



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EFFECTIVIDAD DE BIOINSECTICIDAS COMERCIALES A BASE DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SOBRE LARVAS DE *Aedes aegypti* Y *Culex quiquefasciatus*

T E S I S

PRESENTADA POR

ARIEL WILBERT GUZMAN FRANCO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO



1994.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.

A todos los profesores de la carrera de Biología.

Al Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados.

Expreso mis más sincera y profunda gratitud a la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por haber dirigido este trabajo, por su comprensión, apoyo y sobre todo por haber tenido confianza en mí.

Al Biol. Joel Lara Reyna, por haber compartido sus conocimientos conmigo, por su confianza y su amistad.

Al M. en C. Jorge Valdez Carrasco, por su paciencia, ayuda desinteresada y sobre todo por su amistad.

DEDICATORIA

Mi eterna gratitud y admiración a los seres que me dieron TODO sin pedir nada a cambio, a los seres que me dieron la vida.

Mis Padres:

Fidel Guzmán Quispe

Antonieta Franco Villegas

A mis hermanas:

Isbelia Sandra

Risa Haymé

Porque quizá sin saberlo me enseñaron a seguir adelante, y sobre todo por el gran cariño que nos une.

A toda mi familia que aún encontrándose tan lejos, en mi natal **Bolivia**, los llevo siempre conmigo.

A Mayte:
Todo mi amor

INDICE

Página

INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. <i>Bacillusthuringiensis</i>	4
2.1.1. Historia	4
2.1.2. Caracterización de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.1.3. Cristales producidos por <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.1.4. Toxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.1.4.1. Alfa-Exotoxina	7
2.1.4.2. Beta-Exotoxina	7
2.1.4.3. Delta-Endotoxina	8
2.1.5. Estructura de la Delta-Endotoxina	8
2.1.5.1. Estructura Primaria	8
2.1.5.2. Estructura Secundaria	11
2.1.5.3. Estructura Terciaria	11
2.1.6. Activación y modo de acción de la Delta-Endotoxina	12
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	14
2.2.1. Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	14
2.2.2. Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	15
2.2.3. Rango de hospederos	15
2.2.4. Histopatología	16

2.2.5. Patogenicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i> en vertebrados.....	17
2.3. Bioensayo	18
2.3.1. Concentración Letal Media (CL ₅₀)	19
3. MATERIAL Y METODOS	21
3.1. Ubicación y Condiciones del trabajo	21
3.2. Poblaciones	21
3.3. Productos utilizados	21
3.4. Procedimiento de bioensayo	22
3.4.1. Manejo de los mosquitos	22
3.4.2. Preparación de las suspensiones	22
3.4.3. Exposición al tóxico	23
3.4.4. Análisis estadístico	23
3.5. Histopatología	24
3.6. Morfología del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Susceptibilidad a los bioinsecticidas en las colonias de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	26
4.2. Susceptibilidad de <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> al bioinsecticida Vectobac.....	26
4.3. Susceptibilidad de <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> al bioinsecticida Teknar.....	35
4.4. Comparación de la susceptibilidad de <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> a dos insecticidas microbianos y una formulación Estandar	38
4.5. Histopatología	48
4.6. Morfología del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	49
5. DISCUSION	53
5.1. Determinación de la Respuesta Biológica	53
5.2. Determinación de la Concentración Letal Media	53
5.3. Histopatología	64

5.4. Morfología del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	65
6. CONCLUSIONES	69
LITERATURA CONSULTADA	71
APENDICE	76

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Espectro de resistencia de algunos dípteros de importancia médica y su distribución mundial	1
Cuadro 2. Genes Cry conocidos, hospedero y peso de la protoxina	10
Cuadro 3. Productos comerciales y Estandar de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	22
Cuadro 4. Concentraciones empleadas para la determinación de la Respuesta Biológica y su equivalencia en U.T.I./mg de cada producto.....	26
Cuadro 5. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>Aedes aegypti</i> de Ixtapa con Vectobac.....	27
Cuadro 6. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Loreto con Vectobac.....	28
Cuadro 7. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Cancún con Vectobac.....	28
Cuadro 8. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Los Cabos con Vectobac.....	29
Cuadro 9. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>Culex quinquefasciatus</i> de Cancún con Vectobac	29
Cuadro 10. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>C. quinquefasciatus</i> de Los Cabos con Vectobac.....	30
Cuadro 11. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Ixtapa con Teknar	30
Cuadro 12. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Loreto con Teknar	35
Cuadro 13. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Cancún con Teknar	36
Cuadro 14. Bioensayos realizados para estimar la CL ₅₀ de <i>A. aegypti</i> de Los Cabos con Teknar	36

Cuadro 15. Bioensayos realizados para estimar la CL_{50} de <i>C. quinquefasciatus</i> de Cancún con Teknar.....	37
Cuadro 16. Bioensayos realizados para estimar la CL_{50} de <i>C. quinquefasciatus</i> de Los Cabos con Teknar.....	37
Cuadro 17. Datos de CL_{50} promedio para cada población de <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> para Vectobac y Estandar.....	38
Cuadro 18. Datos de CL_{50} promedio para cada población de <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> para Teknar y Estandar.....	38
Cuadro 19. Datos estadísticos de las diferentes localidades de <i>A. aegypti</i> con Vectobac.....	39
Cuadro 20. Datos estadísticos de las diferentes localidades de <i>A. aegypti</i> con Teknar.....	39

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fases del proceso de esporulación y formación del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
Figura 2. Dominios de una toxina Cry.....	11
Figura 3. Reproducción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
Figura 4. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad con Vectobac en <i>Aegypti aegypti</i> de diferentes localidades	31
Figura 5. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad con Vectobac en <i>Culex quinquefasciatus</i> de diferentes localidades.....	32
Figura 6. Líneas de regresión para cuatro localidades de <i>A. aegypti</i> con Vectobac.....	33
Figura 7. Líneas de regresión para las localidades de <i>C. quinquefasciatus</i> con Vectobac.....	34
Figura 8. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad con Teknar en <i>A. aegypti</i> de cuatro localidades.....	40
Figura 9. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad con Teknar en <i>C. quinquefasciatus</i> de dos localidades.....	41
Figura 10. Líneas de regresión para las cuatro localidades de <i>A. aegypti</i>	42
Figura 11. Líneas de regresión para las dos localidades de <i>C. quinquefasciatus</i>	43
Figura 12. Comparación de líneas de regresión obtenidas con Vectobac y Estandar para <i>A. aegypti</i>	44
Figura 13. Comparación de líneas de regresión obtenidas con Vectobac y Estandar para las dos poblaciones de <i>C. quinquefasciatus</i>	45
Figura 14. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con Teknar y Estandar para las cuatro localidades de <i>A. aegypti</i>	46
Figura 15. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con Teknary Estandar para las dos localidades de <i>C. quiquefasciatus</i>	47
Figura 16. Cortes histológicos de larvas sanas y enfermas de <i>A. aegypti</i>	50
Figura 17. Cortes histológicos de larvas sanas y enfermas de <i>C. quinquefasciatus</i>	51
Figura 18. Acercamiento de esporas y cristales de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	52

Figura 19. Vista general de esporas y cristales de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	52
Figura 20. Comparación de líneas de regresión obtenidas con los dos productos microbiales comerciales en las diferentes localidades de <i>A. aegypti</i>	58
Figura 21. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con los dos productos microbiales comerciales en las dos localidades de <i>C. quinquefasciatus</i>	59
Figura 22. Límites fiduciales de las CL ₅₀ estimadas de Vectobac y Estandar para las diferentes localidades de <i>A. aegypti</i>	60
Figura 23. Límites fiduciales de las CL ₅₀ estimadas con Vectobac y Estandar para las dos localidades de <i>C. quinquefasciatus</i>	61
Figura 24. Límites fiduciales de las CL ₅₀ estimadas con Teknar y Estandar para las diferentes localidades de <i>A. aegypti</i>	62
Figura 25. Límites fiduciales de las CL ₅₀ estimadas con Teknar y Estandar para las dos localidades de <i>C. quinquefasciatus</i>	63
Figura 26. Efectos histológicos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> sobre <i>A. aegypti</i> <i>C. quinquefasciatus</i>	66
Figura 27. Ruptura de pared intestinal en <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i>	67
Figura 28. Acercamiento de las microvellosidades de intestino medio en larvas de <i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i>	68

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la susceptibilidad de *Aedes aegypti* de Los Cabos, Cancún, Loreto e Ixtapa y *Culex quinquefasciatus* de Los Cabos y Cancún a dos productos comerciales (Vectobac y Teknar) formulados a base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. La susceptibilidad se determinó por medio de bioensayos para obtener la CL_{50} , cuyos resultados se compararon con los obtenidos con un producto Estandar (HD-968-S-1983). Por medio de la técnica histológica también se determinaron los daños causados por esta bacteria a nivel intestinal, y a través de micrografías de Microscopio Electrónico de Barrido, se observó la morfología del cristal parasporal de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. En el caso de Vectobac, para *A. aegypti* se obtuvieron los siguientes resultados (CL_{50}), 0.000104, 0.000124, 0.00013 y 0.000076 UTI/mg para Ixtapa, Loreto, Cancún y Los Cabos respectivamente y en el caso de *C. quinquefasciatus* 0.00011 y 0.000077 UTI/mg para Cancún y Los Cabos respectivamente. Las poblaciones de Los Cabos tanto de *A. aegypti* como de *C. quinquefasciatus* resultaron ser las más susceptibles. Con el producto Teknar la CL_{50} obtenida para las poblaciones de *A. aegypti* fueron 0.000081, 0.000060, 0.000107 y 0.000078 UTI/mg para Ixtapa, Loreto, Cancún y Los Cabos respectivamente y para *C. quinquefasciatus* fueron 0.000055 y 0.000097 UTI/mg para Cancún y Los Cabos respectivamente, resultando la población de Loreto como la más susceptible para *A. aegypti* y Cancún para *C. quinquefasciatus*. Teknar resultó ser más agresivo que Vectobac y a su vez ambos productos resultaron ser mucho más agresivos que el producto Estandar. Los daños histológicos ocasionados en *A. aegypti* fueron alargamiento y deformación de las células epiteliales intestinales, desprendimiento de estas células de la membrana basal, aparición de cisternas o cavidades intracelulares, daños en la membrana peritrófica, desintegración de las microvellosidades y una lisis celular, en el caso de *C. quinquefasciatus*, se observó hipersecreción de las células epiteliales intestinales, separación de las mismas de la membrana basal, desintegración de la membrana peritrófica y microvellosidades y lisis celular. El cristal parasporal de *B. thuringiensis* var. *israelensis* es de forma esférica con un tamaño aproximado de 850 a 1300 nm de diámetro. Se concluyó que los productos Vectobac y Teknar a base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* presentan un alto potencial como insecticidas microbianos, y su consideración para ser utilizadas en un programa de manejo de enfermedades transmitidas por vectores.

1. INTRODUCCION

El 90% de los casos de malaria, fiebre amarilla, dengue, trypanosomiasis y filariasis en el mundo ocurre en los trópicos, que ocupa un cuarto de la superficie total de la tierra (Rawlings, 1989). Estas enfermedades son transmitidas por vectores, siendo en este caso los mosquitos, de la familia Culicidae, Diptera, el grupo más prominente de las numerosas clases de artrópodos hematófagos que perturban al hombre, otros mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios en los cuales también actúan como transmisores de patógenos (Harwood y James, 1979).

En este grupo sobresalen *Aedes aegypti* transmisor de fiebre amarilla, dengue y filariasis y *Culex quinquefasciatus*, que transmite encefalitis y filariasis, estas dos especies también son importantes, por su amplia distribución a nivel mundial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos del espectro de resistencia en algunos dípteros de importancia médica así como su distribución mundial. Tomado de Rawlings (1989).

Especie	Enfermedad	Distribución	Espectro de resistencia
<i>Anopheles albimanus</i>	Malaria	América Central	DDT, OPs, OCs
<i>A. culicifacies</i>	Malaria	Asia del Este y Sur	DDT, OPs, OCs
<i>A. gambiae</i>	Malaria	África	DDT
<i>A. maculipennis</i>	Malaria	Europa, Asia	DDT, OPs, OCs
<i>Aedes aegypti</i>	Dengue, Fiebre amarilla, Filariasis	Todas las zonas tropicales del mundo	DDT, OPs
<i>Aedes albopictus</i>	Dengue	Asia	DDT, OPs
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Filariasis, etc	Trópicos y otras áreas	DDT, OPs, OCs

OPs=Organofosforados

OCs=Organoclorados

Dada su importancia, se ha despertado el interés en buscar métodos efectivos de control. En los últimos 40 años la utilización de insecticidas químicos ha sido la solución más simple y

económica por su rápida acción (Margalit y Dean, 1985); sin embargo, con la aparición de resistencia de muchas especies de mosquitos (Tabla 1) , así como el negativo impacto ambiental y el alto costo de ciertos componentes químicos hacen necesario revisar la situación del control biológico de estos vectores (Rawlings, 1989). Por esta razón se ha incrementado el interés en los enemigos naturales, haciendo evidente la necesidad de un agente de control que tenga características similares a un insecticida químico.

Entre los patógenos o agentes de control biológico de vectores se puede mencionar a las bacterias *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus sphaericus*, al nemátodo *Romanomermis culicivorax*, los hongos *Culicinomyces sp.*, *Coelomomyces sp.*, *Lagenidium giganteum*, *Leptolegnia sp.* y *Metharrizium anisopliae* . Los estudios realizados desde su hallazgo demuestran, que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* constituye el candidato idóneo para ser utilizado como agente de control biológico.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, y debido a que la mayoría de los productos biológicos comerciales más conocidos para el control de mosquitos están formulados en base a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, en la presente investigación se decidió evaluar y conocer la actividad de dichos productos, y de esta manera aportar información que ayude a su utilización a futuro en México.

Objetivo General:

Evaluar la efectividad de dos productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) var. *israelensis* (Teknar y Vectobac) sobre larvas de mosquitos, y determinar su potencial como bioinsecticida en el control de vectores.

Objetivos específicos:

Determinar las concentraciones letales medias (CL50) para las dos especies procedentes de las localidades; Los Cabos, Cancún, Loreto e Ixtapa para *Aedes aegypti* y Los Cabos y Cancún para *Culex quinquefasciatus*.

Comparar la toxicidad de los dos productos comerciales contra el Estandar de *B. thuringiensis* var. *israelensis* HD-968-S-1983.

Observar los daños histológicos ocasionados por *B. thuringiensis* var. *israelensis* en larvas de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. *Bacillus thuringiensis*

2.1.1. Historia

La bacteria *Bacillus thuringiensis* fue descubierta por el biólogo japonés S. Ishiwata en 1901, como el agente causal de la enfermedad sotto en gusano de seda, denominándolo *Bacillus sotto*. En 1911 E. Berliner introduce el nombre de *Bacillus thuringiensis* para describir a la bacteria patogénica encontrada en pupas de *Ephestia khehniella* y otras larvas no identificadas en granos almacenados en la ciudad de Thuringia (Alemania del este) (Lambert y Peferoen, 1992). A principios de este siglo, *Bacillus thuringiensis* fue considerada como un patógeno, que amenazaba a la industria de la seda, tomó décadas antes de que su potencial como bioinsecticida fuera considerado. En 1928, un proyecto pionero fue iniciado en Europa, con preparaciones espора-cristal, producido a baja escala contra el barrenador del maíz europeo *Ostrinia nubilalis*, no fue hasta 1938 en Francia en que apareció el primer producto comercial de *B. thuringiensis* bajo el nombre de Sporeina. Este producto contenía esporas de *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico para *Anagasta kuhniella* (Heimpel y Steinhaus, 1963). Durante los años 60 muchas formulaciones de *B. thuringiensis* fueron manufacturados en Estados Unidos, Ex-Union Sovietica, Francia y Alemania (Dulmage, 1970). Un mayor avance ocurrió cuando Dulmage y Beegle hicieron la primera colección de cepas de *B. thuringiensis* (Dulmage, 1970).

Para finales de 1970, los laboratorios Abbot y Zandoz Inc. en Estados Unidos desarrollaron varias formulaciones utilizando un limitado número de cepas, ya que hasta 1970 se conocían cepas activas únicamente contra lepidópteros. En 1977 Goldberg y Margalit aislaron a partir de larvas muertas y moribundas de *Culex pipiens* encontradas en forma epizootica en un depósito pequeño en el desierto de Najev, Israel, la cepa de *B. thuringiensis* que actualmente conocemos como var. *israelensis*, que se encontró altamente tóxica para mosquitos y jejenes, (Margalit y Dean, 1985). Con este hallazgo se estimuló la búsqueda de nuevas cepas con toxicidad para otros grupos de insectos. Así en 1983, Krieg *et al.* (1983) aislaron en Alemania a partir de *Tenebrio molitor*, una nueva cepa con toxicidad hacia coleópteros, denominándola

Bacillus thuringiensis var. *tenebrionis*. Dicha cepa resultó altamente tóxica para *Agelastica alni* y *Leptinotarsa decemlineata* (Lambert y Peferoen, 1992).

Actualmente las ventas de insecticidas se estiman en 600 millones de dólares, de los cuales 100 millones corresponden a ventas de *Bacillus thuringiensis* (Lambert y Peferoen, 1992).

2.1.2. Caracterización de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis constituye una especie distinta e independiente de otros bacilos, como *B. cereus* (Frankland y Frankland) y *B. anthracis* (Cohn) de los cuales se distingue principalmente por la producción de una toxina durante la esporulación; esta es tóxica para larvas de lepidópteros, dípteros o coleópteros (Beegle y Yamamoto, 1992).

Existen actualmente miles de aislamientos de bacterias formadoras de cuerpos parasporales, por lo que surge la necesidad de tener parámetros que ayuden a diferenciar y caracterizar las cepas. Una de las primeras formas de caracterización de *B. thuringiensis* fue determinar la amplitud de rango de hospederos, esto aunado a la morfología del cristal permitió diferenciar las cepas en base a su toxicidad, y con la ayuda de microscopía electrónica de barrido y de transmisión se han distinguido diferentes formas de cristales (López, 1993). Otro de los métodos más usados es el de antígeno H o serotipificación flagelar, desde que se introdujo en 1963 por De Barjac y Bonnefoi; la serotipificación a ordenado el grupo de *B. thuringiensis* basada únicamente en el H antígeno y ha contribuido a la identificación de *Bacillus* por mas de 25 años (Navon, 1993). De acuerdo con esta clasificación existen 34 serotipos de los cuales 22 son activos contra lepidópteros; el serovar 14 *israelensis*; 4a, 4c, *kenyae*; 7, *aisawai*; 8a, 8b, *morrisoni*; 9, *tolworthi* y 11a, 11c, *kyushuensis* son activas contra dípteros resaltando el primer serovar por su actividad tóxica (Navon, 1993). Otra de las herramientas más utilizadas ha sido la caracterización bioquímica, como por ejemplo el patrón de esterases (Luthy *et al.*, 1982), y actualmente la forma mas común, es por medio del patrón de polipéptidos presentes en el cristal (Hofte Y Whiteley, 1989). Por su parte De Barjac y Frachon (1990) mencionan que caracterizar una cepa por medio de reacciones bioquímicas es sólo una herramienta y no una característica

distintiva. Finalmente la caracterización genética, se basa en los plásmidos de *B. thuringiensis* y este tipo de caracterización es importante, ya que cada cepa presenta un patrón único en su acomodo de los plásmidos (López, 1993).

2.1.3. Cristales producidos por *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis presenta tres formas básicas de cristales; cristal bipiramidal, cristal amorfo y cristal aplanado.

El cristal bipiramidal es la forma más común en *Bacillus thuringiensis*, está presente en la mayoría de las subespecies; su tamaño varía de 1 a 1.5 μm , se encuentra fuera de la espora y su formación se da en las fases 2 y 3 de la esporulación (Figura 1). Está conformado por una protoxina de 130 a 140 kd (1 dalton=1g/mol), presenta una alta toxicidad contra insectos del orden Lepidoptera (Aronson *et al.*, 1986). Este cristal, al ser ingerido por el insecto es disuelto por la acción del pH alcalino y las proteasas intestinales, sufriendo un procesamiento proteolítico, lo que da lugar a una proteína tóxica de 60.70 kd, conocido como delta-endotoxina (Margalit y Dean, 1985). Este cristal constituye el denominado Patotipo I.

