82%) post-application, granulates 2 and 3 showed 48-32% mortality, whereas the unformulated Bti extract showed only 22-10% mortality. At the end of the test,

the formulations lost their residual activity within 28 days ($F = 13.0714$; $df = 7, 24$; $p < 0.0001$; C.V. = 61.54%).

4. Discussion

Yields obtained from the production of larvicidal extracts widely varied. Yields obtained in the soluble medium I were lower than that of the reference and sunflower media; however, the toxicity presented was more than three times greater than those from the reference medium, which is mostly used for the production of other varieties of Bt. In addition, this spore-crystal complex was free of impurities, such as unused residues of culture media. Other researchers [20] obtained 9.1–15.7 g/L from a medium containing 10 g/L molasses, corn steep liquor (10 g/L), powder paste (30 g/L), and mineral salts, whereas in another work [21] reported 7.8 g/L from a medium containing 2.5% soybean meal. In another report [22] obtained 1.64–4.78 g/L of spores and crystals in the media with peptone and yeast extract at different concentrations. In a complex medium containing 30 g starch/L, 25 g soybean/L, and 5 g yeast extract/L, they [23] obtained 3.06 g/L of the spore and crystal complex. Similarly, other report [24] produced 6.85 g/L of spores and crystals in a medium containing 56 g glucose/L.

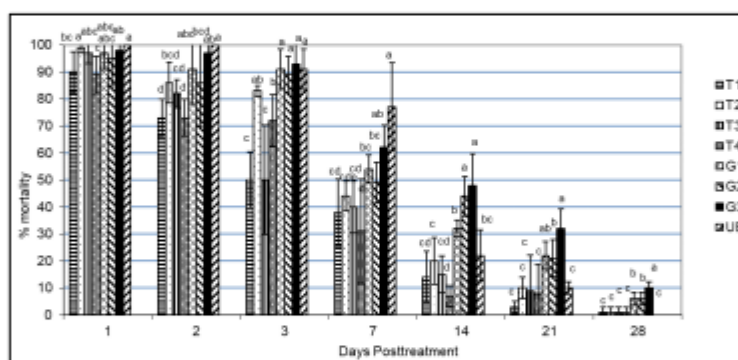


Fig. 2 Residual activity (means of 4 repetitions) of Bti formulations as Tablets (T) and Granules (G), besides unformulated Bti extract (UE) tested against late third instar *Aedes aegypti* larvae in laboratory conditions. (Different letters indicate significant differences on each sampling day determined through ANOVA and LSD at $P \leq 0.05$). Meanwhile, in a new work, [25] obtained 1,672 mg/L of Bti toxin variety *kurstaki* from a medium composed of wastes from the starch industry.

When LC_{50} was determined, 0.9296 mg/L was found for the extract produced by the reference medium containing molasses and soybean meal and 0.3748 mg/L for the extract produced in soluble medium I containing syrup and corn steep solids, both LC_{50} at 24 h; this means that the larvicidal extract produced in the soluble medium I was 2.4 times more toxic than that produced by the reference medium.

Compared to our results, in a previous work [20] obtained LC_{50} values between 0.2675 and 0.0685 mg/L from a culture medium containing 10 g/L molasses, corn steep liquor (10 g/L), powder paste (30 g/L), and mineral salts, whereas other authors have obtained 0.26 ± 0.10 mg/L from studies using a tablet [26]. However, in some reports [14] have obtained even smaller LC_{50} for the technical powder (4 ng/mL) used in the preparation of an experimental tablet, XL-47, whereas other researchers [22], also obtained 18 ng/mL from a medium composed of 2% peptone and 2% yeast extract. Although the

values obtained for LC_{50} were not the most toxic in this study, they are still comparable to other values obtained by some researchers [20, 26].

As regards the results of toxicity and residual activity assessments of the formulations in the first two days post-treatment, all formulations presented >80% mortality, except for tablets 1 and 4. On the third post-application day, all granulated formulations, along with unformulated Bti extract, retained approximately 90% mortality, which was not similar with those of tablets that decreased to <60%. Thus, the residual activity was better for granulated than for tablet formulations; granulate 3 retained approximately 60% mortality at 7 days post-application, and the unformulated Bti extract started to decline from 10 days post-application, which was surpassed by the granulated formulations: therefore, these showed >40% mortality in 14 days, whereas the unformulated Bti extract only presented approximately 25% mortality;

however, all formulations were losing their activity gradually. Compared to our results, other report ^[26] obtained much higher residual activity of up to 180 days in conditions without exposure to sunlight; however, the quantities used for their formulations (tablets) were also higher (250 mg/tablet) as compared to the amount used (1.6 mg) in this study. Other work ^[14] reported the preparation and evaluation of a tablet (190 mg) containing 4.8% of active ingredient, with reduced pupae formation from 59.2% to 100%, depending on the partial exposure to sunlight conditions to full exposure for 16–12 weeks; however, no larval mortality was reported in those periods. The amount of active ingredient on each tablet represented approximately 9 mg of the technical powder/tablet, and considering that 1, 2, 3, 5, or 8 tablets were added per container, each container could have contained 9–72 mg of active ingredient; values that were also much higher than our tablets containing only 1.6 mg.

Recently, experiments conducted with “fly ash” Bti formulations ^[27] tested against larval mosquitoes reportedly used the preparation of 16 formulations, where the formulation containing Bti, 4.5% lignite, and 1% carboxymethylcellulose was the most effective, with LC₅₀ values of 0.0417, 0.0462, and 0.1091 mg/L against *Cx. quinquefasciatus*, *A. aegypti*, and *An. stephensi*, respectively; however, the residual activity of these formulations was not reported.

