

Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti

Gustavo Ochoa & Jazzmin Arrivillaga*

Bacillus thuringiensis (Bt) se presenta como una alternativa atractiva para el control de *Aedes aegypti* por sus claras ventajas sobre insecticidas químicos, a saber: alta especificidad, inocuidad sobre el medio ambiente y lento desarrollo de resistencia. Las nuevas tendencias en formulaciones que utilizan agentes encapsulantes como almidón, o adsorción a partículas de arcilla, ayudan a proteger los productos Bt de factores que afectan su actividad, tales como la radiación UV, la temperatura y la degradación microbiana, mejorando la persistencia del producto, al tiempo que pueden actuar como fago-estimulantes. No obstante, es necesario evaluar estas propuestas en el contexto del control de *Aedes aegypti*, sobretodo en relación a la manipulación humana de los criaderos y el estado nutricional de la larva. Bt también ofrece la posibilidad de obtener productos variados que permitan la alternancia de aplicaciones y, posiblemente, productos que, de ser necesario, se adecuen a las necesidades específicas de cada región.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, Dengue, control, *Bacillus thuringiensis*.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Bt) fue descubierta a principios del siglo XX en Japón por a partir de larvas muertas del gusano de la seda (Ishiwata 1902), pero fue descrita por Berliner en 1911 cuando lo aisló a partir de larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) en la provincia alemana de Thuringia.

Bacillus thuringiensis es una bacteria del suelo, anaerobia facultativa, móvil y esporogénica, perteneciente al grupo de bacterias Gram positivas conformado por *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (Lecadet, 1970). *Bacillus thuringiensis* se caracteriza porque luego de la fase de crecimiento exponencial, las células producen tanto una espora subapical como uno o varios cuerpos parasporales: inclusiones compuestas de una o más proteínas cristalinas (ICPs) que tienen actividad insecticida específica, incluso a nivel de especie (Lecadet, 1970; Schnepf *et al.*, 1998). En la

mayoría de las subespecies, la producción de estas inclusiones está acoplada a la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998, Sedlak *et al.*, 2000).

Las toxinas de Bt comenzaron a utilizarse comercialmente en Francia en 1938, y para 1958 su uso se había extendido a los Estados Unidos. A partir de los años 80 Bt se convierte en un plaguicida de interés mundial (Feitelson *et al.*, 1992). Las toxinas Bt se utilizan actualmente en los Estados Unidos, Europa, Argentina y México como control biológico para numerosos insectos y otros invertebrados plaga tales como ácaros, nemátodos, platelmintos y protozoarios que afectan los cultivos de maíz, papa, tomate, sorgo, arroz, café, granos, caña de azúcar, entre otros (Neppl, 2000). Los productos comercializados de *B. thuringiensis* consisten principalmente en preparados de esporas y cristales, activados o no, que se rocían sobre los cultivos como si se tratara de un insecticida convencional. Estos preparados provienen generalmente de las subespecies *kurstaki* (Btk) y *tenebrionis* (Btt) (Feitelson *et al.*, 1992).

Desde su descubrimiento se han reportado unas 67 subespecies activas contra un gran número

Universidad Simón Bolívar. Departamento de Estudios Ambientales. Laboratorio de genética de poblaciones. Sección invertebrados. Ecología de Vectores. Valle de Sartenejas. Código Postal 89000, estado Miranda, Venezuela.

*Autor de correspondencia: jazzmin.arrivillaga@gmail.com

de invertebrados plaga (Crickmore *et al.*, 2009). Los grupos se definieron originalmente en base a características bioquímicas y morfológicas, y a los antígenos flagelares (Schnepf *et al.*, 1998). Actualmente se usa un sistema complejo que combina la caracterización de los antígenos flagelares, de las inclusiones cristalinas y sus genes codificantes, con otros criterios bioquímicos y moleculares tales como el espectro de toxicidad y el perfil plasmídico (Crickmore *et al.*, 2009).

A finales de la década de los 70 se identifica en la ribera de un río en Israel una subespecie tóxica para varias especies de dípteros. La nueva subespecie, que se denominó *Bt israelensis* (*Bti*) (Goldberg & Margalit, 1977), comenzó a usarse con éxito para el control de poblaciones de especies de moscas y mosquitos vectores, presentando unos valores de LC₅₀ de alrededor de 12 ng/mL (Federici *et al.*, 2003), dando origen a productos comerciales de *Bti* utilizados estrictamente para el control de dípteros como el Vectobac® (desarrollado por Bayer, basado en preparaciones del serotipo H-14 de *Bt* var. *israelensis*) y el Teknar® (desarrollado por Valent Bioscience, basado en una variedad no esporogénica de *Bt* var. *israelensis*).

Sin embargo, la aplicación de *Bti* para el control del mosquito vector urbano *Aedes aegypti* a nivel mundial (WHO, 2009) y en Venezuela (PAHO, 2009) no ha sido frecuente, a pesar del desarrollo biotecnológico que ha generado bioinsecticidas de varias generaciones de *Bt* (Bora *et al.*, 1994; Kalman *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007) y de su uso en el control biológico de otras especies de mosquitos acuáticos vectores (Delgado, 2005; Osborn *et al.*, 2007) y plagas agrícolas (Stevens *et al.*, 2004).