El cristal amorfo posee una forma semiesférica, tiene cuatro proteínas localizadas en tres tipos de inclusiones, los pesos moleculares de estas proteínas son de 27, 65, 128 y 135 kd (Ibarra y Federici, 1986). El cristal en conjunto posee un diámetro de 0.7 μm a 1.2 μm y es característico de *B. thuringiensis* var *israelensis* (Insell y Fitz-James, 1988), su actividad es específica para mosquitos y jejenes (Patotipo II).

El último cristal o Patotipo III es de forma aplanada y cuadrada, cuyas proteínas pesan 68 kd (Gill *et al.*, 1992). Su presencia es característica de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra coleopteros como son las variedades *tenebrionis* y *san diego*.

2.1.4. Toxinas Producidas por *Bacillus thuringiensis*

2.1.4.1. Alfa-Exotoxina

La alfa-exotoxina es una toxina termolábil y estable a un pH cuyo rango va de 3.5 a 9, aparece en la fase logarítmica de crecimiento y su mayor actividad es observada a las 10 h de cultivo (Faust y Bulla, 1982). Es altamente tóxica a ciertos insectos por medio de inoculación oral e intrahemocélica, causando degeneración y lisis de hemocitos (Krieg, 1971), esta toxina es destruida por la tripsina, urea y un pH arriba de 10 ó menores a 3, características que la diferencian de la fosfolipasa C, y no como Heimpel había propuesto, considerando a ambas como la misma toxina, y el hecho que bacterias que no producen fosfolipasa C produzcan alfa-exotoxina apoya más este hecho (Lysenko., 1974). Algunas subespecies de *B. thuringiensis* producen esta enzima (fosfolipasa C) pero también es producida por otras bacterias como son *Pseudomonas chlororaphis* y *Clostridium perfringens*, el peso molecular de la enzima varía con las diferentes especies.

2.1.4.2. Beta-Exotoxina

La beta-exotoxina es un nucleótido de adenina, el cual inhibe la síntesis de RNA polimerasa en insectos y otros animales (Aronson *et al.* 1986), posee un peso molecular de 701 daltons, y su acción es debida a la competencia que establece con el ATP por el sitio de union de la enzima (RNA polimerasa), resultado de la similitud existente en la estructura tridimensional de las dos moléculas (Sebesta *et al.*, 1981). Como consecuencia de esto se observa prevención de la pupación en dípteros y a su vez efectos teratológicos como son anomalías en antenas, alas, apéndices o estructuras bucales, y los adultos afectados son infértiles o poseen una reducida fecundidad y longevidad (Tanada y Kaya, 1993).

Esta exotoxina fue detectada por primera vez en 1959 por McConnell y Richards en cultivos de *B. thuringiensis*, la cual poseía características de termoestabilidad. Posteriormente en 1960 esta misma toxina fue detectada por Burgerjon y De Barjac, observando que mataba insectos que la habían ingerido (Tanada y Kaya, 1993), por otro lado también se comprobó que su efecto puede ser tanto por inyección como por vía oral (Sebesta *et al.*, 1981).

La beta-exotoxina ha sido denominada de varias formas, toxina termoestable, toxina estable al calor, factor mosca, factor toxina, turingiensina, etc., siendo este último, el nombre más usado. La beta-exotoxina es formada durante la fase vegetativa de la bacteria y secretada al medio (Sebesta *et al.*, 1981). La detección de esta toxina es realizada tradicionalmente por medio de bioensayos en *Musca domestica* debido a la alta susceptibilidad presentada por este insecto (López, 1993). Por otro lado, se han desarrollado métodos microbiológicos y bioquímicos para su detección, el primero está basado en la inhibición de la RNA polimerasa bacteriana, siendo mucho más precisa que las anteriores (Tanada y Kaya, 1993). Como resultado de su toxicidad a algunos vertebrados es excluido de todas las cepa usadas para producción comercial (Aronson *et al.*, 1986).

2.1.4.3. Delta-Endotoxina

Bacillus thuringiensis produce dentro de su fase vegetativa uno o más cuerpos parasporales o cristales proteicos. La delta-endotoxina, es una toxina producida en estos cristales proteicos.

El cristal proteico es desnaturalizado por el calor (Cooksey, 1971), insoluble en agua y solventes orgánicos, pero es soluble en sustancias altamente alcalinas (arriba de 12) (Tanada y Kaya, 1993). Este cristal es formado durante la esporulación, dicho proceso se da a lo largo de siete fases (Figura 1) el cristal es detectado durante la fase tres temprana y alcanza su totalidad en la última fase (Bechtel y Bulla, 1976), su formación coincide con el de la espora, y cuando la pared de la célula es lisada, espora madura y cristal son liberados (Tanada y Kaya, 1993).

2.1.5. Estructura de la Delta-Endotoxina

2.1.5.1. Estructura Primaria

La estructura primaria de la delta-endotoxina está representada por los genes que codifican para esta, de las cuales hasta 1989 se tenían 14 distintos genes, estos están clasificados por su estructura, es decir su secuencia de ADN, así como su rango de hospederos (Hofte y Whiteley, 1989). De estos 14 genes 13 fueron divididos en cuatro grupos mayores con varias subclases, caracterizadas por similitudes estructurales y espectro de acción de la proteínas

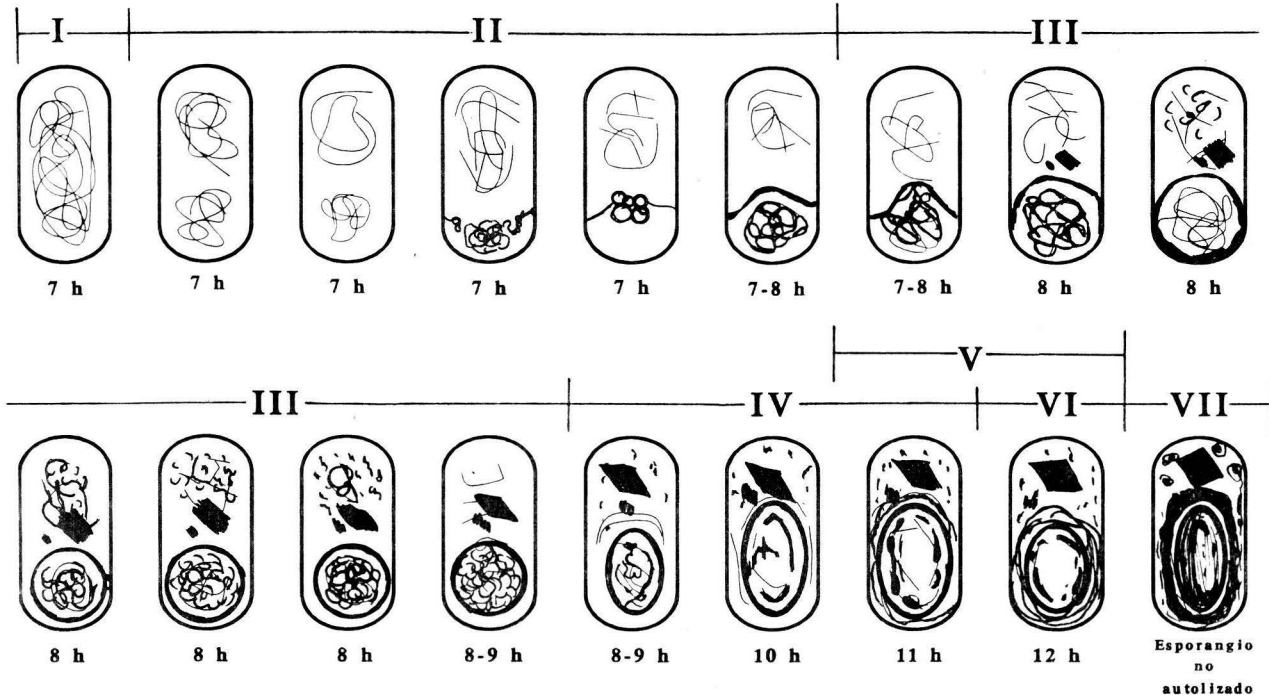


Figura 1. Fases del proceso de esporulación y formación del cristal de *Bacillus thuringiensis*.

Tomado de López, 1993.

Fases I y II, célula vegetativa.

Fases II-VII, período de esporulación o formación de la espora.

Fases III-VII, formación del cristal.

codificadas, denominándose genes Cry, siendo el primero (Cry I) específico para lepidópteros, Cry II específico para lepidópteros y dípteros, Cry III específico para coleópteros y Cry IV específico para dípteros. Un gen de *B. thuringiensis* var. *israelensis* que exhibe actividad citolítica contra una gran variedad de células de vertebrados e invertebrados, y sin relación alguna con los genes Cry, fue propuesta por Hofte y Whiteley (1989) designándola proteína Cyt A. Actualmente se conocen 17 genes Cry y dos genes Cyt, (Cuadro 2) (Adang, 1991).

Cuadro 2. Genes Cry conocidos hasta la fecha, hospedero original así como los pesos de las protoxinas de cada una de ellos. Tomado de Adang, 1991.

Proteína Cry	Hospedero	Tamaño de la Protoxina Kda	Tamaño de la toxina Kda
Cry IA (a)	Lepidoptera	133	60-70
Cry IA (b)	Lepidoptera	131	60-70
Cry IA (c)	Lepidoptera	133	60-70
Cry IB	Lepidoptera	138	60-70
Cry IC	Lepidoptera	135	60-70
Cry ID	Lepidoptera	132	60-70
Cry IE	Lepidoptera	130-135	60-70
Cry IF	Lepidoptera	130-135	60-70
Cry IIA	Lepidoptera y Diptera	71	51
Cry IIB	Lepidoptera	71	49
Cry IIIA	Coleoptera	73	55-65
Cry IIIB	Coleoptera	73	?
Cry IIIC	Coleoptera	74	?
Cry IVA	Diptera	134	65-75
Cry IVB	Diptera	128	65-75
Cry IVC	Diptera	78	58?
Cry IVD	Diptera	72	38
Cyt A	Diptera/Citolítica	27	22-25
Cyt B	Diptera/Citolítica	25, 28	23

2.1.5.2. Estructura Secundaria

La delta-endotoxina está empaquetada en inclusiones parasporales visibles al microscopio de luz (Gill *et al.*, 1992). Su estructura varía de acuerdo a la subespecie y condiciones de cultivo, muchas de estas contienen más de una proteína (Hofte y Whiteley, 1989). Estos cristales mantienen su estructura, por acción conjunta de diferentes enlaces o uniones como son puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes de disulfuro (Aronson *et al.*, 1986).

2.1.5.3. Estructura Terciaria

Una proteína Cry comprende tres dominios, el dominio I está en la terminal N y consiste de un grupo de siete alfa-hélices, el dominio II consiste de tres láminas beta-plegadas y el dominio III es un empaquetado de beta-plegadas que enmascaran a la terminal C (Fig. 2).

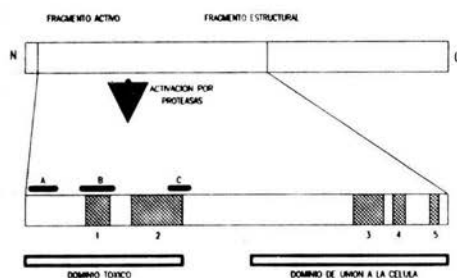


Figura 2. La Figura ilustra los dominios de una toxina Cry. La protoxina de 130 kd es dividida por proteasas, lo que resulta en la pérdida de la región terminal C. El fragmento activo está formado por la región terminal N, este fragmento tiene a l menos dos dominios, los dominios tóxico y el de unión a la célula. El dominio de unión a la célula consiste en una región variable, que puede estar involucrada con los receptores de la membrana, y un región conservada de terminal C que puede estar involucrada con los receptores o con la integridad estructural.

El dominio I forma una superhélice izquierda donde seis de la hélices anfipáticas, con sus centros hidrofóbicos hacia el centro rodean a la hélice cinco, este grupo helicoidal se cree que es responsable de la formación del poro membranar. El dominio II es una región hipervariable, la cual se considera involucrada en los receptores de membrana y por lo tanto con especificidad

(Pietrantonio *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1991). El dominio III comprende el residuo de la terminal C, una porción de este dominio está en contacto con el dominio I, por lo cual se asume que juega un papel importante en la estabilidad e integridad del cristal (Li *et al.*, 1991).

2.1.6. Activación y Modo de Acción de la Delta-Endotoxina

Las grandes protoxinas requieren de un proceso de activación (Hofte y Whiteley, 1989), este hecho esta mediado por un pH alcalino y proteasas del intestino medio del insecto. La degradación de la proteína ocurre en una serie de rompimientos, iniciándose con la ruptura de la región terminal C, y continuando hasta la región terminal N (Gill *et al.*, 1992). Se conoce poco acerca del procesamiento de las proteínas tóxicas a dípteros, pero el hecho es que al procesar la proteína de 135 kda (Cry IVA) da como resultado una toxina activa de 72 kda. La proteína Cry IVD de *B. thuringiensis* var. *israelensis* de manera similar es degradada a una proteína de 32 kda a 40 kda por proteasas no identificadas (Ibarra y Federici, 1986).

El mecanismo molecular por el cual las endotoxinas de *B. thuringiensis* causan la muerte es aún desconocido, se han formulado diferentes hipótesis acerca de su actividad. En general los estudios indican que poros transmembranales son formados o activados en las células, las cuales están asociados con el hinchamiento y lisis de las células del intestino medio (Pietrantonio *et al.*, 1993). Recientemente se ha demostrado que la toxina posee sitios de unión en las microvellosidades de éste (Gill *et al.*, 1992) y aparentemente hay una correlación entre el número de receptores y la toxicidad, es decir a mayor número de receptores mayor toxicidad (Pietrantonio *et al.*, 1993).

Basados en la estructura terciaria de la proteína, tenemos que al ser activada, esta posee tres dominios, el primero (dominio I), que se encuentra en la región terminal N, contiene siete alfa-hélices, seis de los cuales forman una hélice anfipática con sus centros hidrofóbicos hacia el centro, rodeando a la hélice cinco. Este grupo helicoidal, se considera el formador del poro; una vez unido a su receptor, hay un aparente cambio en la conformación de la toxina quedando las superficies hidrofóbicas de las hélices hacia el exterior y por lo tanto la toxina puede penetrar

la membrana celular, los pares 4 y 5 ó 6 y 7 son los posibles candidatos para iniciar la inserción a la membrana celular (Pietrantonio *et al.*, 1993); el dominio II o región hipervariable, se cree involucrada con los receptores de membrana y puede ser considerada la responsable de la especificidad de lepidópteros y dípteros (Li *et al.*, 1991). Por último el dominio III se considera que juega un papel importante en la estabilidad e integridad del cristal por estar en contacto con el dominio I y también puede estar relacionado con la especificidad de membrana, aunque en menor grado (Li *et al.*, 1991).

Por el contrario la toxinas Cyt de *B. thuringiensis* también con actividad hacia mosquitos, presentan un mecanismo diferente de interacción con la membrana (Tomas y Ellar, 1983; Knowles, 1989), la unión inicial se da a un monomero, sin embargo, bajo continua exposición, se dan agregados de toxinas de aproximadamente 300 a 400 kda. Este agregado juega un papel importante en la formación del poro (Knowles, 1989; Pietrantonio *et al.*, 1993). Las regiones hidrofóbicas de Cyt agrupadas en un paquete de alfa-hélices, facilita la inserción de la toxina en la membrana. Los poros formados son canales monovalentes selectivos de cationes, y por consecuencia la toxina Cyt aparentemente actúa de manera similar a otras toxinas (Cry), (Knowles, 1989; Pietrantonio *et al.*, 1993).

La formación de estos poros, da como resultado el rompimiento o pérdida de la regulación iónica de las células epiteliales del intestino medio; es importante mencionar que en el intestino medio de los insectos es eléctricamente positivo a ambos lados de la célula (Harvey *et al.*, 1987). Este potencial de membrana es resultado del transporte activo de iones K^+ a través de la membrana apical de las células epiteliales (Wieczorek *et al.*, citado por Pietrantonio *et al.*, 1993). Se han propuesto dos mecanismos de rompimiento de esta regulación; la primera hipótesis menciona que las toxinas incrementan la permeabilidad selectiva de K^+ preexistentes o forma nuevos canales de K^+ (Harvey, 1987); la segunda hipótesis menciona que la toxina al insertarse en la membrana forma canales no específicos de cationes y aniones (Knowles y Ellar, 1987). El modelo más aceptado y con el que se trabaja, es la formación de poros no específicos, una vez que la toxina se inserta en el plasma de la membrana, da como resultado poros no específicos

que son permeables a iones pequeños y moléculas, causando una pérdida de osmoregulación lo que conlleva al hinchamiento y finalmente a la lisis de las células.

2.2. *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*

2.2.1. Importancia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Muchas especies importantes de vectores como son los del género *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*, han desarrollado resistencia múltiple a diferentes insecticidas químicos, causando alarma especialmente en países subdesarrollados, aunado a esto la contaminación causada por estos insecticidas y el precio elevado de algunos de estos (Margalit y Dean, 1985), hicieron pensar en nuevas alternativas tales como el uso de un agente biológico con características de insecticida químico, que fuese altamente tóxico a los mosquitos, capaz de ser producido en forma masiva a nivel industrial, (Hertlein *et al.*, 1981), características que hacen a *B. thuringiensis* var *israelensis*, el candidato ideal para ser utilizado como agente de control microbiano de vectores. Este fue descubierto en 1977 por Tahori y Margalit en Israel, causando una epizootia en poblaciones de *Culex pipiens*, afectando de igual manera a pupas y adultos, quienes flotaban en la superficie. Posteriormente, la Dra. H. de Barjac, la identificó como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotipo H-14 (Margalit y Dean, 1985). Desde su primer hallazgo como patógeno ha sido sujeto a experimentación, evaluándolo contra varias especies de dípteros como son *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* (Ignoffo *et al.*, 1981; Goldberg *et al.*, 1977; Lawrence *et al.*, 1982; Tyrell *et al.*, 1981; Harshod *et al.*, 1991), resultando *B. thuringiensis* var. *israelensis* altamente tóxico para estas especies, en condiciones de laboratorio. En campo por otro lado, se han logrado buenos resultados como los obtenidos por Zaim *et al.*, (1992), donde en depósitos naturales en Israel, aplicaron un producto formulado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* con una concentración comercial de 1000 UTI/mg, y aplicando 2cc/m² donde lograron mortalidades del 93 al 96% en anofelinos y 97% en culicidos después de 24 h, también observaron que después de 48 h mantiene su actividad, los autores afirman que, con cinco días seguidos de tratamiento se evitaría la pupación. Por su parte Jones y Lloyd en 1985 evaluaron este mismo formulado en un área de 208 m² de un depósito natural, aplicando 0.9 mg/lit y obtuvieron una mortalidad del 100% en larvas del género *Aedes* después de 24 h de

exposición. Con base en lo anterior y las características anteriormente mencionadas hacen considerar a *B. thuringiensis* var. *israelensis* como uno de los agentes de control microbiano mas eficaces y de mayor uso potencial en el control de vectores.

2.2.2. Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

B. thuringiensis var. *israelensis* comúnmente se encuentra en forma natural en ambientes donde abundan los insectos. Es una bacteria gram-positiva, aeróbica en forma de varilla con flagelos peritricos, formadora de esporas subterminales, se reproduce generalmente por fisión binaria (Martin y Travers, 1989). La formación de las esporas ocurre cuando los nutrientes son escasos o el medio es adverso (Lambert y Peferoen, 1992), durante esta fase de esporulación *B. thuringiensis* produce proteínas que se cristalizan formando el cristal, el cual generalmente se localiza independiente de la spora (Martin y Travers, 1989), y son liberados al ambiente cuando las paredes de la célula se degradan al final de la esporulación, siendo este cristal, el que posee las propiedades insecticidas (Fig. 3).