Regarding to irradiation of UV light on formulations, granulated and tablet formulations presented smaller reductions in toxic activity (6–11 and 5–12%, respectively) as compared to the unformulated Bti extract, which showed greater reductions (32%) after 72 h of irradiation. In a previous work ^[28], they also obtained protection for Bti's toxin with various photo protectants, such as malachite green, and gelatin and acacia gum as encapsulating polymers. After 72 h of UV irradiation, larval mortality was reduced by 40% for the unformulated Bti extract and only 4–9% in prepared formulations. Thus, the inclusion of a photo protectant could to have a positive effect on the toxic activity. New formulations should be developed to improve the residual activity of products for an extensive use worldwide, primarily in developing countries.

5. Conclusions

The results of this study showed that larvicidal extracts more toxic can be obtained improving the composition of culture media, as those obtained from the soluble medium 1, which was higher than that from the reference and sunflower media. However, the yield obtained was less than reference medium, which indicate that is necessary a balance between toxicity and yield. The formulations prepared against *A. aegypti* larvae in the laboratory, presented nearly 90%–100% mortality, whereas tablets showed less 60% mortality, during the first 3 days post-application. After, the toxic activity was gradually decreasing, at 14 days post application, when granulated formulations presented approximately 40% mortality in comparison with the unformulated extract showing almost the middle of mortality. The addition of protectants for UV irradiation, friendly with the environment in formulations, prevents the loss of toxic activity of formulations.

6. Acknowledgements

Thanks to Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica from Universidad Autónoma de Nuevo León and

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología from Mexico by partial support.

7. References

1. Faust EC, Russel PF, Jung RC. Parasitología clínica. Reimpresión 1979. Salvat Eds. S. A. Mallorca, España. p 88.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow A W, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504–507. Doi: 10.1038/nature12060 PMID: 23563266.
3. World Health Organization. Chikungunya Fact Sheet [Internet]. 2015. Date of recovery: January 21, 2019. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>
4. World Health Organization. Zika Fact Sheet [Internet]. 2016. Date of recovery: January 21, 2019. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>
5. Vargas FV, Córdova PO, Alvarado A. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del Norte Peruano. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*. 2006;23:259–264
6. Bisset- Lazcano JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev. Panam. Salud Publica*. 2009;26:229–234. DOI 10.1007/s00449-009-0391-0
7. Maestre SR, Rey VG, De las Salas AJ, Vergara SC, Santacoloma VL, Goenaga OS, Carrasquilla FM C. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. *Rev. Col. Entomol*. 2009;35:202–205.
8. Becker N, Ludwig M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field population after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 1993;9:221–224.
9. Regis L, Nielsen-LeRoux C. Management of resistance to bacterial vector control. In: Charles J F, Delecluse A, Nielsen Le-Roux C. (Eds) *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. The Netherlands. 2000, 419–433.
10. Thiéry I, Back C, Barbazan P, Sinégre G. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* dans la demoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. *Ann Institute Pasteur*. 1996;7:247–260.
11. Sulaiman S, Pawanchee ZA, Wahab A, Jamal J, Sohadi AR. Field evaluation of Vectobac G, Vectobac 12AS and Bactimos WP against the dengue vector *Aedes albopictus* in tires. *J. Vector Ecol.* 1997;22:122–124
12. Batra CP, Mittal PK, Adak T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 2000;16:321–323.
13. Novak RJ, Gubler DJ, Underwood D. Evaluation of slow-release formulations of temephos (Abate) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1985;1:449–453.
14. Armengol G, Hernández J, Velez JG, Orduz S. (2006) Long-Lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. *J. Econ. Entomol.*

- 2006;99:1590-1595.
15. Maldonado-Blanco M. G, Galán-Wong LJ, Arévalo-Niño K, Medrano-Roldán H, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 based on agroindustrial byproducts in Northeastern Mexico. Israel J. Entomol. 1998; XXXII: 37-44.
 16. Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 1970;15:15-20.
 17. De Barjac H, Larget-Thiéry I. Characteristics of IPS-82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimeographed document. 1984 WHO/VBC/84.892. Geneva Switzerland: World Health Organization.
 18. Margalit J, Markus A, Pelah Z. Effect of encapsulation on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotype H-14. Applied Microbiol. & Biotechnol. 1984;19:382-383.
 19. United States Applied and Environmental Health. Pest management Program. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland 1989.
 20. Maldonado Blanco MG, Solís-Romero G, Galán-Wong LJ. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae. World J. Microbiol. & Biotechnol. 2003;19:671-674
 21. Prabakaran G, Balaraman K. Development of a cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Biol. Control. 2006;36:288-292.
 22. Prabakaran G, Hoti SL. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of δ -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent. J. Industrial Microbiol. & Biotechnol. 2008;35:961-965.
 23. Ghrabi D, Zouari N, Trigui W, Jaoua S. Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. Process Biochem. 2007;42:374-378. doi:10.1016/j.procbio.2006.09.006
 24. Arcas J, Yantorno OM, Ertola RJ. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnol. Lett. 1987;9:105-110.
 25. Vu KD, Tyagi RD, Valero JR, Surampalli Y. Batch and fed-batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* using starch industry wastewater as fermentation substrate. Bioprocess Biosyst. Eng. 2010;33:691-700.
 26. Araújo AP, Varjal MA, Oliveira S, Mariz EM, Regis L. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). Biol. Control. 2007;41:339-347.
 27. Tamilselvan S, Manonmani AM, Jambulingam P. Fly ash-based water dispersible powder formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Indian J. Med. Res. 2017;146:714-721. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_651_15
 28. Maldonado-Blanco MG, Galán-Wong LJ, Rodríguez-Padilla C, Quiroz-Martínez H. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2002;18:352-358