La existencia de pocos trabajos experimentales y de evaluaciones en el campo relacionados con el uso de *Bti* en el control biológico *Ae. aegypti*, nos ha motivado a analizar la información disponible, y exponer los resultados con base a las ventajas del uso de *Bti*, caracterizando sus propiedades biológicas, refiriendo los principales problemas observados en las aplicaciones y las tendencias que se han venido evaluando para mejorar el uso de *Bti* en el manejo biológico de este importante vector urbano.

Toxicidad de Bt y mecanismo de acción.

Las toxinas cristalinas existen en una diversidad de formas: bipiramidal, esférica, romboidal, cuboidal e irregular, entre otras, y son activas contra un gran número de grupos de insectos así como también nemátodos y protozoarios (Crickmore *et al.*, 2009). Los genes que codifican estas proteínas residen en megaplásmidos conjugables (Minnich & Aronson, 1984; Feitelson *et al.*, 1992) y fueron bautizados *cry*, y a sus proteínas codificadas se les designó δ -endotoxinas Cry. Las distintas proteínas Cry se clasifican según su homología en grupos y subgrupos que guardan cierta relación con los organismos sensibles a ellos (Crickmore *et al.*, 1998). Hoy en día existen más de 40 grupos de proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 2009).

Las δ -endotoxinas Cry son sintetizadas como pro-toxinas inactivas que son ingeridas por las larvas al alimentarse de la planta o del detritus del suelo. Las inclusiones son solubilizadas en las condiciones alcalinas del tracto digestivo de la larva y son convertidas, por la acción de proteasas del insecto, en péptidos activos (Schnepf *et al.*, 1998; Feitelson *et al.*, 1992). La toxina activa es reconocida por un receptor específico y se inserta en la membrana del borde de cepillo del tracto digestivo del insecto (Gazit *et al.*, 1998; Gerber & Shai, 2000). Allí ocurre una oligomerización que resulta en la formación de canales catiónicos de 0.5 a 1 nm de diámetro (Gerber & Shai, 2000). Estos poros propician un influjo inespecífico de iones, principalmente iones K⁺, que disipa los gradientes iónicos y disminuye el pH del medio provocando una lisis celular osmótica que deja a la larva incapacitada para alimentarse (Schnepf *et al.*, 1998). Por otra parte, la destrucción tisular permite la mezcla del contenido del tubo digestivo con la hemolinfa que, junto con el bajo pH, favorece la germinación de esporas bacterianas, conduciendo a una septicemia que produce la muerte de la larva pocos días después de la ingestión de los cristales (Schnepf *et al.*, 1998; Aranda *et al.*, 1996).

Este mecanismo ocurre de igual manera para todas las proteínas Cry estudiadas puesto que el dominio de la proteína responsable de la toxicidad está altamente conservado (Crickmore *et al.*, 2009) y es el dominio de reconocimiento por parte del receptor el responsable de la diversidad de blancos (Hofmann *et al.*, 1988).

PROPIEDADES DE *Bt*

Efectos sobre el medio ambiente

Hasta ahora las investigaciones han demostrado que los productos de *Bt* no suponen un riesgo para artrópodos no diana, aves, peces ni mamíferos, observándose, en todos los casos, valores de toxicidad de muy baja a inexistente y siempre con dosis mayores a las de uso (EPA, 2008). De hecho, los únicos efectos dañinos observados son indirectos por disminución de la disponibilidad de alimento para los depredadores de los organismos diana de *Bt*. Aunado a esto, también se ha determinado que los productos de *Bt* tampoco tienen efectos negativos sobre el medio ambiente (EPA, 2008).

En el caso específico de *Bti*, un estudio llevado a cabo en un río de Pensilvania (EEUU) durante 8 años demostró que la aplicación de *Bti* no tiene efecto en la composición y densidad de las poblaciones de peces y macroinvertebrados no diana, ni siquiera en ciertas especies de quironómidos que previamente se habían reportado como sensibles a *Bt*. Por otro lado, la aplicación de *Bti* sí redujo las poblaciones de la larva de la mosca negra (Diptera: Simuliidae), uno de los blancos de esta bacteria (Jackson *et al.*, 2002).

También se ha reportado la ocurrencia natural de *Bt* en cuerpos de agua dulce de Japón (Ichimatsu *et al.*, 2000) y España (Iriarte *et al.*, 2000), y un porcentaje considerable (26,7% y 6,6% respectivamente) de los aislados presentaban actividad contra dípteros. Considerando que *Bti* fue originalmente aislado del suelo de una ribera (Goldberg y Margalit, 1977) es lógico pensar que *B. thuringiensis* pueda encontrarse naturalmente en los sedimentos de cuerpos de agua y que naturalmente ya se encuentra ejerciendo un control sobre algunas poblaciones de dípteros.

Especificidad

Bt actúa específicamente sobre ciertos grupos. Tyrell *et al.* (1979) evaluaron la toxicidad de las inclusiones cristalinas de *Bt* subsp. *israelensis* (*Bti*) y *kurstaki* (*Btk*) en larvas de *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) y *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820) (Diptera: Culicidae), y el gusano cachón del tabaco *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae). Encontraron que los cristales purificados de *Bti*

resultaban tóxicos para las larvas de dípteros a concentraciones del orden de 10^{-3} y 10^{-4} µg/mL, mientras que dosis de 300 µg/mL no tenían efecto alguno sobre el gusano del tabaco *M. sexta*. De forma análoga, para obtener un 50% de mortalidad en *Ae. aegypti* con los cristales purificados de *Btk*, fue necesaria una dosis 10^4 veces mayor de la LC_{50} para *M. sexta*.