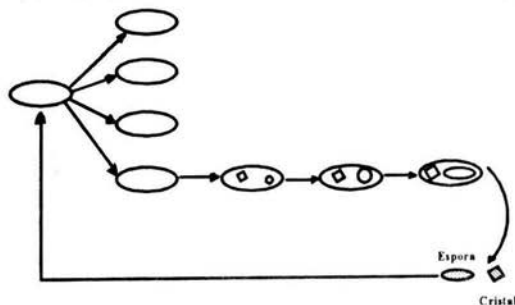


Figura 3. Reproducción de *Bacillus thuringiensis*

2.2.3. Rango de hospederos

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* ha tenido un uso extensivo, se ha evaluado en muchas especies, y presenta una alta toxicidad para casi todas las especies de mosquitos y jejenes; en forma general se reportan 21 especies de *Anopheles*, 21 de *Aedes*, 17 de *Culex*, cinco de *Culiseta*, dos de *Uratoenia* y una sola especie en cada uno de los siguientes géneros: *Psorophora*, *Mansonia*, *Amnigeres*, *Trichoproson* y *Coquillettidia* (Margalit y Dean, 1985).

Por otro lado también se probó en 22 especies de *Simulium*, como ejemplo están los trabajos realizados por Malloy *et al.*, (1986), quienes probaron *B. thuringiensis* var. *israelensis* contra *Simulium verecundum* y *S. vittatum* en diferentes estados, y encontraron que son más susceptibles los estados tempranos; Undeen *et al.* (1979) trabajaron con *S. domnosum* y *S. verecundum*, en donde obtuvieron mortalidades de hasta el 100%.

Colbo y Undeen (1980), al evaluar el efecto de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, en un río con una alta población de simúlidos, así como de otros insectos nativos, aplicaron soluciones con una concentración de 1×10^5 cel/ml, observaron que no había decremento en la mayoría de los insectos nativos, y por otro lado interesadamente, obtuvieron mortalidades de hasta un 93% en simúlidos.

2.2.4. Histopatología

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* es un patógeno que necesita ser ingerido, por lo cual al ser este un bioinsecticida estomacal, afecta principalmente al intestino medio que carece de cutícula, más específicamente la zona posterior de éste, esta zona posee abundantes microvellosidades (Lahkim *et al.*, 1983), y como consecuencia se asume que aquí ocurre la mayor absorción de la toxina. De manera general el daño se inicia cuando la bacteria es ingerida, posteriormente, las secreciones del intestino medio así como las proteasas, solubilizan el cristal, convirtiendo las protoxinas en una toxina de 65000 kd de peso (Margalit y Dean, 1985). Esta toxina produce lesiones en el epitelio del intestino medio del insecto (Cooksey, 1971) iniciándose con el hinchamiento, ruptura de las microvellosidades presentes en la superficie del epitelio intestinal, produce el agrandamiento del espacio intracelular e intercelular del epitelio, desaparición del material granular entre la membrana peritrófica y células epiteliales, una separación de las células del intestino medio de la membrana basal y una liberación de estas al lumen del intestino medio (Lahkim *et al.*, 1983; Aronson *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1992), consecuentemente una lisis celular y por último la completa desintegración del epitelio intestinal (Lahkim *et al.*, 1983).

Un aspecto importante en la actividad de *B. thuringiensis* var. *israelensis* es el tiempo de acción, ya que trabajos realizados con larvas de *Aedes aegypti* de 2do y 4to estado, indican que los primeros síntomas, como son falta de movilidad y cese de la alimentación, son registrados a los 7 minutos aproximadamente, el pico máximo de mortalidad se encuentra entre los 30 y 37 minutos (Lahkim *et al.*, 1983; Gill *et al.*, 1992), cabe mencionar que esto dependerá enteramente del estado de desarrollo de la larva, ya que generalmente, los estados tempranos son mas susceptibles, así como de la concentración de la suspensión utilizada.

2.2.5. Patogenicidad de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en vertebrados

Hasta la fecha no hay evidencia de que *B. thuringiensis* var. *israelensis* sea patógena para vertebrados ya sea por aplicación oral o topical. Sin embargo, existen algunos casos en donde se mostraron efectos patológicos al inyectarla a mamíferos, pero se debió a la presencia de la beta-exotoxina en estas cepas, toxina que como se mencionó anteriormente, es tóxica para ciertas líneas celulares tanto de vertebrados como de invertebrados (Tanada y Kaya, 1993).

En el caso de la delta-endotoxina parece ser totalmente inocua a vertebrados y a cultivos de tejidos de vertebrados normales. Siegal y Shodduck (1990), inyectaron preparaciones de las bacterias *B. thuringiensis* var. *israelensis* y *B. sphaericus* en conejos y ratones, los cuales no presentaron evidencia de enfermedad, por lo que concluyeron que ambas bacterias pueden ser usadas con seguridad en medios donde el hombre está expuesto. Por su parte Siegal *et al.*, (1987), hicieron preparaciones de *B. thuringiensis* var. *israelensis* administrándolas por vía oral y aerosol en ratas, ratones y conejos, y ninguna muerte se registró, sin embargo al administrarlo intraperitonealmente produjeron una muerte substancial (26/42), subsecuentes experimentos no mostraron los mismos resultados. *B. thuringiensis* var. *israelensis* puede persistir en el bazo del ratón durante siete semanas, pero no hay evidencia de multiplicación; el uso de *B. thuringiensis* en polvo causa irritaciones mínimas en ojos de conejos por lo que concluyen que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no es patogénico a mamíferos (Siegal *et al.*, 1987), y por lo tanto es seguro para ser utilizado en el control de vectores .

2.3. Bioensayo

Una vez comprobada la patogenicidad de un insecticida microbial en un insecto, es necesario conocer cual es la cantidad mínima necesaria para poder matar al insecto, puesto que mientras menos sea la cantidad necesaria más agresivo o virulento es el bioinsecticida. Para determinarla existe un conjunto de procedimientos que nos medirá la fuerza de un agente o estímulo mediante la respuesta de un organismo, que en este caso es la muerte.

Cuando un organismo individual es estimulado, los efectos observados pueden ser de dos tipos, gradual o cuántica. Si la respuesta es graduada un resultado cuantitativo es observado; la respuesta cuántica o respuesta de todo o nada, es clasificada a un tiempo de la estimulación, es decir, si responde o no al estímulo, siendo este un fenómeno cualitativo. Para este tipo de pruebas, a fin de que los resultados sean repetibles y científicamente interpretables, la respuesta necesita ser definida, el evaluador debe ser capaz de diagnosticar objetivamente, de tal manera que pueda evaluar uniformemente en varias ocasiones y estar de acuerdo con otros observadores; en el caso de bioinsecticidas, por ejemplo, un insecto puede ser considerado como muerto si no presenta movimientos espontáneos, o no se mueve al ser tocado.

Otro punto importante que hay que considerar, es asegurarse de que las respuestas de los diferentes miembros de un grupo sean independientes unas de otras, una posible solución es no ponerlos juntos, siendo ideal el confinamiento individual, lo cual es poco practicado. Si ocurre una respuesta dependiente una de otra, el análisis estadístico de los resultados junto con el estandar es invalidado (Hewlett y Planckett, 1979).

Un problema que con frecuencia se presenta es la mortalidad en el testigo, lo cual nos indica que existe un factor externo que causa mortalidad en los organismos del testigo y por lo tanto esta afectando a los organismos tratados, lo que representa un problema para reconocer si la mortalidad se debe al estímulo aplicado o a un factor externo, si partimos del supuesto que ambos son fisiológicamente independientes, entonces este factor externo se puede eliminar por medio de la formula de Abbot, y el resultado de esta expresión matemática nos refleja únicamente la mortalidad causada por el estímulo que uno aplicó.

$$\% \text{ Mort. Corregida} = \frac{\% \text{ Mort. Trat.} - \% \text{ Mort. Test.}}{100 - \% \text{ Mort. Test.}} \times 100$$

El tamaño de muestra a emplear es otro aspecto que no ha sido tratado con frecuencia, pero esto se rige con la premisa de que se requiere optimizar los recursos económicos y materiales. El método a emplear para el bioensayo y el tiempo de exposición dependerá del insecto y sobre su respuesta, es recomendable probar un mínimo de cinco diluciones, los cuales deberán ser seleccionadas de tal manera que la CL_{50} deberá caer en la mitad del rango.

La combinación de características del bioensayo deberán proporcionar un método capaz de detectar pequeñas variaciones en susceptibilidad, ser reproducible, fácil de realizar y requerir materiales y reactivos baratos y fáciles de conseguir (Vázquez, 1993).

2.3.1. Concentración Letal Media (CL_{50})

Los primeros intentos en caracterizar la efectividad de un estímulo en relación a una respuesta cuántica, se hacían con referencia a una dosis mínima efectiva, que se definía como aquel estímulo suficiente para matar al miembro menos resistente de la especie; sin embargo, no se tomaba en cuenta, la variación de la tolerancia de una población. Es obvio que algunas concentraciones son tan bajas que ningún sujeto respondería y otras tan altas que serían fatales para toda la población, pero existen serias dificultades para poder determinar los límites de estos rangos, básicamente por la gran variabilidad de susceptibilidad de una población. Por lo que se sugiere una característica más definida como es la Concentración Letal Media (CL_{50}), la cual resulta en una respuesta del 50 % de individuos en una población, esta puede ser estimada con mayor exactitud al experimentar con un número total de individuos. Estadísticamente es más confiable puesto que para este estimador, el intervalo de los límites fiduciales es más estrecho que el de la CL_5 o la CL_{95} , ya que mientras más estrecho sea el intervalo más preciso y confiable es el estimador (Finney, 1976).

El análisis de la relación estímulo-respuesta, es facilitado por la transformación de estos valores a valores probit (Finney, 1976), haciendo que esta relación sea representada por una línea recta, la cual facilita su análisis, pero a su vez exige el control de factores externos que en un momento dado alteran los resultados, dando lugar al establecimiento de un testigo, el cual nos afirmará que la respuesta no está siendo influenciada por factores externos (Vázquez, 1993).

Al conjunto de procedimientos estadísticos para el análisis de la relación estímulo-respuesta, se conoce con el nombre de análisis probit (Finney, 1976), que da como resultado, la ecuación de la línea de regresión, relacionando datos transformados de concentración y respuesta por medio del método de máxima verosimilitud. Por otro lado este tipo de análisis genera información importante como es el valor de X^2 y la pendiente (Vázquez, 1993); en donde la X^2 mide el ajuste de los datos al modelo lineal obtenido por la transformación probit, un valor alto (arriba de 5) indica una pobre correspondencia entre estímulo y respuesta. La pendiente es otro parámetro de importancia relevante ya que valores altos de la pendiente indican una homogeneidad en la susceptibilidad de los individuos, por el contrario, valores bajos indican que dentro de nuestra muestra hay un porcentaje alto tanto de individuos altamente susceptibles así como organismos con una menor susceptibilidad (Vázquez, 1993; López, 1993).

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Ubicación y condiciones del trabajo

El presente estudio se realizó en el Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Montecillos Edo. de Méx., como parte del proyecto "Manejo de mosquitos en desarrollos turísticos", financiado por FONATUR. La cría de mosquitos se mantuvo a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $45\% \pm 5\%$, con un fotoperiodo de 12 horas luz.

3.2. Poblaciones de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*

Los organismos empleados para los bioensayos, de las diferentes poblaciones de ambas especies se obtuvieron a partir de una cría permanente el cual se mantuvo en el área de Toxicología del Colegio de Postgraduados. Las poblaciones de *A. aegypti* con las que se trabajaron procedían de Los Cabos, Cancún, Ixtapa y Loreto, y las poblaciones de *C. quinquefasciatus* de Los Cabos y Cancún, colectas que fueron realizadas por el personal del área de Toxicología.

Se trabajo con estas especies por la importancia que representan estas en esas localidades, y en el caso de *Culex quinquefasciatus* solo se trabajó con estas dos localidades debido a que esta especie es altamente susceptible y no se pudieron establecer crías de laboratorio para los bioensayos.

3.3. Productos utilizados

Se usaron dos productos comerciales en emulsión acuosa; y un Estandar grado técnico; polvo humectable; su concentración y tipo de formulación se anotan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Productos comerciales y Estandar de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Nombre	Formulación	Compañía	Concentración
Vectobac	Emulsión	Abbot	600 UTI/mg
Teknar	Emulsión	Zandos	1504 UTI/mg
Estandar	Polvo humectable	*	4740 UTI/mg

* El producto Estandar fue obtenido con anterioridad a través del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en Brownsville, Texas.

3.4. Procedimiento de bioensayo

3.4.1. Manejo de los mosquitos

La cría masiva de los mosquitos para ambas especies se realizó primeramente colocando a los adultos en una jaula entomológica de 60x50x50 cm, ahí los adultos disponían de azúcar con pasas para los machos y la hembra se alimentaba de sangre que succionaba de pollos de aproximadamente 15 a 20 días de edad, la oviposición se realizaba en recipientes con agua los cuales se encontraban dentro de la jaula, posteriormente se colectaban los huevecillos y se colocaban en bandejas de plástico circulares de 35 cm de diámetro donde eclosionaban después de 3 a 4 días, a las larvas se les proporcionaba un alimento preparado a base de spirulina, el período larval duraba aproximadamente 15 días hasta llegar al estado de pupa donde al formarse estas se colectaban y depositaban en un recipiente con agua que se introducía en la jaula entomológica hasta la emergencia de los adultos. La cámara de cría se tuvo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo de 12 h luz.

Para las pruebas se seleccionaron larvas del 3er ínstar temprano, dicha selección se basó en el tamaño del cuerpo pero sobre todo en el de la cápsula cefálica, característica distintiva para el reconocimiento de los diferentes instares larvales.

3.4.2. Preparación de las suspensiones

Las diferentes diluciones de los bioinsecticidas se obtuvieron a partir de una solución madre, esta se preparó tomando 2 ml del insecticida microbiano, aforando con agua filtrada hasta

100 ml. Las diluciones se realizaron con un factor de dilución de 0.5, obteniéndose las soluciones al 0.0001, 0.00005, 0.000025, 0.0000125, 0.00000625 hasta 0.00000312 %, con las que se determinó el rango de mortalidad entre 0 y 100 % para cada bioinsecticida.

Se prepararon 100 ml de solución para cada concentración a utilizar. Se intercalaron concentraciones logarítmicas entre las concentraciones que produjeron 0 y 100 % de mortalidad. Se manejaron de 6 a 9 concentraciones mas el testigo. Las suspensiones fueron preparadas cada vez que se corría un bioensayo. Las diferentes concentraciones se realizaron con la ayuda de una formula (ver Apéndice, pag. 81) la cual facilitó la obtención de las mismas.

3.4.3. Exposición al tóxico

Los bioensayos fueron realizados en vasos de plástico del número cinco, en cada vaso se colocaba la cantidad de agua y solución madre necesarias para preparar 100 ml de la dilución.

Para los bioensayos, solo se utilizaron larvas de tercer ínstar. Cada vaso contenía 15 larvas, lo que constituyó una repetición; se realizaron un mínimo de tres repeticiones por concentración, que cumplieran con los criterios fijados para un buen bioensayo (Ibarra y Federici, 1987), cada repetición fue realizada en un día diferente. Se utilizó un testigo para cada serie de concentraciones de un bioinsecticida por día, al cual solo se le aplicó agua. La mortalidad se registró a las 24 h, se consideró como muerto aquella larva que no reaccionaba cuando se le moviera con un pincel.

3.4.4. Análisis estadísticos

Los porcentajes de las diluciones se transformaron a UTI/mg de producto aplicado por vaso, para lo cual se tomó en cuenta la concentración del insecticida respectivo.

Si en el testigo se registraba una mortalidad mayor de cero, pero menor o igual al 10 % en los tratamientos se corrigió la mortalidad mediante la ecuación de Abbot (Abbot, 1925).

Los bioensayos que no cumplieran con los siguientes parámetros fijados para ser

considerados como válidos, se anularon y repitieron.

- Mortalidad natural en el testigo menor al 10%.
- Valor de la pendiente entre 1.5 y 6.
- Valor de la ji-cuadrada menor de 5.
- El cociente entre los límites fiduciales superior e inferior no debe ser mayor de 2.
- Al menos 4 de los valores de mortalidad deben estar entre el 10 y 90%.
- El valor de la CL_{50} debe estar ubicado entre la segunda y quinta concentración en un total de seis concentraciones.
- Tener un mínimo de tres repeticiones que cumplan los requisitos anteriores y con un coeficiente de variación menor al 20%.

La mortalidad corregida se procesó mediante el programa PCProbit (Camacho, 1990) en el cual se obtuvieron las líneas de respuesta dosis-mortalidad con su respectiva ecuación de regresión, los valores de las CL_{50} y sus límites de confianza al 95 %.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza de un factor con las CL_{50} de las diferentes localidades de *A. aegypti* para determinar si había diferencias entre ellas (Infante, 1991) y por medio de una prueba de separación de medias (Tukey), se determinó las diferencias significativas (Martínez, 1988). En el caso de las poblaciones de *C. quinquefasciatus* se realizó una prueba de "t" de student para muestras independientes y determinar si había o no diferencia entre ambas poblaciones, esto se realizó para cada producto.

3.5. Histopatología

Para determinar el efecto de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en larvas tratadas de mosquitos se procedió a realizar cortes histológicos de larvas infectadas y sanas.

En este proceso se expusieron larvas de 3er instar a una suspensión de *B. thuringiensis*, se determinó el tiempo en que las larvas eran afectadas antes de que ocurriera la muerte, evitando así la degradación de tejidos por acción de agentes externos.

La preparación histológica de estos materiales fue realizada en el laboratorio de Morfología de Insectos del centro de Entomología y Acarología. Las larvas infectadas y sanas fueron fijadas en forma independiente en Dubosq-Brasil por 48 h, deshidratándose posteriormente en alcohol al 90,96 y 100 % por un período de 2 h cada uno, se pasaron a benceno durante 4 h, iniciando la inclusión de parafina con un cambio de 50-50 de benzol-parafina, colocándolos finalmente en parafina por 24 h. Se realizaron cortes histológicos de 7 μm de espesor que fueron teñidos con hemalumbre de mayer y eritrocina (Prado y Valdez, 1985). Se realizó una comparación microscópica sobre cortes de larvas dañadas y sanas.

3.6. Morfología del Cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

La forma del cristal de *B. thuringiensis* es una de las características de clasificación más importantes siendo la más conocida la del patotipo I, es decir el cristal de forma bipiramidal, tóxica a lepidópteros. En este trabajo, se utilizó a *B. thuringiensis* var. *israelensis* cuyo cristal pertenece al patotipo II, tóxico a dípteros, por lo cual se llevó a cabo un breve estudio acerca de su morfología por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Para este estudio se tomó una muestra de Vectobac y se sembró en agar nutritivo $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 h hasta la autólisis, posteriormente se preparó una suspensión de la bacteria sembrada en agua desionizada en aproximadamente 100 ml esta se distribuyó en 4 tubos de centrífuga y se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm en una centrífuga Internacional IEC modelo K, en este paso se logró una separación parcial de las esporas y otros materiales, la pastilla resultante se resuspendió en agua desionizada, y se procedió a darle una serie de tres lavadas por centrifugación, mediante este proceso la muestra se fue enriqueciendo con cuerpos parasporales. Finalmente una gota de la suspensión se colocó sobre un portaobjetos para MEB. Las muestras fueron puestas en una cámara de vacío con el fin de evaporar el exceso de humedad, sometiéndolas a un baño de oro en un ionizador de oro JEOL-4C durante 10 minutos. Las observaciones y micrografías se realizaron en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL-35C, con un voltaje de aceleración de 10KV. El montaje y observación de estas muestras se realizó en el área de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

4. RESULTADOS

4.1. Susceptibilidad de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* a los bioinsecticidas

Los rangos de respuesta de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* tratados con Vectobac, Estandar y Teknar (Cuadros 1, 2, 3 y 4 del apéndice) permitieron determinar el rango de concentraciones en que se tenía respuesta.