Esta especificidad se debe, principalmente, a una gran plasticidad genética que propicia, no sólo una amplia diversidad de toxinas, sino que además permite la ocurrencia de cepas con diferentes combinaciones de éstas. Las causas de la especificidad dependen del tipo de proteínas presentes en diferentes cepas de *Bt*. La nomenclatura actual de las toxinas Cry las agrupa como: 1) Proteínas tóxicas a lepidópteros grupos Cry1, Cry2 y Cry9; 2) Toxinas activas contra coleópteros grupos Cry3, Cry7 y Cry8; 3) Proteínas con actividad dual grupos Cry1B y Cry11; 4) Proteínas con actividad nematocida, grupos Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14; 5) Proteínas tóxicas a dípteros, grupos Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las Cyt (Crickmore *et al.*, 2009). No obstante, los receptores de membrana que reconocen y unen las toxinas, también juegan un papel importante en la especificidad del *Bti* (Hofmann *et al.*, 1988; Pigott y Ellar, 2007).

Susceptibilidad y resistencia

La aplicación de *Bt* en el control de insectos, no está exenta de la aparición de resistencia, de hecho, muchas de las plagas agrícolas que eran controladas por algunas subespecies de *Bt* como *Bt kurstaki*, ahora presentan resistencia a sus efectos (Neppel, 2000). Sin embargo, a pesar de que *Bt. israelensis* se ha usado durante años, los niveles de resistencia detectados en campo son mínimos (Wirth *et al.*, 2005). Esto parece tener su explicación en la composición de la inclusión cristalina de *Bti*: el cristal de *Bt israelensis* está compuesto por cuatro toxinas diferentes: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa (Crickmore *et al.*, 2008). Las toxinas citolíticas Cyt (Schnepf *et al.*, 1998; Feitelson *et al.*, 1992), que al igual que las proteínas Cry están codificadas por genes plasmídicos (Feitelson *et al.*, 1992). Georgiou & Wirth (1997) evaluaron la respuesta de *Cx. quinquefasciatus* frente a complejos de toxinas y toxinas individuales de *Bt israelensis*, encontrando que la combinación de toxinas podía reducir la resistencia a las toxinas individuales hasta en 1000 veces. Estos investigadores crearon líneas

resistentes de *Cx. quinquefasciatus* por selección artificial, mediante la exposición de varias generaciones de larvas a diferentes combinaciones de toxinas de *Bti*. Al comparar la susceptibilidad de estas líneas con la de la cepa parental no seleccionada observaron que la resistencia aparecía más lentamente cuanto mayor número de toxinas se utilizaron para la selección.

Estudios posteriores al respecto demuestran que la proteína Cyt juega un papel importante en este retraso o reducción de la aparición de resistencia. Pérez *et al.* (2005) evalúan la participación de las toxinas Cry11A y Cyt1A y la interacción de ambas en el desarrollo de la resistencia a dichas toxinas. Para esto, determinaron la concentración de una mezcla de ambas toxinas que se necesitaba para mantener un nivel determinado de mortalidad en líneas de *Cx. quinquefasciatus* sometidas a selección artificial con Cry11A, Cyt1A o una combinación de ambas toxinas. Estos autores hallaron que la línea seleccionada con ambas toxinas requería concentraciones de toxina más bajas que las líneas seleccionadas con una única toxina, en otras palabras, mantenía altos niveles de susceptibilidad a lo largo de las generaciones.

Lo que parece suceder es que, dada su afinidad por fosfolípidos de membrana (Butko, 2003), Cyt1A actúa como un receptor de membrana para otras proteínas Cry, como por ejemplo Cry11A, facilitando la inserción independientemente de los receptores propios del insecto. De esta manera se reduce la presión selectiva, dificultando la aparición de mecanismos de resistencia (Pérez *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se ha visto que esta selección artificial no induce resistencia cruzada con otras toxinas Cry. Por ejemplo, 3 líneas de *Cx. quinquefasciatus* seleccionadas con Cry11A, Cry4A y Cry4B y la inclusión purificada de *Bti*, presentaron iguales niveles de susceptibilidad a la acción de Cry19A de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*, otra variedad con actividad antidípteros. Los valores de LC50 oscilaron entre 1,15 y 1,97 µg/mL, en comparación con los 0,98 µg/mL de la línea parental no seleccionada (Wirth *et al.*, 2001). No deja ser interesante verificar estas observaciones para *Ae. aegypti*.

Persistencia

La acción residual de los productos de *Bti* depende de la formulación y de las condiciones de la

aplicación. Por ejemplo, Lee y Zairi (Lee & Zairi, 2005) evaluaron la persistencia de la formulación comercial granulada Vectobac WDG® (Abbott Laboratories, Australia) con y sin recambio de agua en condiciones de laboratorio. El ensayo se llevó a cabo en recipientes de vidrio de 2 litros, y según las instrucciones de aplicación del producto. Semanalmente, desde el primer día se colocaban 20 larvas de tercer o cuarto instar y se registraba la mortalidad a las 24 y 48 horas. Diariamente se sustituían 300 mL del agua de los envases para simular el uso de los recipientes caseros.

Los resultados arrojaron valores de mortalidad para *Ae. aegypti* de más de 95% hasta por 45 días en el tratamiento con recambio de agua, 10 días más que para el tratamiento sin recambio, lo cual puede deberse a la resuspensión de la toxina en el recipiente. No obstante, se observó que la actividad decayó más rápidamente en el tratamiento con recambio de agua, probablemente por variaciones en la concentración del producto.