En el Cuadro 4 se indican las concentraciones porcentuales empleadas en el bioensayo y su equivalencia para los productos y el Estandar en Unidades Tóxicas Internacionales por mg (UTI/mg), unidades en las que viene especificada la concentración de cada producto comercial.

Cuadro 4. Concentraciones empleados en la determinación de la respuesta biológica y su equivalencia en UTI/mg para cada producto.

Concentración %	Vectobac UTI/mg	Teknar UTI/mg	Estandar UTI/mg
0.0001 %	0.0006	0.0015	0.599
0.00005 %	0.0003	0.00075	0.299
0.000025 %	0.00015	0.000375	0.1497
0.0000125 %	0.000075	0.000187	0.0748
0.00000625 %	0.0000375	0.0000937	0.0374
0.00000312 %	0.0000187	0.0000468	0.0187

4.2. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* al bioinsecticida Vectobac

Los resultados de los bioensayos realizados contra *A. aegypti* con Vectobac se presenta en los Cuadros 5 a 8, en cada caso se muestran el total de bioensayos realizados para cada una de las localidades de colecta así como los estadísticos utilizados en el análisis probit.

En la población de *A. aegypti* procedente de Ixtapa, se estimó una CL_{50} promedio de 0.000104 UTI/mg con un coeficiente de variación de 14.4 % y una desviación estandar de 0.000015. En el caso de la población de *A. aegypti* procedente de Loreto la CL_{50} fué de

0.000124 UTI/mg (Cuadros 5 y 6), mientras que la CL_{50} para la población de Cancún y Los Cabos correspondió a 0.00013 y 0.000076 UTI/mg respectivamente (Cuadros 7 y 8). La población de *A. aegypti* que mostró mayor susceptibilidad al producto Vectobac fué la procedente de Los Cabos, ya que requirió menor dosis para matar al 50% de la población, seguido por la población de Ixtapa, Loreto, y Cancún (Figura 4). Estas observaciones fueron corroboradas mediante un análisis de varianza, al comparar las medias se observó que la población de Cancún tiene una respuesta diferente a las poblaciones de Ixtapa y Los Cabos (Cuadro 9).

Cuadro 5. Bioensayos realizados para estimar la CL_{50} de *A. aegypti* de Ixtapa con Vectobac, valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
20-06-93 *	0.000102	0.00024	0.00009	0.000126	4.1665	4.5640
24-06-93 *	0.00012	0.00028	0.000102	0.00015	2.8955	4.4712
22-08-93 *	0.00009	0.00021	0.000072	0.000108	0.6186	4.4436
20-09-93	-	-	-	-	-	-
CL_{50} promedio = 0.000104 D.S. = .000015 C.V. = 14.4% E.R. = $Y = 25.714808 + 4.34987230 (b)$						

* Bioensayos utilizados para estimar la CL_{50}

CL_{50} = Concentración Letal Media

CL_{95} = Concentración Letal del 95%

LFI = Límite Fiducial Inferior

LFS = Límite Fiducial Superior

X^2 = Ji-Cuadrada

D.S. = Desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación

E.R. = Ecuación de regresión

- = no significativo

Cuadro 6. Bioensayos realizados con Vectobac para determinar la CL_{50} en *A. aegypti* de la localidad de Loreto. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
20-7-93 *	0.000126	0.000684	0.000084	0.000168	2.6256	2.2162
21-7-93 *	0.000126	0.00044	0.00009	0.000162	3.5060	2.9792
24-7-93 *	0.00012	0.000354	0.00009	0.00015	2.7086	3.4828
	0.000126	0.00044	0.00009	0.000162	3.5060	2.9792
29-7-93	0.00009	0.000264	0.000066	0.000114	2.4612	3.5519
CL_{50} promedio = 0.000124 D.S. = 0.0000034 C.V. = 2.7% E.R. = $Y = 18.078128 + 2.788276 (b)$						

Para las abreviaturas ver Cuadro 5

Cuadro 7. Bioensayos realizados para la obtención de la CL_{50} para *A. aegypti* de la localidad de Cancún con el producto Vectobac. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
22-8-93 *	0.000132	0.000276	0.000114	0.00015	1.2308	4.9575
22-8-93	-	-	-	-	-	-
25-8-93 *	0.000126	0.00039	0.000102	0.00015	0.9832	3.2940
26-8-93	-	-	-	-	-	-
27-9-93 *	0.000132	0.000348	0.000108	0.00015	2.0235	3.7238
CL_{50} promedio = 0.00013 D.S. = .0000034 C.V. = 2.6% E.R. = $Y = 23.69609 + 3.995297 (b)$						

Para las abreviaturas ver Cuadro 5

Cuadro 8. Bioensayos realizados para la obtención de la CL_{50} en *A. aegypti* de la localidad de Los Cabos con Vectobac. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
13-8-94	-	-	-	-	-	-
14-8-93	-	-	-	-	-	-
22-8-93 *	0.000078	0.000396	0.000054	0.000102	2.1939	2.3287
25-8-93 *	0.000078	0.000306	0.00006	0.000102	1.9406	2.7345
26-8-93 *	0.000072	0.000384	0.000054	0.000102	2.9272	2.3231
CL_{50} promedio = 0.000076 D.S. = 0.0000034 C.V. = 4.4% E.R. = 21.177295 + 3.490927 (b)						

Para ver las abreviaturas ver Cuadro 5

Cuadro 9. Análisis estadístico por medio de la prueba de separación de medias para las cuatro localidades de *A. aegypti* tratadas con Vectobac y detectar diferencias significativas

Población	CL_{50} Promedio UTI/mg	Desviación estandar	Coefficiente de Variación	D.M.S. *
Cancún	0.00013	0.0000034	2.6 %	A
Loreto	0.000124	0.0000034	2.7 %	AB
Ixtapa	0.000104	0.000015	14.4 %	B
Los Cabos	0.000076	0.0000034	4.4 %	C

D.M.S. = Diferencia Mínima significativa * = CL_{50} con la misma letra indica similitud estadística

En el caso de *Culex quinquefasciatus* los resultados obtenidos en los bioensayos (Cuadros 10 y 11) mostraron mayor susceptibilidad de la población procedente de Los Cabos (CL_{50} = 0.000072 UTI/mg) seguida por la población de Cancún (CL_{50} = 0.00011 UTI/mg).

En la Figura 5 se representan las rectas log. dosis-mortalidad de las ecuaciones de regresión obtenidas a partir de los resultados de los bioensayos para *Culex quinquefasciatus* para cada una de las localidades. La respuesta más heterogénea a Vectobac la presentó la población de Loreto en el caso de *A. aegypti* y la población de Los Cabos en el caso de *C. quinquefasciatus* (Fig. 6 y 7).

Cuadro 10. Bioensayos realizados para la determinación de la CL_{50} de *C. quinquefasciatus* de Cancún tratados con Vectobac. Valores en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
2-6-93	-	-	-	-	-	-
6-6-93	0.000132	0.000258	0.000114	0.000156	5.0	5.810
2-7-93	0.000348	0.00188	0.000234	0.000126	3.2905	2.2299
8-7-93 *	0.000126	0.000318	0.000102	0.00015	0.4252	4.04
20-7-93	0.000198	0.00045	0.000162	0.000246	4.2274	4.5399
21-7-93 *	0.000108	0.000246	0.00009	0.000126	1.5438	4.6140
26-7-93 *	0.000102	0.000216	0.000084	0.00012	0.2227	4.9247
CL_{50} promedio = 0.00011 D.S. = 0.000012 C.V. = 10.90 E.R. = $Y = 23.085305 + 3.867883 (b)$						

Para las abreviaturas ver Cuadro 5

Cuadro 11. Bioensayos realizados para la obtención de la CL_{50} de *C. quinquefasciatus* de Los Cabos tratados con Vectobac. Valores en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
8-7-93 *	0.000078	0.000504	0.00006	0.000114	3.0144	2.0598
21-7-93 *	0.00006	0.000276	0.000048	0.000084	1.1428	2.5275
26-7-93 *	0.000078	0.000426	0.00006	0.000108	0.000108	2.2745
2-6-93	-	-	-	-	-	-
6-6-93	0.000036	0.000126	0.000054	0.000048	0.000048	3.0452
CL_{50} promedio = 0.000072 D.S. = 0.000010 C.V. = 13.8% E.R. = $Y = 16.065116 + 2.253681 (b)$						

Para las abreviaturas ver Cuadro 5

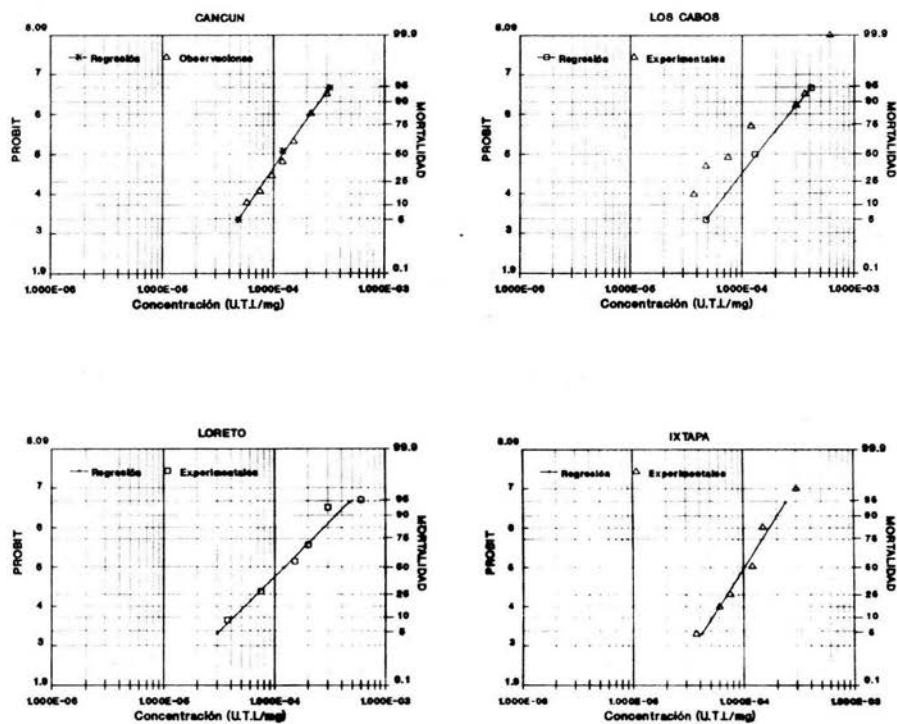


Fig. 4. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad a Vectobac en larvas de 3er instar de *Aedes aegypti*.

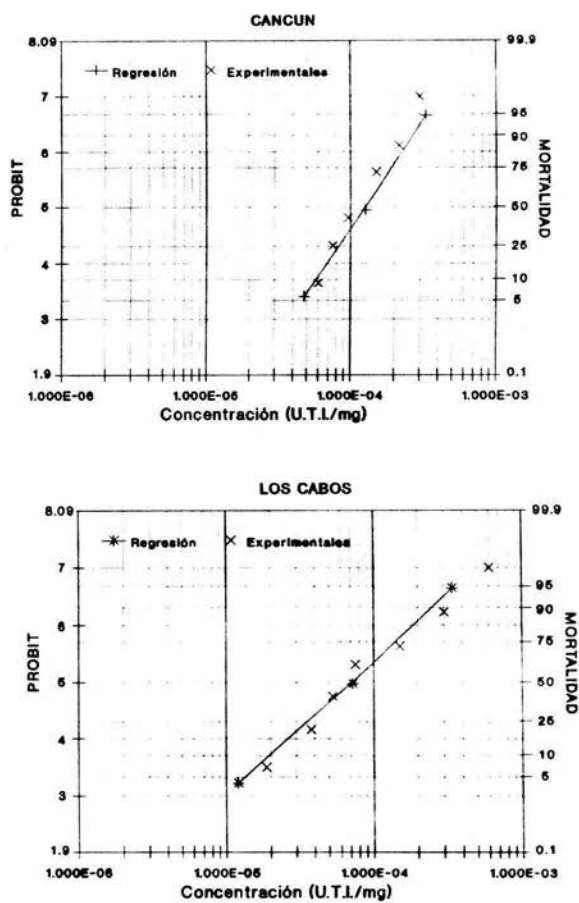


Fig. 5. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad a Vectobac en larvas de 3er instar de *Culex quiquefasciatus*

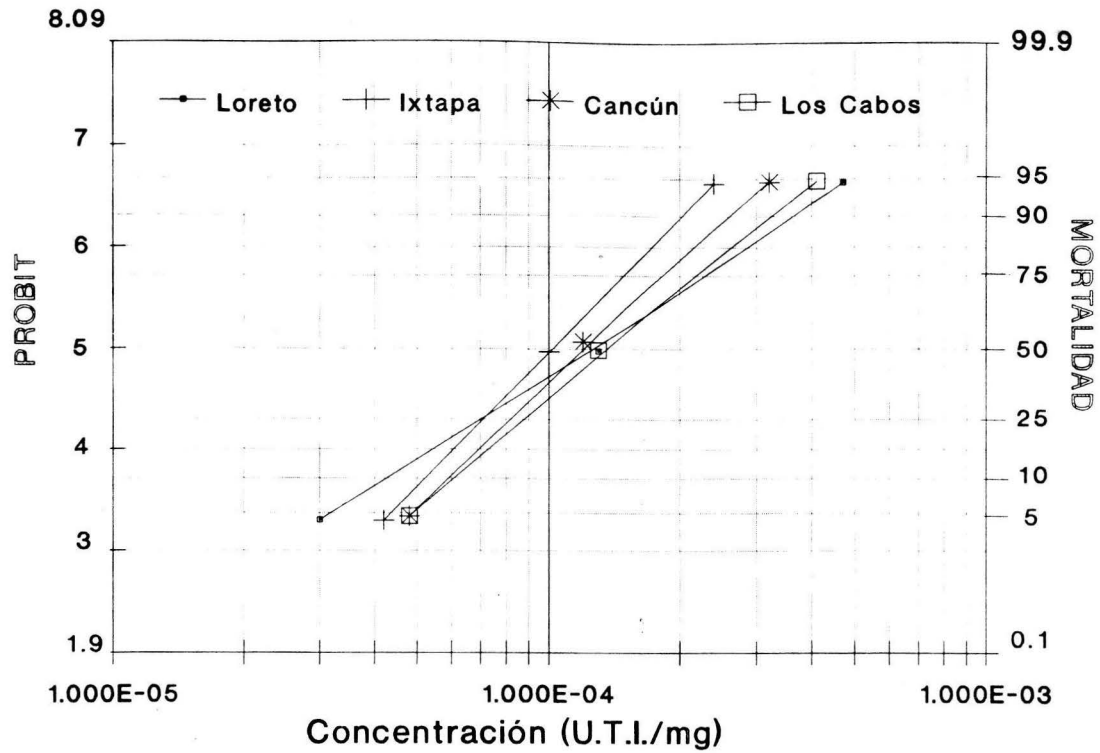


Fig. 6. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de las 4 localidades de *A. aegypti* con Vectobac.

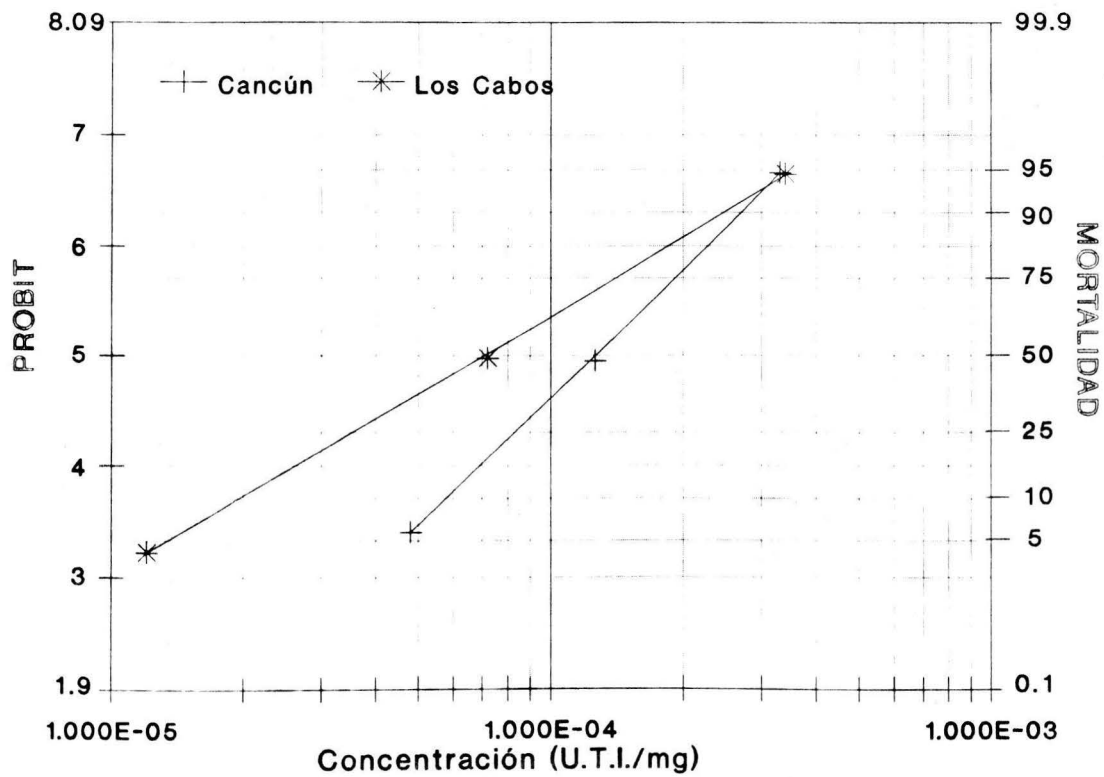


Fig. 7. Líneas de regresión para las 2 localidades de *Culex quinquefasciatus* obtenidas con Vectobac.

4.3. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* al bioinsecticida Teknar

Los bioensayos realizados con el bioinsecticida Teknar indican que tanto *A. aegypti* como *C. quinquefasciatus* fueron susceptibles a este producto, sin embargo la respuesta en las poblaciones de ambas especies de mosquitos mostraron diferencias en su respuesta (Cuadro 12 a 18). En el caso de *A. aegypti*, la población más susceptible o en que menos dosis fue requerida para matar el 50% de la población corresponde a la de Loreto (CL_{50} promedio = 0.000060 UTI/mg), seguida por la población de Ixtapa (CL_{50} = 0.000081), Los Cabos (CL_{50} = 0.000091) y Cancún (CL_{50} = 0.000107), (Figura 8). Mediante el análisis de varianza y la prueba de medias realizadas se demostró que la población de Loreto mostró diferencias significativas con respecto a la población de Cancún pero no con las otras dos poblaciones de *A. aegypti* (Cuadro 16).

En el caso de *C. quinquefasciatus* (Cuadro 17 y 18) la respuesta en los diferentes bioensayos realizados demostró que para *C. quinquefasciatus* procedente de Cancún se requirieron concentraciones menores para matar el 50% de la población (CL_{50} = 0.000055 UTI/mg) comparada con los mosquitos procedentes de Los Cabos (CL_{50} = 0.000097). De acuerdo a las líneas de respuesta dosis-mortalidad (Figura 9) la población de Cancún tuvo una respuesta más homogénea denotada por la cercanía de los puntos experimentales a las calculadas.