Por otro lado, Lima *et al.* (2005), trabajando con *Ae. aegypti*, estudiaron la persistencia de otras dos formulaciones comerciales: Aquabac G® (Becker Microbial Products Inc.) y Vectobac G® (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.), en el laboratorio y simulando condiciones de campo. En el laboratorio se utilizaron tanques de aluminio de 40 L en los que se aplicó el producto. Semanalmente se tomaron muestras de agua donde posteriormente se colocaron larvas de tercero o cuarto instar y se registró la mortalidad a las 24 horas. Para la simulación de las condiciones de campo se usaron tanques de concreto de 100 L situados al aire libre. Cada 3 a 6 días unas 100 larvas eran expuestas al agua del tanque tratada con el producto y se registraba la mortalidad a las 24 horas. Los resultados obtenidos indican que en condiciones de laboratorio, Vectobac G® puede mantener una actividad del 95% hasta por 100 días, mientras que la persistencia de Aquabac G® es de aproximadamente la mitad. Sin embargo, en condiciones de campo la actividad de Vectobac® se reduce a un máximo de 25 días (Lima *et al.*, 2005).

También se tiene evidencia de que algunas formulaciones de *Bti* presentan un efecto residual menor que los larvicidas químicos como por ejemplo Temefos. Soares *et al.* (2005) evaluaron la persistencia de dos presentaciones comerciales de Temefos (Larvell® y Larvyn®) frente a la presentación comercial de *Bti* Vectobac WDG®. La persistencia se estimó

determinando los porcentajes diarios de mortalidad para *Ae. aegypti*: cada día se contabilizaban las larvas muertas y se introducían 25 nuevas larvas de tercer instar; el 80% del agua de los recipientes era renovada diariamente. Con el larvicida Temefos se obtuvieron valores de mortalidad de más del 90% hasta 50 días después de la aplicación del producto en condiciones de laboratorio, sin embargo, con *Bti* esta tasa de mortalidad se registró por apenas 35 días.

En general, se observa que la persistencia dependerá de la formulación y las condiciones de aplicación, y esto tiene algunas implicaciones que se discutirán más adelante.

PERSPECTIVAS EN EL USO DE *Bt* PARA EL CONTROL DE *Ae. aegypti*.

Son muchos los factores que pueden afectar la actividad de las toxinas de *Bt* y la información en cuanto a *Ae. aegypti* es escasa. En primer lugar podría colocarse la importancia que ha tenido el estudio de las aplicaciones de *Bt* para el control de lepidópteros, probablemente por su asociación al área de la agricultura y la seguridad alimentaria, dado que las principales plagas de cultivos pertenecen al orden de los lepidópteros. Así pues, la mayor parte de la investigación en *Bt* se ha desviado, por decirlo así, hacia el estudio de variedades y el desarrollo de productos para este fin, y esto aplica también para las nuevas estrategias en formulaciones que serán abordadas más adelante.

Sin embargo, se sabe que las toxinas Cry de *Btk* y *Bti* son muy parecidas entre sí (Thorne *et al.*, 1986; Hofte & Whiteley, 1989) y que presentan mecanismos de acción prácticamente idénticos (Schnepf *et al.*, 1998; Hofte & Whiteley, 1989). Así pues, muchos de los adelantos en la aplicación de *Btk* para el control de lepidópteros pudieran ser aplicables a *Bti* para el control de dípteros.

En segundo lugar, es posible que la aparente baja efectividad de *Bt* en cuanto a acción residual y la disponibilidad de productos químicos hasta el momento eficientes en este aspecto, enmascaren la necesidad de tales estudios.

Ahora bien, en cuanto al área de control de lepidópteros se ha discutido la susceptibilidad de las toxinas de *Bt* a la acción de factores ambientales como

la radiación ultravioleta (UV) (Putzai *et al.*, 1991) y la temperatura (Cokmus & Elçin, 1995) que pueden inactivarlas. La radiación UV cobra importancia en el contexto del control de *Ae. aegypti* ya que muchos de los criaderos, como toneles, cauchos y otros recipientes, se encuentran al descubierto y expuestos a la radiación solar (Barrera *et al.*, 2002); asimismo, el aumento en la temperatura sería una consecuencia indirecta de la exposición al sol.

En Venezuela se han realizado algunos estudios en el área de control mosquitos y se ha determinado que los factores que tienen que ver con las conductas de la larva también afectan la actividad. Por ejemplo, Delgado (2005) estudia el efecto sobre *Anopheles aquasalis* (Curry) (Diptera: Culicidae) de 4 formulaciones de *Bti*: Vectobac AS®, Vectobac G®, Teknar® y un micro-encapsulado, en relación a algunos factores que proporcionan información sobre el comportamiento alimenticio de la larva como la densidad de la población de larvas, la duración del cuarto instar y la presencia de alimento. También se evalúa el efecto de la radiación UV y la temperatura. Según los resultados obtenidos, los factores más influyentes en la efectividad de estas formulaciones de *Bti* son la exposición a la radiación UV y aquellos que tienen que ver con las conductas alimentarias de la larva.

Aunque estos estudios se llevaron a cabo en *An. aquasalis*, que presenta hábitos alimentarios muy distintos a los de *Ae. aegypti*, es probable que se llegue a conclusiones similares. La toxina de *Bt* ejerce su acción en el intestino medio por lo que su actividad depende, en una gran medida, de que sea ingerida por el insecto blanco. Sin embargo no deja de ser necesario evaluar estos resultados en *Ae. aegypti*.

Otro aspecto a considerar tiene que ver con la flotabilidad o la capacidad de las formulaciones para mantenerse en suspensión (Delgado, 2005). En el caso de *Anopheles* spp., por ejemplo, la flotabilidad del producto podría ser importante, considerando que su estrategia de alimentación es la filtración de partículas en suspensión (Dahl *et al.*, 1993). Sin embargo, para *Ae. aegypti* esto quizás no represente un problema, dado que esta especie puede sumergirse y raspar-filtrar partículas depositadas (Dahl *et al.*, 1993).

Del trabajo de Delgado (2005) también se infiere la importancia de facilitar el consumo de la toxina por parte de la larva. Al evaluar la influencia

de la presencia de alimento en la actividad de las formulaciones se encontró que en presencia de alimento se obtuvo un porcentaje de mortalidad mayor al esperado (Delgado, 2005). En este caso, y dada la naturaleza filtradora de *Anopheles*, la presencia de alimento parece haber facilitado el consumo de la toxina, en el sentido que al filtrar el agua, las larvas tomaron conjuntamente partículas de alimento y partículas de las formulaciones. Se especula entonces que este mecanismo de facilitación también pueda ser relevante para *Ae. aegypti*.

Otro factor que se ha determinado pudiera influir en la actividad y la persistencia de los productos de *Bt* en el ambiente es la acción microbiana. Los microorganismos que pudieran estar presentes en el suelo, en el filoplano y en los cuerpos de agua bien podrían degradar las toxinas de *Bt* (Koskella & Stotzky, 1997).

En vista de lo expresado en los últimos párrafos acerca de los factores que afectan la acción biocida de *Bt*, una buena parte de la investigación se ha dirigido a desarrollar estrategias para atacar los principales factores adversos a su actividad larvicida. Las nuevas estrategias de aplicación buscan proteger las toxinas contra las altas temperaturas y la exposición a la radiación UV, para mejorar así la persistencia de la toxina en el ambiente, y estimular su consumo por parte de la larva, para aumentar su actividad. A continuación se describen algunas de estas tendencias y estrategias.

Protección ante el efecto de la temperatura

Para esto se ha buscado encapsular las toxinas en materiales que las protejan de las altas temperaturas. Por ejemplo, Cokmus & Elçin (1995) expusieron el efecto protector que tiene la carboximetil-celulosa sobre las inclusiones cristalinas de *Bti* ante la temperatura. El experimento consistió en exponer a 50° C hasta por 60 días dos formulaciones: una de esporas/cristales encapsuladas con carboximetil-celulosa y otra no encapsulada a modo de control, para luego probar su toxicidad sobre larvas de tercer instar de *Culex* sp. Encontraron que la toxina encapsulada mantenía una actividad del 100% aún si se exponía por 60 días a temperaturas de 50° C. Sin embargo, la actividad de la toxina libre se reducía a un 70% bajo estas condiciones.

Protección ante el efecto de la radiación UV

Ragaei (1999) resume algunas de las estrategias que se han estudiado para proteger las toxinas de *Bt* del efecto adverso de la exposición a los rayos ultravioleta. Algunas de ellas consisten en añadir a las formulaciones pigmentos fotoprotectores como Rojo Congo, Rodamina o Acriflavina e incluso melanina. Por otra parte, Vilas-Bôas *et al.* (2005) reportan la construcción de un mutante de *Bt*. var. *thuringiensis* que sintetiza melanina, el cual sería un candidato para producir formulaciones de *Bt* con protección ante los rayos ultravioleta. Otras tendencias consisten en la encapsulación de los cristales en almidones o harinas que los protegerían de la luz ultravioleta (Ragaei, 1999).

Elementos fago-estimulantes

Además de proteger contra la radiación ultravioleta, las harinas y almidones podrían ejercer un efecto fago-estimulante, mejorando el consumo de la toxina por parte de la larva. Por ejemplo, Ramírez-Suero *et al.* (2005) llevan a cabo la evaluación de un formulado de *Bti* encapsulado en partículas de maltodextrina, almidón y harina de maíz. Para esto prepararon extractos de esporas y cristales y los trataron con los distintos agentes para luego obtener un producto sólido. Al aplicar los productos en larvas de 3er instar de *Ae. aegypti* encontraron que, en el caso del almidón la actividad aumentaba alrededor de un 8% respecto a la de la toxina libre, y hasta en un 81% para el caso de la encapsulación en harina de maíz.

Estos investigadores atribuyen esta mejora en la actividad a la posibilidad de que las harinas y los almidones funcionen como agentes “dietéticos” que estimulen el consumo por parte de la larva y de esta manera mejoren la llegada de la toxina a su sitio de acción (Dahl *et al.*, 1993; Ramírez-Suero *et al.*, 2005). Adicionalmente, este efecto estimulante puede deberse al contenido calórico de las harinas, lo que estimula la alimentación de las fases larvarias de *Ae. aegypti* (Briegel, 2003). Adicionalmente, los carbohidratos son ingeridos a una tasa de asimilación y catabolismo alta, lo que aumenta la cinética de consumo de *Bti* cuando esta asociada al carbohidrato, sin embargo, los investigadores no discuten esta posibilidad.