Cuadro 12. Bioensayos realizados con Teknar. para la obtención de la CL_{50} en *A. aegypti* para Ixtapa Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
20-7-93 *	0.000076	0.00027	0.000045	0.000091	0.9784	2.8102
26-7-93 *	0.000076	0.00021	0.000060	0.000091	1.5745	3.4179
3-8-93 *	0.000091	0.00033	0.000076	0.00010	1.9653	2.9029
7-7-93	-	-	-	-	-	-
CL_{50} promedio = 0.000081 D.S. = 0.0000086 C.V. = 10.61% E.R. = $Y = 20.849407 + 2.991408 (b)$						

Para las abreviaturas ver Cuadro 5

Cuadro 13. Bioensayos realizados para la obtención de la CL_{50} de *A. aegypti* de la población de Loreto con Teknar. Valores expresados de UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		χ^2	Pendiente
7-7-93 *	0.000076	0.00021	0.000055	0.000091	2.7966	3.8748
20-7-93 *	0.000060	0.00025	0.000045	0.000091	2.0355	2.7845
8-9-93 *	0.000045	0.000152	0.000030	0.000060	1.2420	3.0380
26-6-93	-	-	-	-	-	-
3-8-93	-	-	-	-	-	-
28-7-93	-	-	-	-	-	-
CL_{50} promedio = 0.000060 D.S. = 0.000015 C.V. = 25 % E.R. = 21.326220 + 3.033989 (b)						

Para las abreviaciones ver Cuadro 5

Cuadro 14. Bioensayos realizados para obtener la CL_{50} de *A. aegypti*, población de Cancún. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		χ^2	Pendiente
26-6-93 *	0.00010	0.00036	0.000091	0.00013	1.2358	3.1766
28-6-93 *	0.000121	0.00039	0.000091	0.00015	1.3446	3.2014
6-7-93 *	0.00010	0.00038	0.000091	0.00013	1.5110	3.0946
7-7-93	-	-	-	-	-	-
20-7-93	-	-	-	-	-	-
CL_{50} promedio = 0.000107 D.S. = 0.0000121 C.V. = 11.3 % E.R. = 21.128632 + 3.141590 (b)						

Para la abreviaciones ver cuadro 5

Cuadro 15. Bioensayos realizados para la obtención de la CL_{50} de *A. aegypti* de Los Cabos. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
26-6-93 *	0.00010	0.00056	0.000076	0.00013	0.7361	2.1961
20-7-93 *	0.000076	0.00022	0.000060	0.000091	1.1866	3.4950
3-8-93 *	0.000060	0.00022	0.000045	0.000091	0.9333	3.0947
7-7-93	0.000060	0.00015	0.000045	0.000076	15.4081	4.0506
4-8-93	-	-	-	-	-	-
3-8-93	0.000091	0.00024	0.000060	0.00010	4.8005	3.5099
CL_{50} promedio = 0.000091 S.D. = 0.000020 C.V. = 25.64 E.R. = 20.127250 + 2.860513 (b)						

Para las abreviaturas ver Cuadro 5

Cuadro 16. Análisis estadístico, Prueba de Separación de medias de Tukey para las cuatro localidades de *A. aegypti* con Teknar.

Población	CL_{50} promedio (UTI/mg)	Desviación Estandar	Coficiente de Variación	Pendiente Promedio	D.M.S *
Cancún	0.000107	0.0000121	11.3 %	3.1575	A
Ixtapa	0.000081	0.0000086	10.6 %	3.04	AB
Los Cabos	0.000078	0.000020	25.6 %	4.2788	AB
Loreto	0.000060	0.000015	25 %	3.2324	B

D.M.S. = Diferencia mínima significativa

* = CL_{50} con la misma letra, indica similitud estadística

Los valores obtenidos en los bioensayos con Teknar contra *C. quinquefasciatus* tanto para Cancún como Los Cabos presentan una CL_{50} de 0.000055 UTI/mg y 0.000097 UTI/mg respectivamente (Cuadros 17 y 18). En este caso la población de Cancún resultó más susceptible. tratados con Teknar, respectivamente, para cada una de sus localidades. La respuesta al bioinsecticida fue muy homogénea en las poblaciones de ambas especies, principalmente en el caso de *A. aegypti* en donde las poblaciones (Fig. 10) mostraron mayor pendiente que las poblaciones de *Culex. quinquefasciatus* (Fig.11)

Cuadro 17. Bioensayos realizados para la estimación de la CL_{50} de *C. quinquefasciatus*, de la localidad de Cancún con Teknar. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
20-7-93 *	0.000060	0.00031	0.000045	0.000076	1.5059	2.2051
26-7-93 *	0.000060	0.00041	0.000030	0.000076	0.9823	1.9071
3-8-93 *	0.000045	0.00027	0.000030	0.000076	1.1012	2.3097
6-8-93	0.000045	0.00041	0.00001	0.000060	0.8525	1.5886
CL_{50} promedio = 0.000055 D.S. = 0.0000086 C.V. = 15 % E.R. = 16.529180 + 2.119945 (b)						

Para las abreviaciones ver Cuadro 5

Cuadro 18. Resultados de los bioensayos realizados para la obtención de la CL_{50} de *C. quinquefasciatus* de la población de Los Cabos. Valores expresados en UTI/mg.

Fecha	CL_{50}	CL_{95}	Límites de confianza ($\alpha=0.05$)		X^2	Pendiente
20-7-93 *	0.000091	0.00047	0.000060	0.00012	1.0133	2.2889
26-7-93 *	0.00010	0.00050	0.000076	0.00015	1.8459	2.4803
3-8-93 *	0.00010	0.00050	0.000076	0.00013	2.5635	2.3819
6-8-93	0.000076	0.00077	0.000045	0.00012	0.8734	1.6759
CL_{50} promedio = 0.000097 D.S. = 0.0000051 C.V. = 5.25 % E.R. = 17.297948 + 2.372578 (b)						

Para las abreviaciones ver Cuadro 5

4.4. Comparación de la susceptibilidad de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* a dos insecticidas microbianos y una formulación Estandar

Un aspecto importante al medir la virulencia de un bioinsecticida es compararlo con un parametro estable; en el caso de *Bacillus thuringiensis* se utilizan Estandares o productos en donde se ha demostrado su toxicidad y que al probarse en forma simultánea con los productos experimentales, con la misma población de insectos permiten inferir el comportamiento en cuanto a virulencia de los productos comerciales. De esta manera al comparar la CL_{50} de los mosquitos tratados con Vectobac (Figura 12 y 13) observamos que estos valores fueron menores que los obtenidos con el Estandar (Cuadro 19). De igual manera las poblaciones de *A. aegypti*

y *C. quinquefasciatus* tratadas con Teknar mostraron ser más susceptibles al producto comercial que al Estandar (Cuadro 20), la línea de regresión de este producto cae del lado derecho indicando que sus CL_{50} fueron más altas que las observadas con los productos comerciales (Figura 14 y 15).

Cuadro 19. Comparación de la CL_{50} (UTI/mg) promedio para cada población de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* tratadas con Vectobac y el Estandar.

<i>Aedes aegypti</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>		
Población	Vectobac	Estandar	Población	Vectobac	Estandar
Ixtapa	0.000104	0.091	Cancún	0.00011	0.045
Loreto	0.000124	0.085	Los Cabos	0.000072	0.063
Cancún	0.00013	0.103			
Los Cabos	0.000076	0.0673			

Cuadro 20. Comparación de la CL_{50} (UTI/mg) promedio para cada población de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* tratadas con Teknar así como con el producto Estandar.

<i>Aedes aegypti</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>		
Población	Teknar	Estandar	Población	Teknar	Estandar
Ixtapa	0.000081	0.0779	Cancún	0.000055	0.044
Loreto	0.000060	0.085	Los Cabos	0.000047	0.061
Cancún	0.000107	0.103			
Los Cabos	0.000078	0.077			

La posición de las líneas de regresión que en este caso señalan los valores significativos para la CL_5 , CL_{50} y CL_{95} reflejan la agresividad del producto, esto nos sirve para fines de comparación tanto de comportamiento como de susceptibilidad de las poblaciones hacia los productos probados. En las Figuras 10 y 11, se presentan las líneas de regresión para las diferentes localidades tanto de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* obtenidos con Teknar, en ellas se puede observar que la respuesta de *A. aegypti* fué mas uniforme y homogénea, que en *Culex quinquefasciatus*.

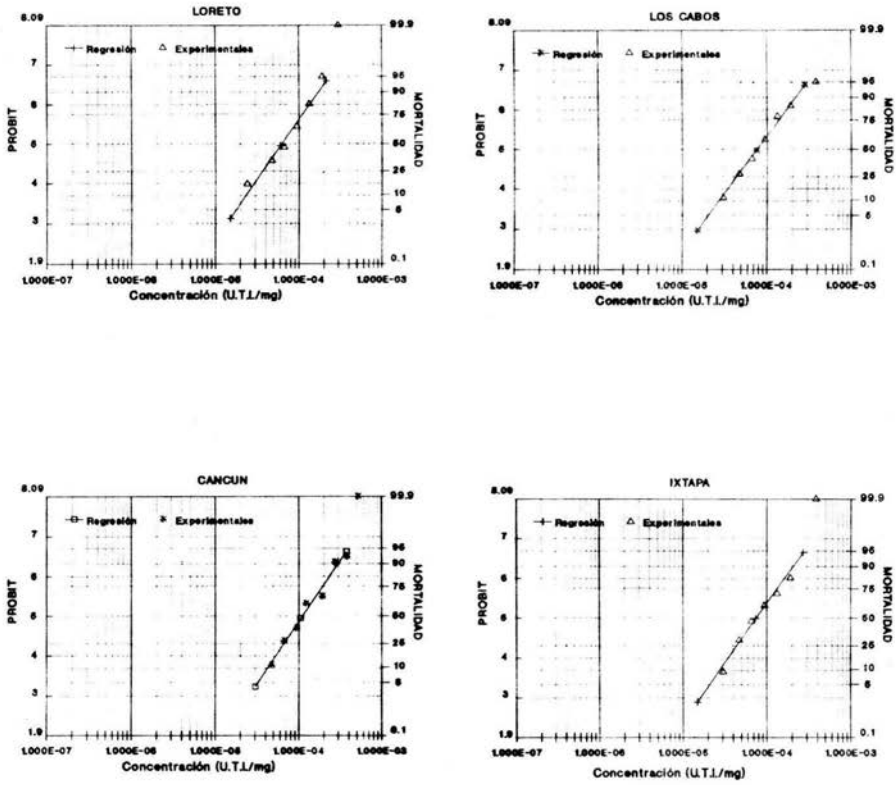


Fig. 8. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad a Teknar a larvas de 3er ínstar de *A. aegypti*.

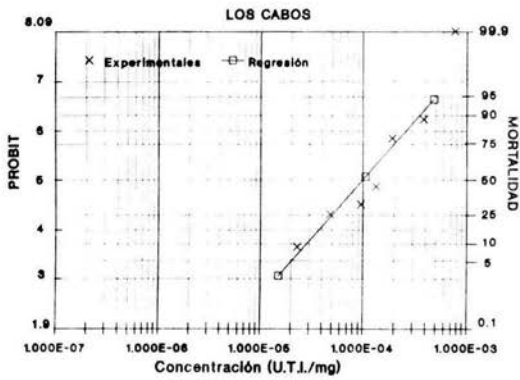
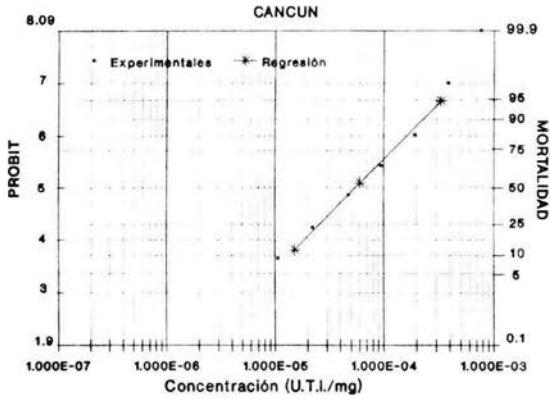


Fig. 9. Líneas de respuesta log. dosis-mortalidad a Teknar en larvas de 3er ínstar de *C. quinquefasciatus*.

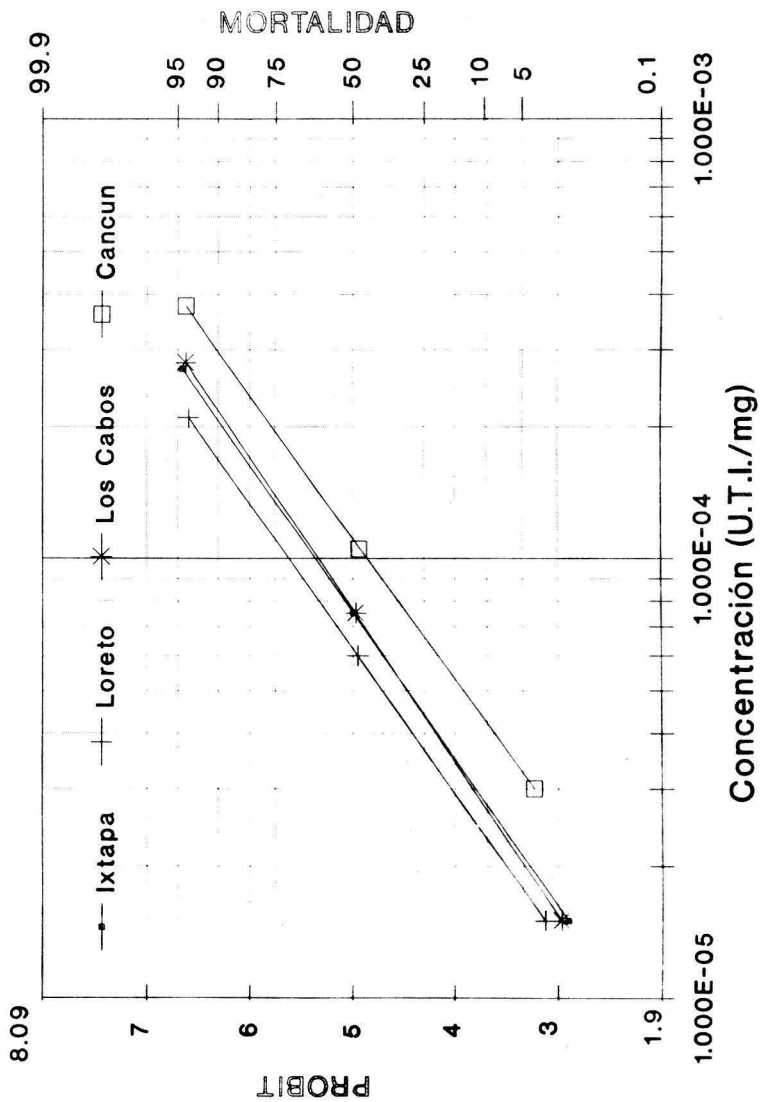


Fig. 10. Líneas de regresión de las 4 localidades para *Aedes aegypti*, obtenidas con Teknar.

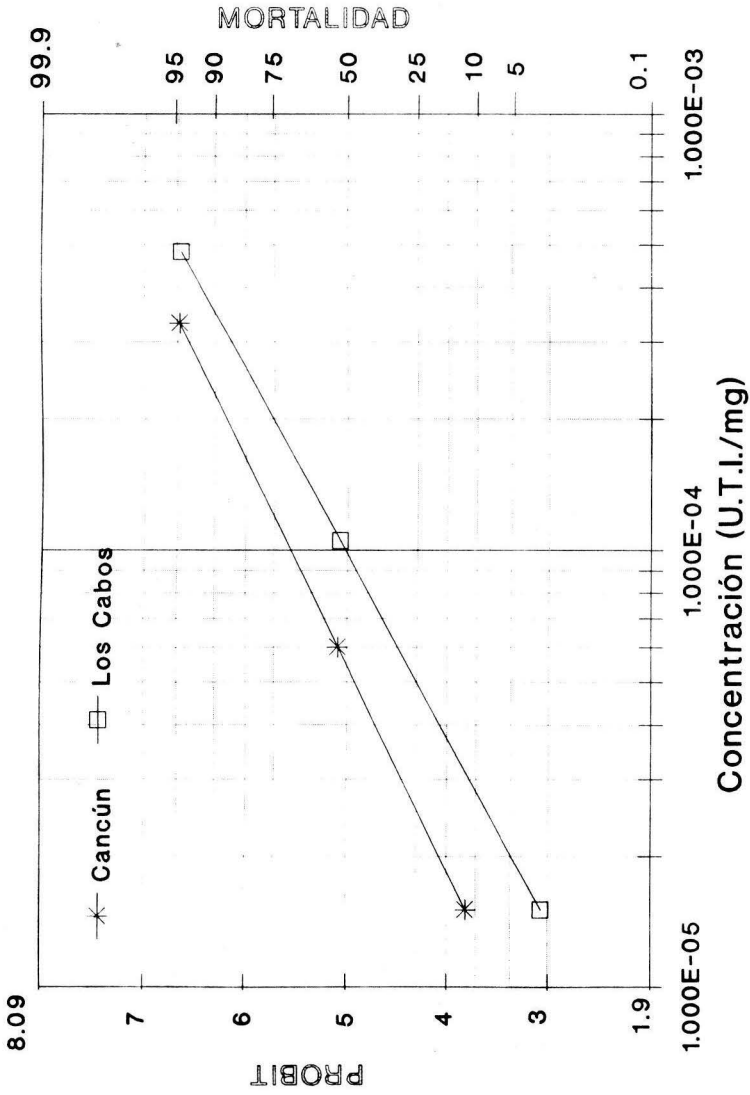


Fig. 11. Líneas de regresión para las 2 localidades de *Culex quinquefasciatus* obtenidas con Teknar

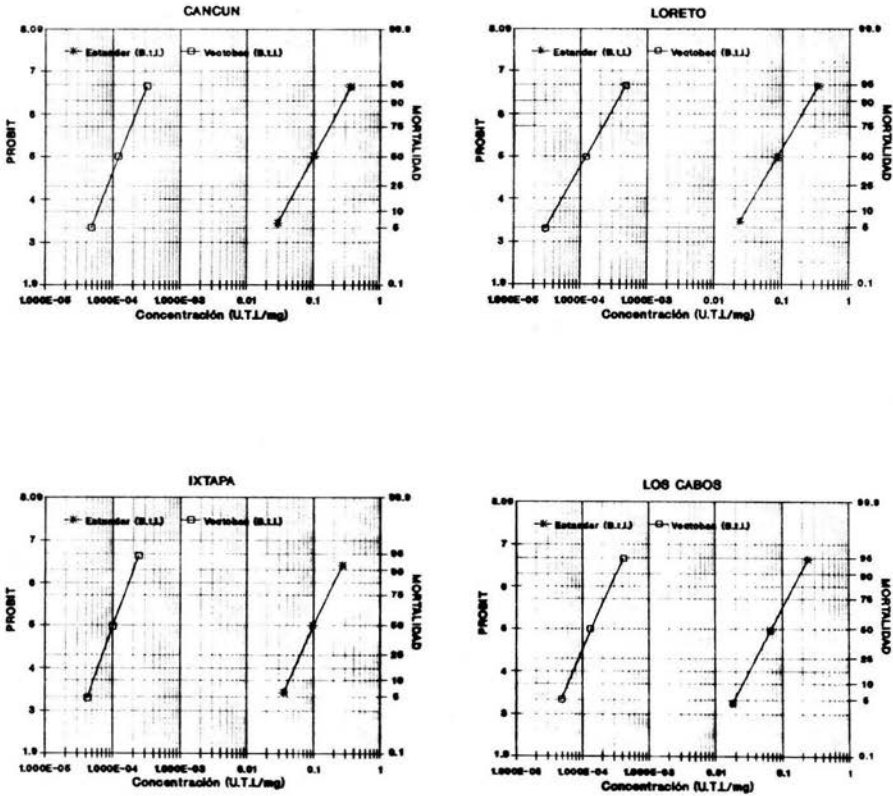


Fig. 12. Comparación de líneas de regresión obtenidas con Vectobac y el Estandar para las diferentes localidades de *Aedes aegypti*.