En este sentido, Ochoa *et al.* (artículo en preparación), han realizado ensayos utilizando dos tipos de suspensiones acuosas de esporas y cristales de

Bti nativo de Venezuela. Estos ensayos han mostrado que las larvas raspan las partículas depositadas, observándose también que el efecto larvicida perdura por más tiempo cuando se acoplan las inclusiones cristalinas a los gránulos de almidón provenientes del medio de cultivo, obteniéndose resultados similares a los señalados por Ramírez-Suero *et al.* (2005) pero a partir de un mecanismo diferente de acoplamiento.

Protección ante la acción de microorganismos

La investigación a este respecto se ha llevado a cabo principalmente en el área del control de lepidópteros. En este caso se ha estudiado la adsorción de las toxinas a partículas de arcilla a fin de minimizar su utilización por otros microorganismos que pudieran encontrarse en el suelo o en el filoplano (Koskella & Stotzky, 1997).

El experimento consistió en permitir que las toxinas se adsorbieran a partículas de arcilla (montmorillonita o kaolinita) en solución tamponada hasta obtener complejos de arcilla-toxina estables, es decir, que la toxina adsorbida no se desprendiera con los lavados. Luego estas partículas fueron utilizadas como fuente de energía para un cultivo bacteriano mixto obtenido de una suspensión de suelo en agua corriente. Para esto la mezcla bacteriana se cultivó en un medio mínimo suplementado con la toxina de *Btk* libre o adsorbida a partículas de arcilla, y se comparó la tasa de consumo de oxígeno de estos cultivos con la de un cultivo suplementado con pepsina. Los resultados demuestran la escasa utilización de la toxina como fuente energética cuando se encuentra adsorbida a las partículas de arcilla.

Adicionalmente, los investigadores verificaron la actividad larvicida de la toxina adsorbida. Para esto primeramente incubaron preparaciones de toxina libre y adsorbida a arcilla durante 40 días en suelo no estéril. Las toxinas recuperadas se añadieron a un medio solidificado para el gusano cachón del tabaco *M. sexta* (L) donde, posteriormente, se cultivaron larvas de segundo instar de esta especie. Los resultados muestran, por una parte, que la adsorción de la toxina no afecta negativamente su actividad; por otro lado, aún cuando la incubación en suelo no estéril disminuye la toxicidad (LC_{50}) de la proteína en general, la potencia de la toxina adsorbida resulta mayor en relación a la de la toxina libre (LC_{50} toxina libre / LC_{50} toxina adsorbida).

Mejoramiento de la persistencia en el ambiente

Los almidones y las arcillas también podrían mejorar la persistencia en general de las toxinas de *Bt* en el ambiente. Por ejemplo, Singh y colaboradores (Singh *et al.*, 2007) reportan un aumento significativo en la persistencia de la actividad ante la larva de la polilla *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), de una formulación de *Btk* y almidón respecto a una formulación comercial. Se encontró en ensayos de campo, que luego de 72 h de la aplicación la actividad del formulado comercial descendía en un 50% mientras que la formulación con almidón mantenía una actividad del 70% de mortalidad.

En cuanto a las arcillas, la estrategia se ha estudiado en el campo de control de mosquitos por Lee *et al.* (2003). Estos investigadores obtuvieron complejos de toxinas de *Bt* y partículas de arcilla según lo descrito por Koskella & Stotzky (1997) pero utilizando las toxinas de *Bti*. Luego, alícuotas de estos complejos y de la toxina libre se mantuvieron hasta por 45 días en agua no estéril. Estas preparaciones se utilizaron para bioensayos de toxicidad con *Culex pipiens* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae). Los resultados demuestran que la adsorción a partículas de arcilla mejora la persistencia de las toxinas de *Bti* en condiciones de laboratorio, puesto que luego de 45 días de incubación, la mortalidad con la toxina libre es de $25 \pm 12,5\%$, mientras que la de la toxina adsorbida alcanza el $63 \pm 12,7\%$ (Lee *et al.*, 2003).

Un estudio más reciente propone la inmovilización de las toxinas en matrices de alginato (Prabakaran & Hoti, 2008). Los investigadores evalúan la toxicidad de una preparación de esporas y cristales de *Bti* inmovilizada en alginato de sodio sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus*, y discuten sobre las ventajas de aplicar esta formulación en aguas expuestas a la radiación UV y variaciones de temperatura (Prabakaran & Hoti, 2008).

OTROS ASPECTOS: LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *Ae. aegypti* Y LA MANIPULACIÓN DE LOS HÁBITATS

Se ha visto que para *Ae. aegypti* la competencia intraespecífica y la limitación del alimento son importantes factores reguladores de las poblaciones del mosquito en sistemas urbanos (Arrivillaga &

Barrera, 2004). De este modo, un tratamiento que no elimine la mayoría de los individuos puede favorecer a los sobrevivientes en términos de competencia por el alimento, conllevando a la producción de adultos de mayor talla y mayor capacidad vectorial, al tiempo que favorece la selección direccional de poblaciones resistentes según lo discutido previamente (Wirth *et al.*, 2005).

Un lento decaimiento en la actividad de la formulación puede propiciar este escenario. En efecto, la manipulación humana de los hábitats, por ejemplo, la frecuencia de uso del agua y recambio de esta, puede alterar la disponibilidad del agente controlador. Un ejemplo es el trabajo de Lee & Zairi (2005), donde se obtienen tiempos de decaimiento de actividad diferentes según la frecuencia de recambio de la columna de agua. Según este experimento, en un criadero con poco recambio de agua la toxina de *Bti* está disponible durante más tiempo, pero también hay un período de actividad subóptima más prolongado que en uno con alta frecuencia de recambio. Esto puede propiciar la ocurrencia de subpoblaciones nutricionalmente favorecidas, con todos los inconvenientes que se discutieron previamente.

Así pues, es necesario evaluar estos parámetros en cualquier formulación de *Bt* que pretenda mejorar la persistencia, de modo que el producto ofrezca máxima efectividad durante el mayor tiempo posible, pero asegurando que la pérdida de la actividad sea rápida o que la formulación sea consumida en su totalidad.

CONCLUSIONES

En general, todas estas propuestas buscan mejorar la actividad de las formulaciones de *Bt*, en función de los problemas que se han observado en las distintas áreas de su aplicación. Sin embargo, no deja de ser necesario validarlas para el caso particular de *Ae. aegypti*. En el contexto de *Ae. aegypti* estas estrategias podrían resultar muy convenientes tomando en consideración que esta especie es principalmente urbana, ya que la aplicación de formulaciones conteniendo almidones, harinas o arcilla supondrían un riesgo mínimo para el ambiente o para el hombre, dada su inocuidad. Además, la naturaleza particulada y poco soluble de estas formulaciones resulta conveniente para *Ae. aegypti* que es capaz de alimentarse raspando partículas depositadas (Dahl *et al.*, 1993).

No obstante, sería necesario evaluar el efecto de estas formulaciones en el contexto de la manipulación humana de los hábitats, ya que la frecuencia, tanto en el uso como en el recambio del agua de los recipientes, y en el suministro de agua en países latinoamericanos, afectan la densidad larval y el consumo de la toxina, por lo que estas variables pudieran interferir en la actividad larvicida de *Bti*. Estudios en relación a esto han evidenciado la necesidad de conocer la dinámica del vector en relación a los parámetros antrópicos del foco de transmisión de Dengue antes de realizar cualquier aplicación de *Bti*.

Bacillus thuringiensis: Advances and perspectives in the biological control of Aedes aegypti

SUMMARY

Bacillus thuringiensis is an attractive alternative for the control of *Aedes aegypti* for its clear advantages over chemical insecticides, high specificity, safety on the environment and slow development of resistance. New trends in formulations using encapsulating agents such as starch, or adsorption to clay particles that help protect the products of *Bt* factors affecting their activity, such as UV radiation, temperature and microbial degradation, enhance the persistence of the product, which can act as phage-type stimulants. However, it is necessary to evaluate these proposals in the context of the control of *Ae. aegypti*, especially in relation to the human manipulation of breeding sites and nutritional status of the larva. *Bt* also offers the possibility of obtaining products that enable a variety of alternate applications, and possibly products, if necessary, to suit the specific needs of each region.

Key words: *Aedes aegypti*, Dengue, control, *Bacillus thuringiensis*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores extienden su agradecimiento a la Dra. Nereida Delgado (UCV) y Dra. Solange Issa (USB), por los comentarios al manuscrito. Proyecto FONACIT, Misión Ciencia, Sub-proyecto 2008000911-4.

REFERENCIAS

- Aranda, E., Sánchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., & Bravo, A. (1996). Interactions of the *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Inver. Pathol.* **68**: 203-212.
- Arrivillaga J. & Barrera R. (2004). Food as a limiting factor for *Aedes aegypti* in water-storage containers. *J. Vector Ecol.* **29**: 11-20.
- Barrera R., Delgado N., Jiménez M. & Valero S. (2002). Eco-epidemiological factors associated with hyperendemic Dengue Hemorrhagic Fever in Maracay City, Venezuela. *Dengue Bull.* **26**: 84-95.
- Bora R., Murty M., Shenbargarathai R. & Sekar, V. (1994). Introduction of Lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phylloplane. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 214-222.
- Briegel H. (2003). Physiological bases of mosquito ecology. *J. Vector. Ecol.* **28**: 1-11.
- Butko P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2415-2422.
- Cokmus C. & Elçin M. (1995). Stability and controlled release properties of carboxymethylcellulose-encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Pest Science.* **45**: 351-355.
- Crickmore N., Zeigler D., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D. *et al.* (1998). Revision of the nomenclature for the pesticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.
- Crickmore N., Zeigler D., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., *et al.* (2008). *Bacillus thuringiensis* toxin database. Documento en línea disponible en: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.htm. [Consultado: 2009, Junio 01]
- Dahl C., Sahlen C., Grawe J., Johanison A. & Ammeus H. (1993). Differential particle uptake by larvae of three mosquito species (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **30**: 537-543.
- Delgado N. (2005). Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. *Entomotropica.* **20**: 213-233.
- EPA (Environmental Protection Agency) (2008). Pesticide Reregistration eligibility decision (RED): *Bacillus thuringiensis*. Documento disponible en línea en: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0247.pdf>. [Consultado: 2008, Diciembre, 01]
- Federici B. A., Park H. W., Bideshi D. K., Wirt M. C., & Johnson J. J. (2003). Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Exp. Biol.* **206**: 3877-3885.
- Feitelson J. S., Payne J., & Kim L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Nat. Biotech.* **10**: 271-275.
- Gazit E., La Rocca P., Samson M. S. & Shai Y. (1998). The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12289-12294.
- Georghiou G. P. & Wirth M. C. (1997). Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1095-1101.
- Gerber D. & Shai Y. (2000). Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**: 23602-23607.
- Goldberg L. J. & Margalit J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News.* **37**: 355-358.
- Hofmann C., Vanderbruggen H., Hofte H., Van Rie J., Jansens S. & Van Mellaert H. (1998). Specificity