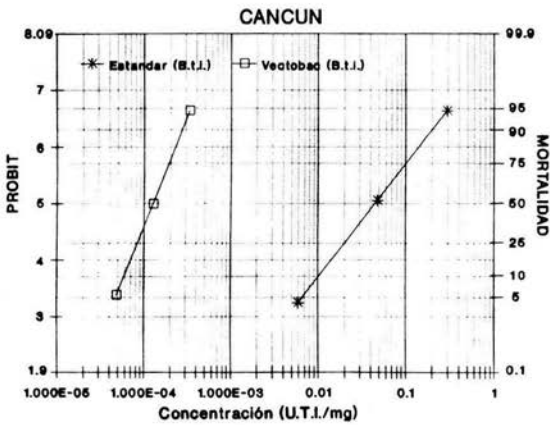
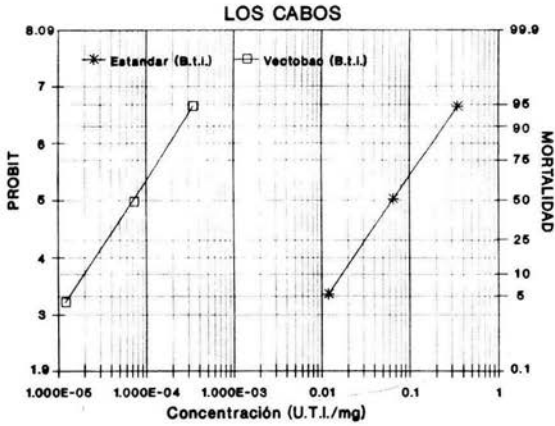


Fig. 13. Comparación de líneas de regresión obtenidas con Vectobac y el Estandar para las 2 localidades de *Culex quinquefasciatus*.

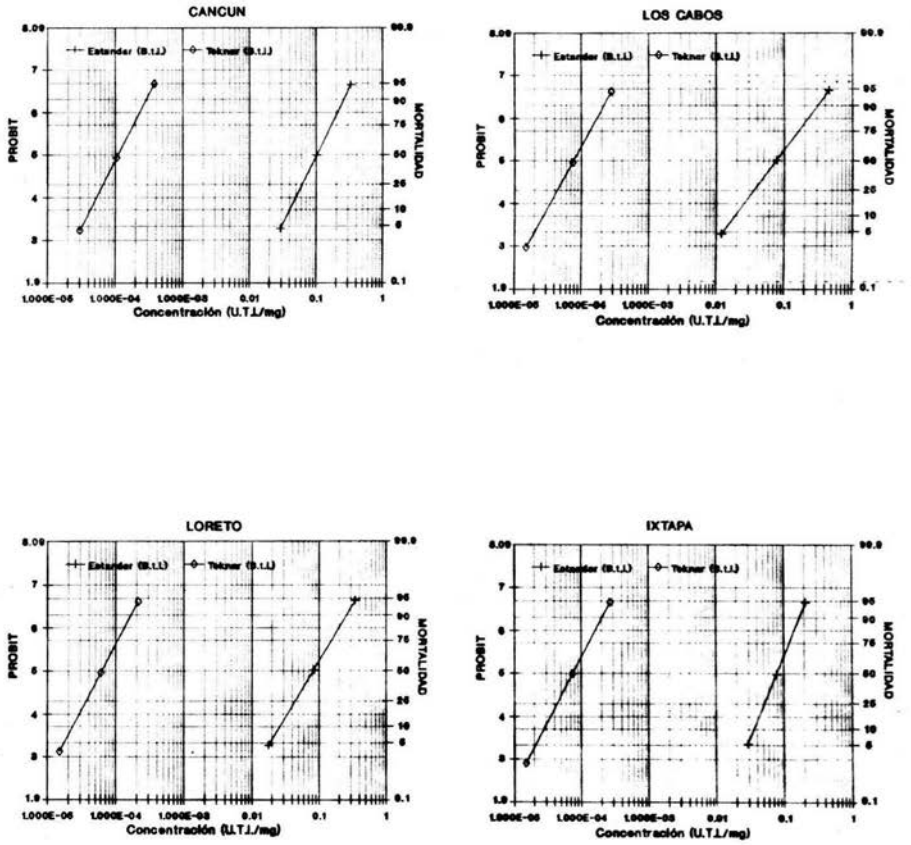


Fig. 14. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con Teknar y el Estandar para *Aedes aegypti* de cuatro localidades.

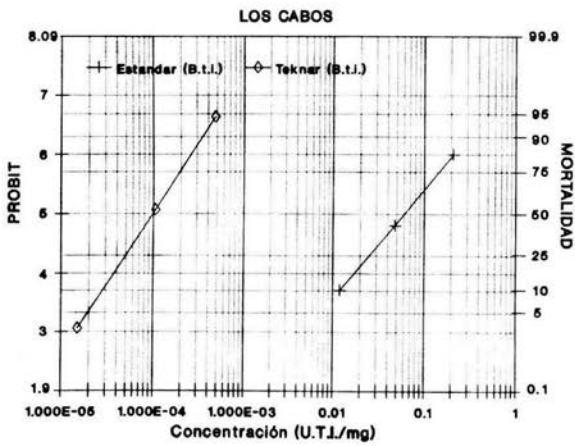
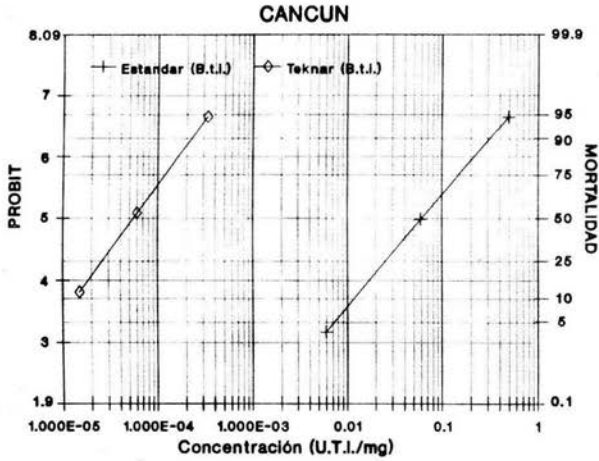


Fig. 15. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con Teknar y Estandar para *Culex quinquefasciatus* de dos localidades.

4.5. Histopatología

La observación de los daños histológicos a nivel intestino medio tanto para *A. aegypti* como para *C. quinquefasciatus*, así como los tiempos de acción de la bacteria, se realizaron utilizando una suspensión de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* obtenida del producto Vectobac, a una concentración de 0.0006 UTI/mg, Las anomalías en conducta se empezaron a registrar a los 5 a 6 minutos observándose la máxima mortalidad a los 35 minutos. Los primeros síntomas consisten en movimientos anormales, posteriormente solo se observa movimientos repentinos a manera de estertores seguidos de un lapso amplio de inmovilidad hasta que finalmente mueren. Una característica muy visible es que en el caso de *A. aegypti*, las larvas al morir presentan ennegrecimiento a nivel del intestino medio, además se van a la superficie y se agrupan en una orilla; en *C. quinquefasciatus* las larvas no siguen un patrón definido observándose en el fondo del vaso o en la superficie de este; los tiempos de mortalidad para ambas especies resultaron semejantes. Una vez obtenido el tiempo total de acción de la bacteria sobre las larvas, se consideró necesario trabajar con larvas cercanas a la muerte en donde aún no ocurría destrucción por otras causas externas, por lo cual se tomaron larvas con un tiempo de exposición a la bacteria de 30 minutos aproximadamente.

La histología de las larvas, reveló, en ambas especies, que el daño ocurre a nivel del intestino medio, morfológicamente ambas especies son un poco diferentes en el sentido de que *A. aegypti* posee mayor cantidad de células epiteliales en el intestino medio que *C. quinquefasciatus* (Figuras 16(A), 17(A)). En cortes realizados de intestino medio de larvas tratadas de *A. aegypti*, se observa a diferencia de los cortes de larvas sanas, una deformación y alargamiento de las células epiteliales intestinales, desprendimiento de estas de la membrana basal, y aparición de cisternas o cavidades intracelulares (Figura 16B). Los efectos en *C. quinquefasciatus* fueron semejantes en cuanto al sitio de acción (intestino medio), y tiempo de acción de la bacteria, pero con variantes en los daños a nivel celular, se observa primeramente (Fig. 17 B) un desprendimiento de las células epiteliales de la membrana basal, estas mismas células liberan su contenido citoplasmático al espacio existente entre estas y la membrana peritrófica. Las células epiteliales sufren también un fenómeno denominado citomegalia, caracterizado por el

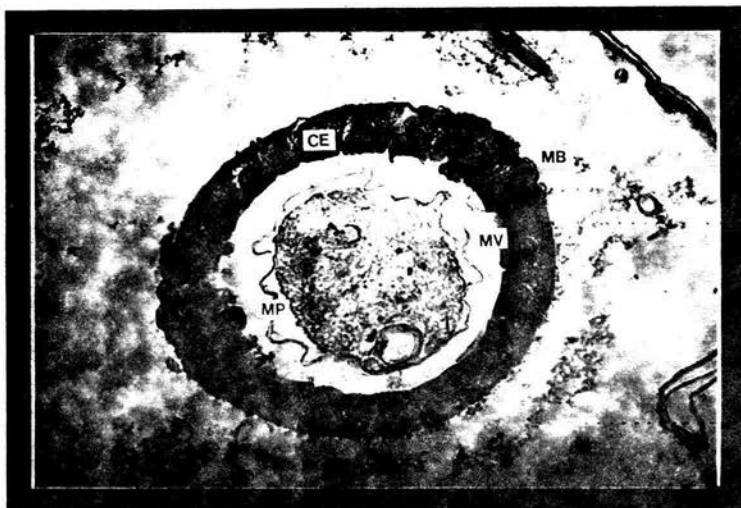
agrandamiento de la célula, la cual da como consecuencia la ruptura de sus paredes celulares y la desintegración de las mismas, también se puede ver que existen núcleos picnóticos, que son núcleos necrosados, los cuales posiblemente provienen de células ya destruidas que provienen de planos superiores ya que los cortes realizados fueron transversales, consecuencia de esto también son los restos celulares que se observan dentro de la luz del intestino junto con el contenido estomacal. Al igual que en *A. aegypti* el daño causado por *B. thuringiensis* var. *israelensis* es muy contrastante y evidente en *C. quinquefasciatus*.

En ambas especies se observa un daño parcial o total de las microvellosidades, en *A. aegypti* (Fig. 16 B) se puede observar un daño en la membrana peritrófica, hecho que no es muy evidente en *C. quinquefasciatus* (Fig. 17 B), una lisis celular y por ende el intercambio del contenido alcalino del intestino medio con la hemolinfa, lo cual producirá cambios que inducirán a la muerte.

4.6. Morfología del Cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Como resultado del estudio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) del cristal podemos observar (Figura. 18), que el cristal es de forma irregular con tendencia a la forma esférica, con un tamaño aproximado de 850 a 1300 nm. En la Figura 19 se observa una vista general de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, la barra representa 1 μm . En la Figura 19 podemos observar un complejo en donde se encuentra espora y cristal, esta muestra se obtuvo a partir del producto Vectobac, lo cual hace evidente que este producto está conformado por un complejo espora-cristal y no únicamente por el cristal como se maneja para su comercialización.

A



B

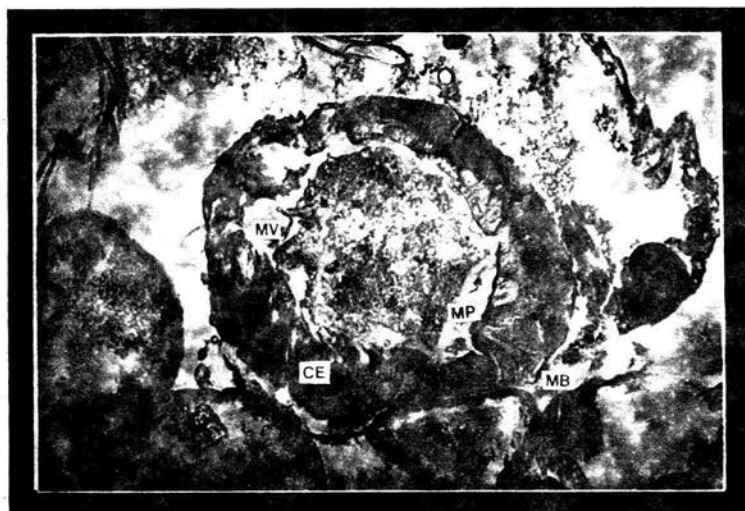


Figura 16. Cortes histológicos realizados en larvas de *Aedes aegypti*. A) larva sana B) larva enferma, observe la deformación, alargamiento de las células epiteliales, desprendimiento de estas de la membrana basal, daño de las microvellosidades y membrana peritrófica CE=Células epiteliales, MB= Membrana basal, MV=Microvellosidades, MP=Membrana peritrófica.

A



B



Figura 17. Cortes histológicos realizados en larvas de *Culex quinquefasciatus*. A) larva sana, B) larva enferma, observe la liberación del contenido citoplasmático de las células epiteliales, en las larvas enfermas, desprendimiento de éstas de la membrana basal, daños en las microvellosidades, se puede observar también núcleos picnóticos, así como citomegalia en las células epiteliales. CE=Células epiteliales, MB=Membrana basal, MV=Microvellosidades, NP=Núcleos picnóticos.

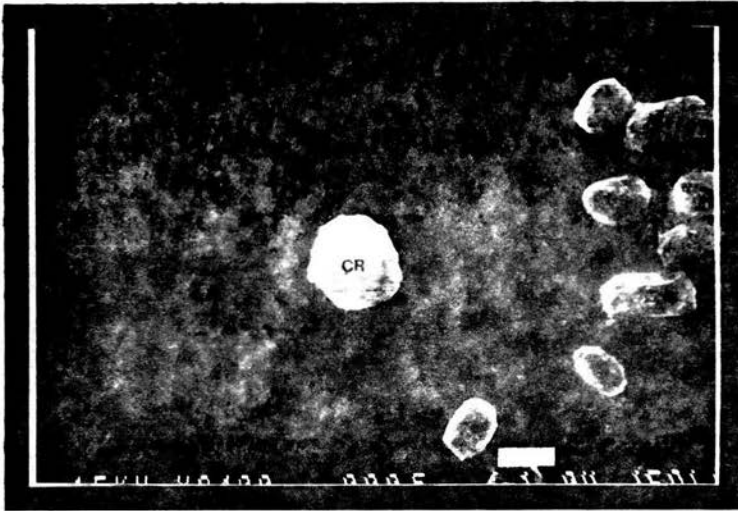


Figura 18. Acercamiento de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, existe cierta diferencia en el tamaño, resultado de la erosión por el agua y centrifugación durante el proceso de obtención. E=Espora, CR=Cristal. Barra=1 μ m.

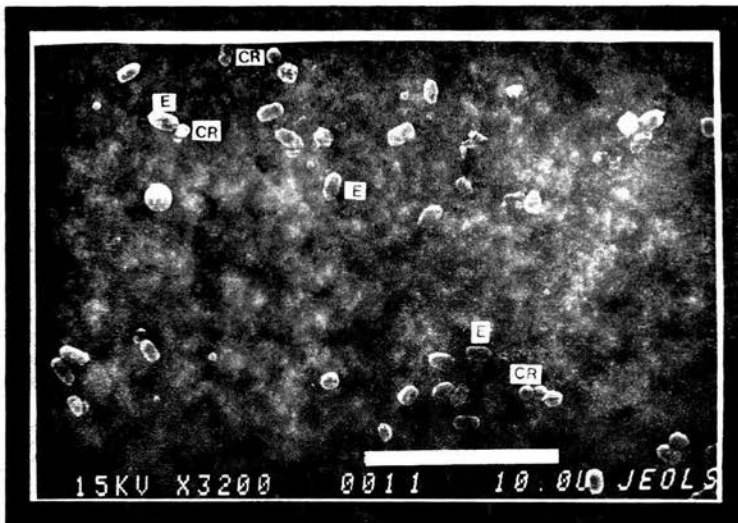


Figura 19. Vista general de conjunto de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. E=Espora, CR=Cristal. Barra=10 μ m.

5. DISCUSION

5.1. Determinación de la Respuesta Biológica (RB)

Es muy claro como se observa en los Cuadros 1, 2, 3 y 4 (Ver apéndice) que la RB es importante para determinar como responde una población a un estímulo y más importante aún, para determinar la respuesta de cada una de las poblaciones tratadas, puesto que cada una proviene de diferentes condiciones ecológicas y por ello es de esperarse que presentara diferente susceptibilidad y por ende diferente CL_{50} .

Como ya se mencionó, la determinación de RB es el paso previo a la realización de los bioensayos, método por el cual obtendremos la CL_{50} para las diferentes poblaciones, y productos, la RB nos dice las concentraciones donde obtendremos el 0 y el 100% de mortalidad, y por medio del método del papel probit obtendremos las demás concentraciones, considerando que para la determinación de la CL_{50} haya un mínimo de cinco concentraciones, dos por arriba y abajo de la CL_{50} estimada.

Un aspecto importante en la realización de bioensayos es, el manejo de las dosis (Cuadro 4) ya que si usamos concentraciones porcentuales estas van a contener diferente cantidad de producto activo, en el caso de *B. thuringiensis* var. *israelensis* es conveniente considerar las UTI/mg que son las unidades en las que viene expresada la concentración de cada producto, lo cual permite definir mayores diferencias en susceptibilidad entre las diferentes especies y poblaciones. Esto nos da pauta para enfatizar el uso de un método estandarizado para determinar las concentraciones, como es el manejo de UTI/mg para así facilitar la comparación de resultados con cualquier otro trabajo similar.

5.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL_{50})

Al observar los Cuadros 5 hasta el 17 nos percatamos que para la obtención de la CL_{50} el número de bioensayos realizados es variable, esto nos indica que cada población a pesar de pertenecer a la misma especie, posee un comportamiento diferente, cabe mencionar que este

punto es medido estadísticamente, el cual lo discutiremos mas adelante, obviamente no podemos descartar el hecho de un mal manejo, ya sea al seleccionar los organismos, así como en la preparación de las soluciones. Es por esto que en los Cuadros anteriormente mencionados (5 al 17) se especifica además de la CL_{50} , la CL_{95} , los límites de confianza del 95%, los valores de pendiente y ji-cuadrada, estos dos últimos son de suma importancia y que pocas veces son tomados en cuenta, el valor de pendiente mínimo aceptado es de 1.5, valores mas bajos nos indican una gran heterogeneidad en la población, es decir que en esa población existe un gran porcentaje de individuos con una alta susceptibilidad y con una baja susceptibilidad a la misma, siendo necesarios cambios drásticos en los valores de las concentraciones para que exista un cambio significativo en la mortalidad (López, 1993).

Los valores de ji-cuadrada se consideran aceptables cuando es menor de cinco, este valor nos indica que tan confiable es el estimador, ya que valores altos por arriba de cinco de ji-cuadrada señalan poca correlación entre los valores esperados y los experimentados. Basado en estos puntos, es más sencillo el analizar los resultados (Ibarra y Federici, 1987).

En el caso de Vectobac con *A. aegypti* todas las poblaciones se comportaron estadísticamente diferentes (Cuadro 9), siendo la mas susceptible la población de Los Cabos seguida por Ixtapa, Loreto y resultando como la menos susceptible la población de Cancún. Esto nos demuestra de alguna manera, los cambios de susceptibilidad inherentes a cada población. En el caso de Teknar la mayoría de las poblaciones se comportaron de igual manera, únicamente diferenciándose la población de Loreto como mas susceptible, de la menos susceptible, Cancún, pero la tendencia fue a la homogeneidad (Cuadro 16), resultados que no se asemejan con los obtenidos con Vectobac. A pesar de que ambos productos son a base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sus diferentes formulaciones las hacen mas o menos eficaces posiblemente Teknar posea una formulación mas efectiva y esto se ve reflejado en la homogeneidad de su respuesta, apoyado también con las CL_{50} (UTI/mg) mas bajas obtenidas en comparación con Vectobac (Cuadros 9 y 16).

Para el caso de *C. quinquefasciatus* se observó el mismo fenómeno, ambas poblaciones con Vectobac resultaron ser diferentes de acuerdo a una prueba de "t" de student, e iguales al evaluar Teknar, asumiendo las mismas causas antes mencionadas en *A. aegypti*. Para el caso de Vectobac con *Culex quinquefasciatus*, la población de Los Cabos resultó ser más susceptible con una CL_{50} de 0.000022 UTI/mg y Cancún como la menos susceptible con una CL_{50} de 0.00011 UTI/mg. Al evaluar Teknar en estas mismas poblaciones dio como resultado una CL_{50} para Cancún de 0.000055 UTI/mg y para Los Cabos 0.000077 UTI/mg y si comparamos las CL_{50} obtenidas con Vectobac y Teknar observamos que Teknar es más agresivo que Vectobac.

Como se observó, existen diferencias de susceptibilidad dentro de las diferentes poblaciones de una misma especie, obviamente si comparamos las dos especies *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* obtenemos diferencias en susceptibilidad. En el Cuadro 17 podemos observar que la diferencia es mínima, resultando más susceptible *C. quinquefasciatus* tanto en Cancún como en Los Cabos para Vectobac, para el caso de Teknar, *C. quinquefasciatus* de Cancún resultó ser más susceptible que *A. aegypti* de la misma localidad, pero en el caso de Los Cabos, *A. aegypti* resultó ser más susceptible que *C. quinquefasciatus* (Cuadro 18). Si analizamos en conjunto los resultados estos señalan a *C. quinquefasciatus* como más susceptible a *B. thuringiensis* var. *israelensis* que *A. aegypti* lo cual concuerda con lo reportado por Lawrence y Singer (1982), donde encontraron a *C. quinquefasciatus* como más susceptible con una CL_{50} de 0.0015 ppm y *Aedes* con un CL_{50} de 0.941 ppm, las unidades que estos autores manejan, no pueden ser comparables con los obtenidos en este trabajo, ya que ellos emplearon únicamente el complejo espóra-cristal, obtenido por medio de cultivo en medios artificiales y liofilización, y en nuestro caso se empleó un producto ya formulado. Volviendo al caso de *C. quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* de Los Cabos con Teknar donde *A. aegypti* resultó ser más susceptible que *C. quinquefasciatus*, esto se podría atribuir a que las poblaciones como ya se mencionó están sujetas a cambios de susceptibilidad repentinas mediadas por las características ambientales, apoyando este hecho podemos citar los resultados obtenidos por Tyrell *et al* (1979), quien obtuvo una mortalidad del 93% en *Aedes* y el 90% en *Culex*, siendo más susceptible *Aedes* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a una concentración de 10^2 $\mu\text{m/ml}$. Esta

diferencia se atribuye, no únicamente a cambios en las condiciones de trabajo, pudiendo influir los hábitos alimenticios y sobre todo como VanEssen y Hembree (1980) mencionan, esta variabilidad en la respuesta, es esperada por que dos entidades vivientes y por lo tanto variables están involucradas, el hospedero y el patógeno.

Hasta ahora hemos analizado que tan agresivo es un producto frente a otro, en base a la respuesta de las larvas, y observamos que todo señala a Teknar como mas agresivo en comparación con Vectobac. Esta diferencia la podemos apreciar en las Figuras 20 y 21, donde se gráfica únicamente las líneas de regresión obtenidas por medio del análisis probit, es importante señalar que una línea de regresión mientras mas a la izquierda o cercana al origen se encuentre mas agresivo resulta un producto, entonces si analizamos estas figuras observamos que Teknar es mas agresivo que Vectobac por la posición de la línea de regresión en todas las poblaciones de *A. aegypti* (Figura 20), encontrándose resultados semejantes en la poblacion de *C. quinquefasciatus* procedente de Cancún (Figura 21).

Estos dos productos son efectivos, pero es necesario compararlas con un parámetro independiente al testigo o Estandar, el cual nos dice si el producto es o no agresivo pero con respecto a una respuesta ya estudiada y así aseguramos de tomar en cuenta la variabilidad de la población, ya que tanto el producto como el Estandar son evaluados en forma simultánea, y bajo las mismas condiciones. Esta variabilidad es observada en los Cuadros 9 y 16 para *A. aegypti* con Vectobac y Teknar respectivamente, donde vemos que los coeficientes de variación son muy diferentes entre cada población y los valores tan altos de este, en ciertas poblaciones nos indica que la respuesta en cuanto al nivel de susceptibilidad varía diariamente, a pesar de que la homogeneidad de cada población es casi la misma, lo cual es reflejada por los valores de pendiente semejantes, este mismo comportamiento es observado con *C. quinquefasciatus* con ambos productos, en los Cuadros 10 y 11 para Vectobac , para cada localidad (Cancún y Los Cabos) y los Cuadros 17 y 18 con Teknar para ambas localidades.

Tomando en cuenta únicamente los niveles de susceptibilidad (CL_{50}), con respecto al Estandar para Vectobac y Teknar, Cuadros 19 y 20 respectivamente, podemos percatarnos que la diferencia en virulencia va desde 400 a 900 veces más . En el caso de Vectobac, esta diferencia la podemos apreciar aún mas observando las Figuras 12 y 13 para *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* respectivamente, estas gráficas nos demuestran en base a la posición de la línea de regresión que Vectobac en ambas especies es mucho mas agresiva que el Estandar , sucediendo lo mismo con Teknar (Figuras 14 y 15). En las Figuras 22 y 23 observamos que no hay traslape entre los límites fiduciales al comparar Vectobac contra el estandar, por lo que decimos que son estadísticamente diferentes. En las Figuras 24 y 25 vemos que tampoco hay traslape entre Teknar y Estandar para *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* respectivamente, en todas sus poblaciones siendo estadísticamente diferentes. Estas diferencias se puede considerar que se deben a la formulación, el Estandar no es un producto formulado. Los productos por medio de su formulación pueden hacer que *B. thuringiensis* var. *israelensis* sea más efectivo con menor cantidad de ingrediente activo, es posible que estas formulaciones posean fagoestimulantes, mayor protección para persistir en el medio y mejorar su característica de su rápida sedimentación lo cual no es favorable por los hábitos de las larvas. En el caso del Estandar, que como ya se mencionó anteriormente no está formulado, pero nos permite determinar que tan potente es el producto bajo estudio y sus posibilidades como un buen insecticida microbiano.

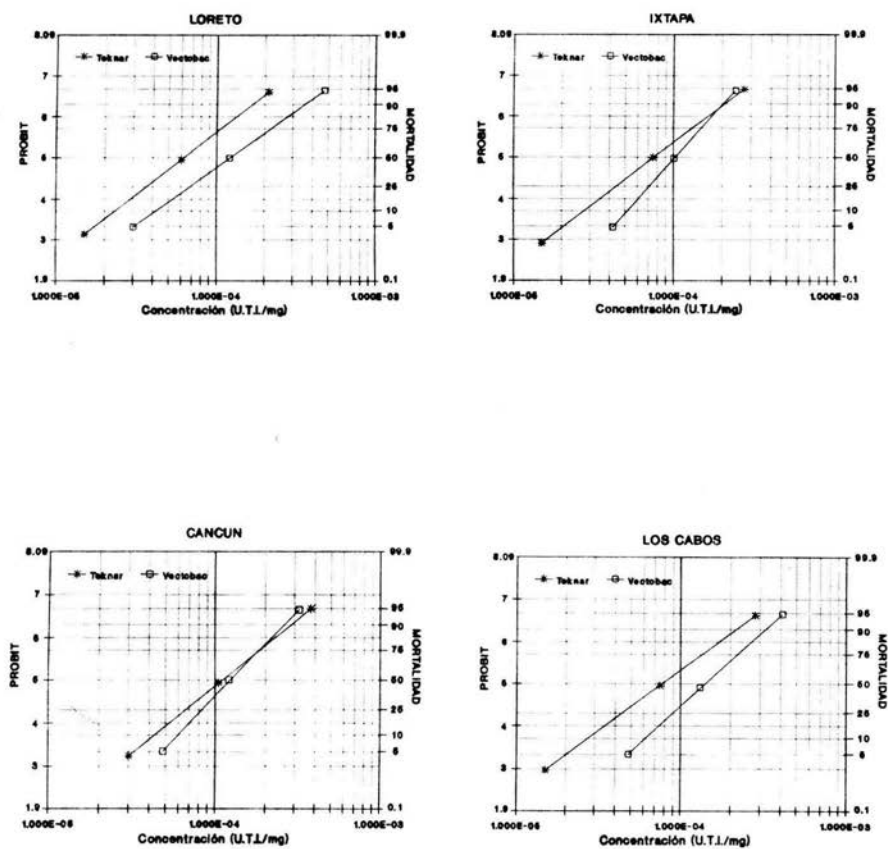


Fig. 20. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con los dos productos en larvas de *Aedes aegypti* de cuatro localidades.

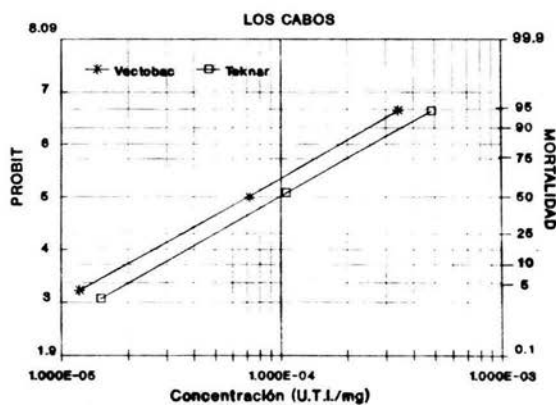
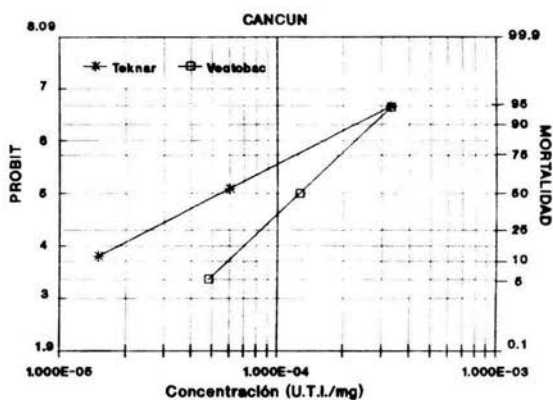


Fig. 21. Comparación de las líneas de regresión obtenidas con los dos productos para las dos localidades de *Culex quinquefasciatus*.

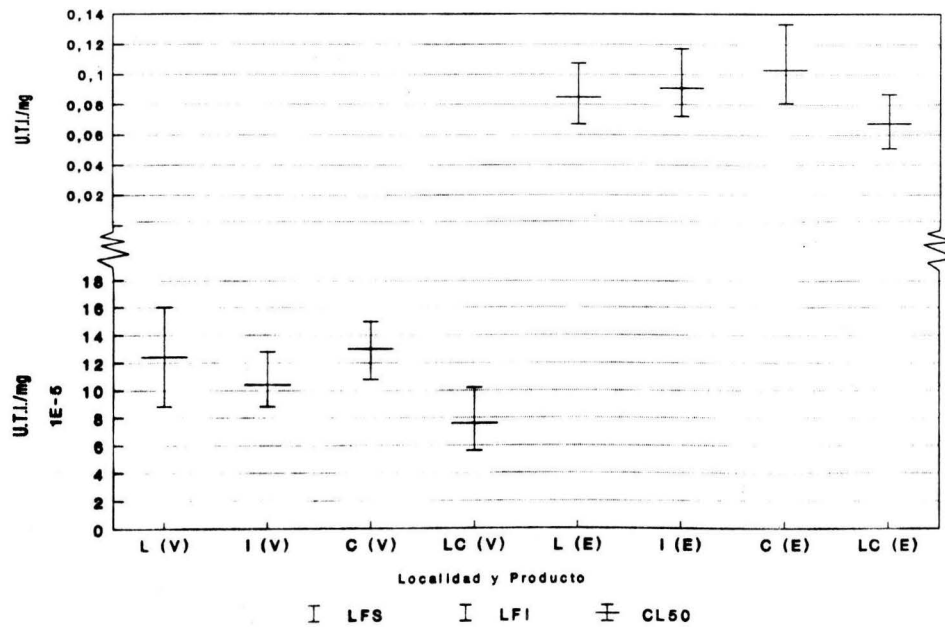


Fig. 22. Límites fiduciales de las CL50 de Vectobac y Estandar para *A. segypti*
 L=Loreto, I=Ixtapa, C=Cancún, LC=Los Cabos; V=Vectobac, E=Estandar

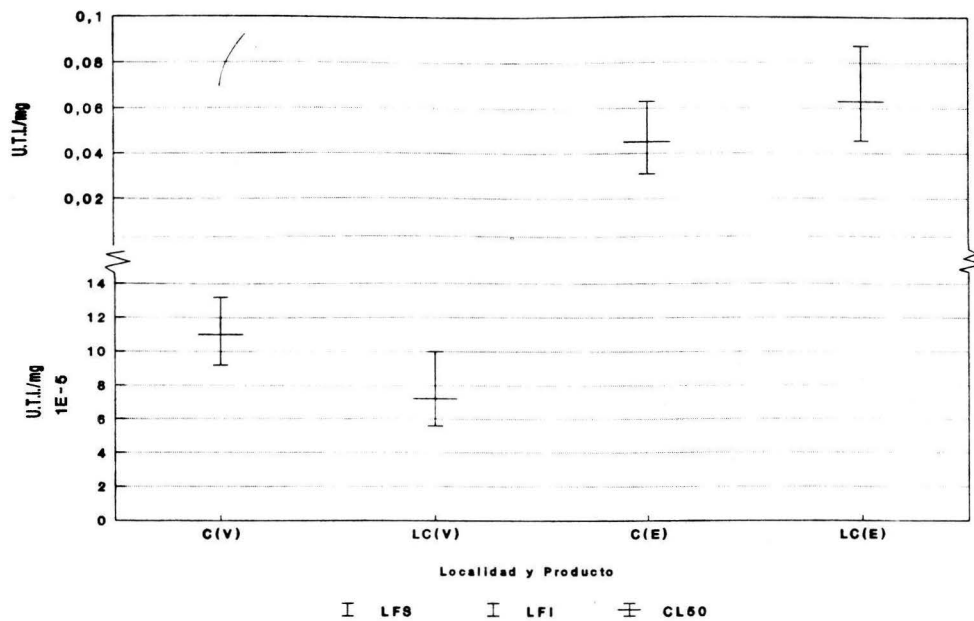
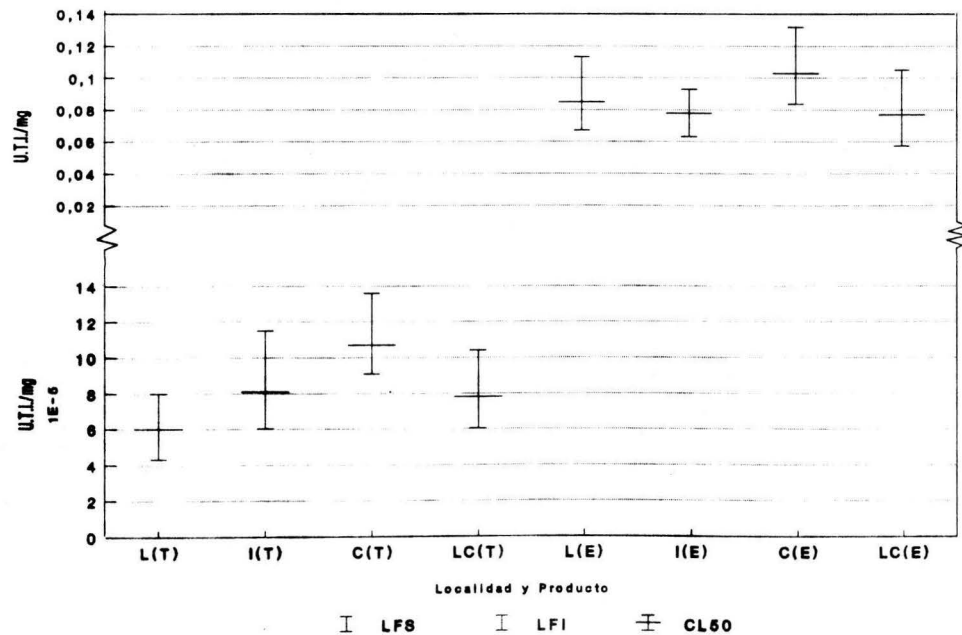
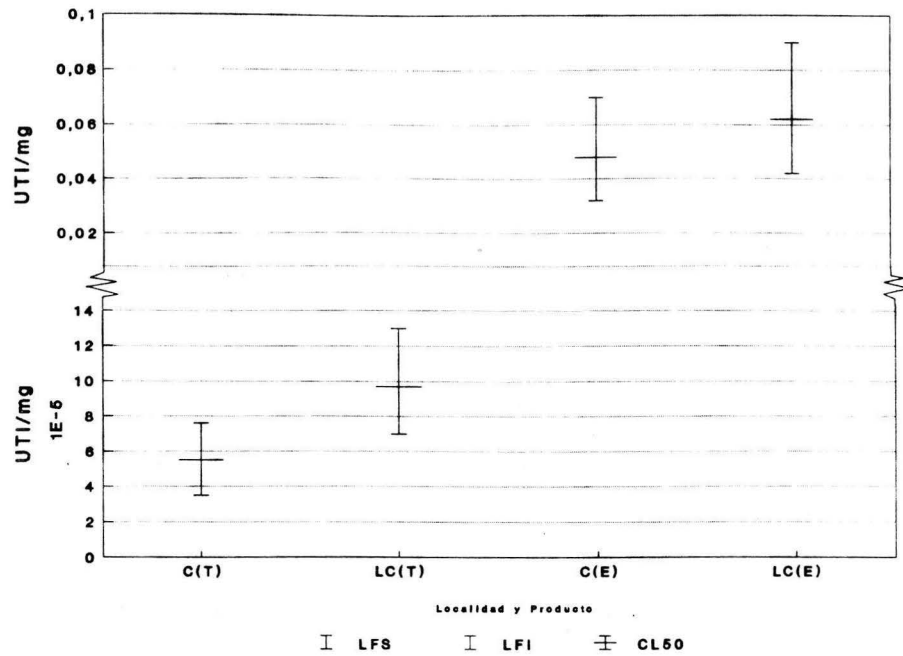


Fig. 23. Límites fiduciales de las CL50 de Vectobac y Estandar para *C. quinquefasciatus*. C=Cancún, LC=Los Cabos; V=Vectobac, E=Estandar



**Fig. 24. Límites fiduciales de las CL50 de Teknar y Estandar para *Aedes aegypti*.
L=Loreto, I=Ixtapa, C=Cancún, LC=Los Cabos; T=Teknar, E=Estandar**



**Fig. 25. Límites fiduciales de las CL50 de Teknar y Estandar para *C. quiquefasciatus*.
C=Cancún, LC=Los Cabos; T=Teknar, E=Estandar**

5.3. Histopatología

De acuerdo a los resultados, observamos que tanto en *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* la bacteria actúa a nivel intestino medio, esta zona es rica en microvellosidades, y es aquí donde se lleva a cabo la mayor absorción de nutrientes y por ende de la toxina bacteriana. Los tiempos tan cortos de acción que se registraron, donde los primeros efectos se observaron a los 5 a 6 minutos y la máxima mortalidad a los 30 a 35 minutos, concuerdan con los resultados obtenidos por Lahkim *et al*, (1982), quienes mencionan que la máxima mortalidad ocurre a los 37 minutos, esto refleja que la acción principal es debida a la delta-endotoxina, activada por el contenido alcalino del intestino medio. En *A. aegypti* al igual que en *C. quinquefasciatus* ocurre en primer lugar, una deformación y alargamiento de las células epiteliales, lo cual es mas marcado en *A. aegypti* mientras que en *C. quinquefasciatus* el efecto mas visible es la liberación del contenido citoplasmático de las células epiteliales intestinales, (Figura 26). A pesar de estas diferencias el resultado es el mismo dando en ambas especies la ruptura de la pared intestinal (Figura 27) permitiendo el paso del contenido alcalino al mesenteron y viceversa. En ambos casos se observó una separación de las células epiteliales intestinales de la membrana basal, una destrucción de la membrana peritrófica y las microvellosidades (Figuras 16 y 17). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lahkim *et al*, (1982), en donde además estos autores realizaron una diferenciación de zonas del intestino medio y afirman que la parte posterior del intestino medio es la mas afectada, lo cual puede ser consecuencia de la mayor cantidad de microvellosidades existentes en esta zona, las otras zonas son también afectadas pero en menor grado.