- of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 7844-7848.
- Hofte H. & Whiteley H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
- Huang D. F., Zhang J., Song F. S. & Lang Z. H. (2007). Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China. *J. Inver. Pathol.* **95**: 175-180.
- Ichimatsu T., Mizuki E., Nishimura K., Akao T., Saitoh H., Higuchi K. *et al.* (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Curr. Microbiol.* **40**: 217-220.
- Iriarte J., Porcar M., Lecadet M. M. & Caballero P. (2000). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain, *Curr. Microbiol.* **40**: 402-408.
- Ishiwata S. (1902). Su le bacilli appellé, "sitto". *Bull. Assoc. Sericulture Japan.* **114**: 1-5
- Jackson J. K., Horwitz R. J. & Sweeney B. W. (2002). Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* on Black Flies and nontarget macroinvertebrates and fish in a large river. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **131**: 910-930.
- Kalman S., Kiehne K., Cooper N., Reynoso M. & Yamamoto T. (1995). Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3063-3068.
- Koskella J. & Stotzky G. (1997). Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3561-3568.
- Lecadet M. (1970). *Bacillus thuringiensis* toxins: The proteinaceous crystal. pp. 437-71. En: *Microbial toxins*. Monti T, S. Kadus S, Aji S (eds) (vol. 5), Academic Press (New York), U.S.A.
- Lee L., Saxena D. & Stotzky G. (2003). Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4111-4115.
- Lee Y. W. & Zairi J. (2005). Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Trop. Biomed.* **22**: 5-10.
- Lima J. B. P., De Melo N. V. & Valle D. (2005). Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **47**: 125-130.
- Minnich S. A. & Aronson A. I (1984). Regulation of protoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **158**: 447-454.
- Neppl C. (2000). Management of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, The Environmental Studies Program Education- University of Chicago (Chicago, U.S.A.).
- Osborn F. R., Herrera M. J., Gómez C. J. & Salazar A. (2007). Comparison of two commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) at three salt concentrations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **102**: 69-72.
- PAHO (Pan American Health Organization) (2009). Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion). Washington, D.C. Documento disponible en línea en: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2008.htm> [Consultado: 2009, Junio 01]
- Pérez C., Fernández L. E., Sun J., Folch J. L., Gill S. S., Soberón M., *et al.* (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 18303-18308.
- Pigott C. R. & Ellar D. J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 255-281.
- Prabakaran G. & Hoti S. L. (2008). Immobilization of Alginate-Encapsulated *Bacillus thuringiensis*

- var. *israelensis* Containing Different Multivalent Counter Ions for Mosquito Control. *Curr. Microbiol.* **57**: 111–114
- Putzai M., Fast P., Gringorten L., Kaplan H. & Lessard T. (1991). The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem J.* **273**: 43–47.
- Ragaei M. (1999). Radiation protection of microbial pesticides. *J. Appl. Entomol.* **123**: 381–384.
- Ramírez-Suero M., Robles-Olvera V. & Ramírez-Lepe M. (2005). Spray-dried *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* formulations for control of *Aedes Aegypti* larvae. *J. Econ. Entomol.* **98**: 1494–1498.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J. *et al.* (1998) *Bt* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 775–806.
- Sedlak M., Walter T. & Aronson A. (2000). Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *J. Bacteriol.* **182**: 734–741.
- Singh A., Boora K. S. & Chaudhary K. (2007). Effect of different additives on the persistence and insecticidal activity of native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Indian J. Microbiol.* **47**: 42–45.
- Soares R. J., Ferreira Regazzi A. C., Oliveira Lima J. W. & Sansígolo Kerr-Pontes L. R. (2005). Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 316–321.
- Stevens M. M., Akhurst R. J., Clifton M. A. & Hughes P. A. (2004). Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). *J. Inver. Pathol.* **86**: 104–110.
- Thorne L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes M., Wild M., *et al.* (1986). Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. “*kurstaki*” and “*israelensis*”. *J. Bacteriol.* **166**: 801–811.
- Tyrell D. J., Davidson L. I., Bulla L. A. & Ramoska W. A. (1979). Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes, *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 656–658.
- Vilas-Bôas G. T., Vilas-Bôas L. A., Braz V. T., Saridakis H. O., Santos C. A. & Arantes O. M. N. (2005). Isolation and partial characterization of a mutant of *Bacillus thuringiensis* producing melanin. *Braz. J. Microbiol.* **36**: 271–274.
- WHO (World Health Organization) (2009). Dengue/ Dengue Hemorrhagic Fever. Documento disponible en línea en: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html> [Consultado: 2009, Junio 01]
- Wirth M. C., Delécluse A. & Walton W. E. (2001). Lack of Cross-Resistance to Cry19A from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1956–1958.
- Wirth M. C., Park H. W., Walton W. E. & Federici B. A. (2005). Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 185–189.
- Zhao J., Cao J., Li Y., Collins H., Roush R., Earle E., *et al.* (2003). Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat. Biotechnol.* **21**: 1493–1497.
- Zhu C., Ruan L., Peng D., Yu Z. & Sun M. (2006). Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**: 109–114.

Recibido el 09/03/2009
Aceptado el 09/10/2009