Observando las Figuras 16 y 17 vemos que hay un mayor daño en *A. aegypti* que en *C. quinquefasciatus*, esto puede deberse a que como se observa en la Figura 28. *A. aegypti* posee mayor cantidad de microvellosidades, no quiere decir que en forma general sea así, sino que posiblemente el corte histológico en *A. aegypti* se haya hecho cerca del área posterior del intestino medio y de acuerdo a Lahkim *et al*, (1982) esta zona posee mayor cantidad de microvellosidades y por lo tanto ocurre mayor absorción provocando un daño más severo.

Se recomienda realizar un trabajo en donde se efectúe un estudio diferencial sobre el efecto de *B. thuringiensis* var. *israelensis* en las diferentes zonas del intestino medio, así como diferentes tiempos de exposición a la bacteria, para determinar en forma general el avance del daño en el intestino medio del insecto.

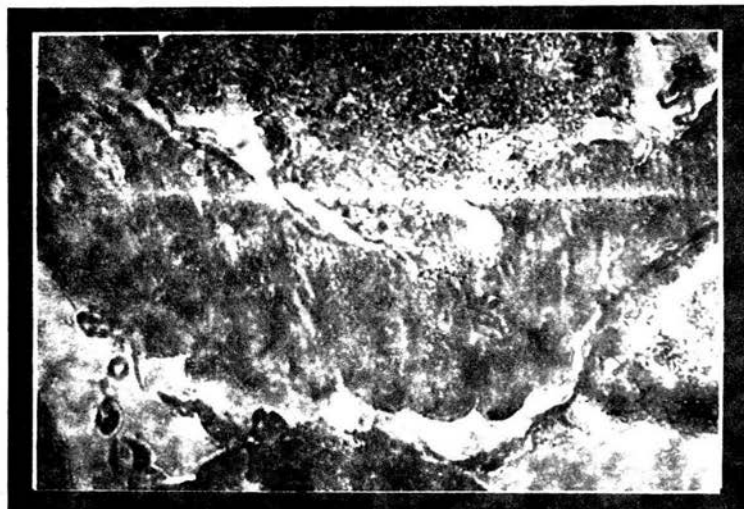
5.4. Morfología del cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

De las observaciones hechas en las micrográficas en el MEB, del cristal de la bacteria, se puede mencionar que es el cristal es de forma irregular con tendencia esférica (Figura 18), lo cual concuerda con lo obtenido por Ibarra y Federici (1986) e Insell y Fitz-James (1988), su tamaño varía de 850 a 1300 nm, existiendo similitud con los resultados obtenidos por Ibarra y Federici (1986), en donde estos autores mencionan que registraron un diámetro del cristal de 700 a 1200 nm. Esta variación en tamaño puede deberse básicamente a que durante el proceso de purificación y obtención del cristal, este es erosionado por el agua, la centrifugación etc. lo cual ocasiona una reducción de su tamaño y forma original. Esta forma de cristal es característica del Patotipo II la cual es tóxica para dípteros, y esta conformada por tres inclusiones, que desafortunadamente no son visibles al MEB, para esto se sugiere realizar Microscopía Electrónica de Transmisión para poder diferenciar las inclusiones.

En la preparación del material observamos que hay tanto esporas como cristales, lo cual indica que este producto posee no solo el cristal, como se maneja y denomina ingrediente activo, sino que es el complejo espora-cristal.

A

66



B

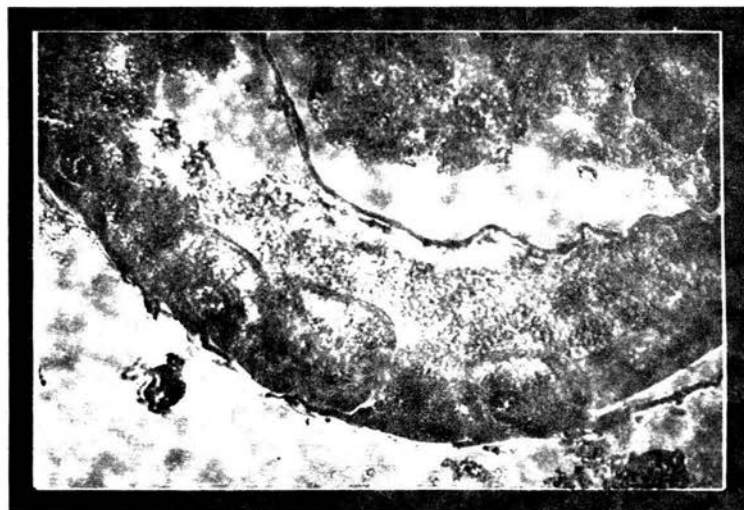
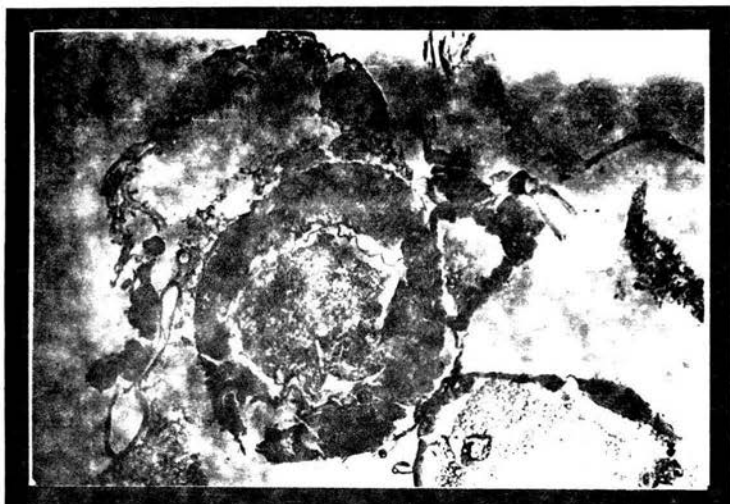


Figura 26. Comparación del efecto de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre las células epiteliales intestinales, se observa cierta diferencia entre las dos especies, pero ambas severamente dañadas. A) *Aedes aegypti*, B) *Culex quinquefasciatus*. Comparar con la Figura 28.

A



B



Figura 27. Ruptura de la pared intestinal consecuencia de una lisis celular, uno de los efectos finales de la acción de la bacteria sobre el intestino medio de las larvas enfermas A) *Aedes aegypti*, B) *Culex quinquefasciatus*.

A



B



Figura 28. Acercamiento de la pared celular del intestino medio, detalle de la diferencia en la cantidad de microvellosidades en larvas sanas de A) *Aedes aegypti* y B) *Culex quinquefasciatus*. MC=Microvellosidades.

6. CONCLUSIONES

- Los productos Vectobac y Teknar a base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* son altamente tóxicos para larvas de dípteros en condiciones de laboratorio con base a la CL_{50} mas bajas obtenidas en comparación con el estandar en condiciones de laboratorio.

- La CL_{50} obtenida en UTI/mg con Vectobac para las cuatro localidades de *Aedes aegypti* de la mas a la menos susceptible fueron 0.000076, 0.000104, 0.000124 y 0.00013 para Los Cabos, Ixtapa, Loreto y Cancún respectivamente, resultando más susceptible la población de Los Cabos.

- La CL_{50} obtenida en UTI/mg con Vectobac para las dos localidades de *Culex quinquefasciatus* fueron 0.000072 y 0.00011 para Los Cabos y Cancún respectivamente, resultando mas susceptibles la población de Los Cabos.

- La CL_{50} obtenida con Teknar expresadas en UTI/mg para las cuatro localidades de *Aedes aegypti* de la mas a la menos susceptible fueron 0.000060, 0.000078, 0.00008 y 0.000107, para Loreto, Los Cabos, Ixtapa y Cancún respectivamente.

- La CL_{50} obtenida con Teknar expresada en UTI/mg para las dospoblaciones de *Culex quinquefasciatus* fueron 0.000047 y 0.000055 para Los Cabos y Cancún respectivamente, resultando mas susceptible la población de Cancún.

- El producto Teknar resultó ser mas agresivo contra las especies evaluadas, que el producto Vectobac, sin embargo ambos productos resultaron ser mucho más agresivo que el estandar.

- Al realizar el estudio histológico en larvas de *Aedes aegypti* observamos que presenta deformación y alargamiento de las células epiteliales intestinales, desprendimiento de estas células de la membrana basal, aparición de cisternas o cavidades intracelulares, daño de la membrana peritrófica, desintegración de las microvellosidades y lisis celular.

- Con las larvas de *Culex quinquefasciatus* se observa citomegalia en las células epiteliales, la liberación de su contenido citoplasmático, desprendimiento de estas de la membrana basal, desintegración de las microvellosidades y una lisis celular
- El cristal parasporal de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ingrediente activo de estos dos productos es de forma irregular esférica, con un diametro que va de 850 a 1300 nm.
- Las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* evaluadas en este estudio presentan un alto potencial como bioinsecticidas para un control efectivo de dípteros de importancia medica, como se manifiesta por el corto período requerido para causar mortalidad.

LITERATURA CITADA

- Abbot, W.S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Adang, M.J., 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action and utilization. In: K. Maramorosh (Ed.). *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. CRC Press Boca Ratón, USA. pp. 3-24.
- Aronson, A., W. Beckman, and P. Dunn 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiol Rev.* 50: 1-24.
- Beegle C.C. and T. Yamamoto. 1992. Invitation Paper (C.P. AlexanderFund); History of *Bacillus thuringiensis* Berliner, Research and development. *Can. Ent.* 124: 587-616.
- Betchel D. and L.A. Bulla, Jr. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127(14):1472-1481.
- Camacho C.O. 1990. PC Probit, Versión 1.0 (Programa de cómputo). Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Cooksey, K.E., 1971. *Microbial Control of insects and mites.* (H.D. Burges and N.M., Hussey eds.). Academic Press, London and N.Y.
- Colbo M.H. and Undeen A.H., 1980. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target insect in stream trials for control of simuliidae. *Mosquito News.* 40: 3, 369-371.
- De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35:233-240.
- Dulmage, H.T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: H.D. Burges (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980.* Academic Press London. pp. 193-222.
- Faust, R.M. and L.A. Bulla Jr. 1982. Bacteria and their toxins as insecticides. In: E. Kurstak (Ed.). *Microbial and viral pesticides.* Marcel Dekker, Inc. New York. pp75-208.
- Finney, D.J. 1976. *Probit Analysis.* 3ra. edic. Cambridge Univ. Press. Great Britain. 333p
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.

- Goldberg J. L. and J. Margalit. 1977. A Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles segentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News. 37(3): 355-359.
- Harvey, W.K., D.N. Crawford, W.S. Eisen, V.F. Fernández and D.D. Spoett. 1987. The potassium impermeable apical membrane of insect epithelia; a target for the development of safe pesticides. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82 (suppl. III):29-34.
- Harwood, R.F. and M.T. James. 1979. Entomology in Human and Animal Health. 7th. edic. McMillan Publis. Co. Inc. U.S.A. 548 p.
- Heimpel A.M. and T.A. Stainhaus. 1963. Disease caused by certain sporeforming bacteria. In Insect Pathology: An Advance Treatise. (E.A. Steinhaus ed.) Academic Press. New York. 2, 21-73.
- Hertlien, B.C., J. Hornby, R. Levy and T. W. Miller Jr. 1981. Prospects of Spore-Forming Bacteria for Vector Control with Special Emphasis on Their Local Production Potential. In: Development In Industrial Microbiology. Society for Industrial Microbiology. 2(22).
- Hewlett, P.S. and R.L. Plankett. 1979. An introduction to the Interpretation of Quantal Responses in Biology. University Park Press. U.S.A. 83 p.
- Hofte, H. and H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev. 53: 242-255.
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1986. Isolation of a relatively Nontoxic 65-kilodalton Protein Inclusion from the Parasporal Body of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Bacteriology 152(2): 527-533.
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1987. Comparison of the toxicity, parasporal body protein composition and plasmid complements of the nine isolates of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Econ. Entomol. 80:1131-1136.
- Ignoffo, C. M., C. García, M. J. Kroha, T. Fukuda and T. L. Couch. 1981. Laboratory Test to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuyringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. Mosquito News. 41(1): 85-93.
- Infante Gil, S. y L.G. Zárate. 1991. Métodos estadísticos. Segunda Edición. Ed. Trillas. México D.F., 643 p.
- Insell, J. P. and P.C. Fitz-James. 1988. Composition and toxicity of the inclusion of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 56-62.

- Jones, C.J. and J.E. Lloyd. 1985. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) for larval *Aedes* mosquito control in intermountain meadows in Wyoming. *J. Am. Mosq. Assoc.* 1(1):51-69
- Tanada, Y. and K.H. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. Inc. 666 p.
- Knowles, B.H. and D.J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 509-518.
- Krieg, A., A. M. Huger, G.A. Langenbruch and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* ein neuer, gegenüber larven von coleopteran wirksamer pathotyp. *Z. Angew. Entomol.* 96:500-508.
- Krieg, A. 1971. Concerning Alpha-Exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus*. *J. Inv. Pathol.* 17: 134-135.
- Lahkim.Tsrer, L., C. Pascar-Gluzman, J. Margalit and Z. Barak, 1983. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serovar. H-14 in *Aedes aegypti*; Histopathological study. *J. Inv. Pathol.* 41: 104-116.
- Lambert Bart and Marnik Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience.* 42: 112-122.
- Li, J., J., Carroll and D.J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.
- López M. J. E. 1993. Selección y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a la palomilla dorso de diamante *Plutella xilostella* (Lepidoptera:Plutellidae). Tesis de Maestría. CINVESTAV. Irapuato, Guanajuato, México. 130 p.
- Luthy, P., J.L. Cordier and H.M. Fisher. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. In: E. Kurstak (Ed.). *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 35-74.
- Lysenko, O. 1983. *Bacillus thuringiensis*: Evolution of a taxonomic conception. *J. Invertbr. Pathol.* 42: 295-298.
- Margalit, J. and D. Dean. 1985. The Story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1:1: 1-7.
- Molloy, D., G. Randy and H. Jamnback. 1981. Factors Influencing Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a Biological Control Agent of Black Fly Larvae. *J. Econ. Entomol.* 74:61-64.

- Martin, P.A.W. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437-2442.
- Martínez, G.A. 1988. Diseños experimentales. Ed. Trillas. México D.F., 756 p.
- Navon A. 1993. Control of lepidoptera pests with *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis* an Enviromental Biopesticide; Theory and Practice. Edited by Philip F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs. Ed. John Wiley and Sons. 285 p.
- Prado B.E. y J. Valdez C. 1985. Introducción para la elaboración de preparaciones histológicas. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgradaudos. Chapingo, Méx. (Inédito). 27 p.
- Pietrantonio, P.V., B.A. Federici and S.S. Gill. 1993. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins with the insects midgut epithelium. In: *Parasites and Pathogens of insects*. Vol. 2. Academic Press Inc. pp 55-79.
- Rawlings, E.C. 1989. Biological control of insects pests affecting man and animals in the tropics. *Critical Reviews in Microbiology*, 16(4): 234-252.
- Sebesta, K., J. Farkas and K. Horska. 1981. Thuringeinsin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: H.D. Burges (Ed.). *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, Inc. New York. pp. 249-281.
- Siegal, J.P., J.A. Shaddock and J. Szabo. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *J. Econ. Entomol.* 80: 717-723.
- Siegal, J.P. and J.A. Shaddock. 1990. Clearence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *B. sphaericus* from mammals. *J. Econ. Entomol.* 83(2): 347-355.
- Thomas, W.E. and D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxins. Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 60: 181.
- Tyrell, D.J., L.I. Davidson, L.A. Bulla and W.A. Romoska. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to mosquitoes. *Applied and Enviromental Microbiology.* 38(4):656-658.
- Undeen A.H. 1979. Laboratory Studies on the Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* De Barjac Against *Simulium damnosum* (Diptera:Simuliidae) larvae.
- Van Essen, F.W. and S.C. Hembree. 1980. Laboratory bioassay of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against all instar of *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus* larvae. *Mosquito News.* 40:3: 424-431.

- Vazquez, N.J.M.** 1993. Elaboración de un documento de referencia para el monitoreo de resistencia a plaguicidas en artrópodos mediante bioensayo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de Méx, México.
- Zaim, M.H. K.** and M. Motobar. 1992. Efficacy of a flowable concentrate formulation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against larval mosquitoes in Southern Iran. J. of the Am. Mosquito Control Association. 8(2): 156-158.

APENDICE

Cuadro 1. Ventana de Respuesta Biológica para *A. aegypti* hacia Vectobac y el producto Estandar.

Concentración	Porcentaje de Mortalidad							
	Ixtapa		Loreto		Cancún		Los Cabos	
	V	E	V	E	V	E	V	E
0.0001 %	100	100	100	100	100	100	100	100
0.00005 %	100	100	80	93.3	100	80	86.6	80
0.000025 %	93	66.6	26.6	60	66.6	53.3	46.6	80
0.0000125 %	33	33.3	20	40	26.6	33.3	13.3	66.6
0.00000625 %	13.3	6.6	0	13.3	0	6.6	0	26.6
0.00000312 %	6.6	0	0	6.6	0	0	0	26.6
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0

V= Vectobac

E= Estandar

Cuadro 2. Respuesta Biológica de *C. quinquefasciatus* hacia Vectobac y el producto Estandar.

Concentración %	Porcentajes de Mortalidad			
	Cancún		Los Cabos	
	Vectobac	Estandar	Vectoba	Estandar
0.0001 %	100	100	100	93.3
0.00005 %	100	93.3	86.6	80
0.000025 %	86.6	80	80	66.6
0.0000125 %	60	80	60	53
0.00000625 %	40	33.3	20	20
0.00000312 %	6.6	0	0	0
Testigo	0	0	0	0

Cuadro 3. Respuesta biológica de *A. aegypti* al producto Teknar así como el producto estandar.

Concentración	Ixtapa	Loreto	Cancún	Los Cabos				
	Porcentajes de Mortalidad							
%	T	E	T	E	T	E	T	E
0.0001 %	100	100	100	100	100	100	100	100
0.00005 %	100	100	100	93.3	100	80	100	80
0.000025 %	100	66.6	100	60	93.3	53.3	100	80
0.0000125 %	80	33.3	93.3	40	53.3	33.3	93.3	66
0.00000625 %	53.3	6.6	40	13.3	40	6.6	40	26.6
0.00000312 %	26.6	0	20	6.6	13.3	0	20	26.6
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0

T= Teknar

E= Estandar

Cuadro 4. Porcentajes de mortalidad obtenidos en la VRB para *C. quinquefasciatus* hacia Teknar y el producto estandar.

Concentración %	Cancún		Los Cabos	
	Porcentajes de Mortalidad			
	Teknar	Estandar	Teknar	Estandar
0.0001 %	100	93.3	100	100
0.00005 %	100	80	100	93.3
0.000025 %	100	66.6	93.3	80
0.0000125 %	80	53.3	86.6	73.3
0.00000625 %	53.3	20	40	33.3
0.00000312 %	46.6	0	33.3	20
Testigo	0	0	0	0

Expresión matemática empleada para la obtención de concentraciones intermedias a partir de una solución madre.

$$A \times B = C$$

$$D \times E = F$$

$$\frac{A \times B}{D \times E} = I$$

Donde:

A = La cantidad de la solución madre necesaria para la nueva dilución

B = Concentración de la solución madre

C = Es producto de A x B

D = Cantidad del solvente para la nueva dilución

E = Factor de toxicidad del solvente

F = Producto de D x E

G = Es la suma de A y D y representa la cantidad total de la solución que se desea preparar

H = Concentración de la solución que se desea preparar

I = Producto de G x H