

NOTAS CIENTIFICAS Y DIVULGACION

ANTECEDENTES SOBRE *BACILLUS THURINGIENSIS*, UNA BACTERIA SELECTIVA PARA CONTROLAR INSECTOS

L. LAMBOROT¹ y J.E. ARAYA²

RESUMEN

El presente trabajo contiene una revisión de literatura sobre *Bacillus thuringiensis* Berliner, bacteria utilizada para controlar ciertos insectos en forma selectiva. Se incluyen antecedentes sobre su descubrimiento y clasificación, descripción del modo de acción en larvas de lepidópteros, aplicación y determinación de potencia insecticida.

SUMMARY

This article contains a literature review on *Bacillus thuringiensis* Berliner, bacterium utilized for controlling selectively certain insects. Notes on the discovering and classification, description of mode of action in caterpillars, field treatment and determination of insecticide potency are included.

INTRODUCCION

La existencia de enfermedades bacterianas en insectos fue notada aparentemente por primera vez por Metchnikoff en 1879, quien observó una larva de *Anisoplia austriaca* Hbst. (Coleoptera, Scarabaeidae), infectada con *Bacillus salutaris* Metchnikoff. En 1893, otros investigadores encontraron *B. tracheitus sive graphitosis* y *B. septicus insectorum* causando enfermedades en insectos. En 1912, d'Herelle encontró *Aerobacter aerogenes* var. *acridiorum* (d'Herelle) en *Schistocerca pallens* Thumb (Sweetman, 1958).

Bacillus thuringiensis, microorganismo capaz de inducir enfermedad al ser aplicado sobre poblaciones de ciertos grupos de insectos, fue aislado a comienzos de siglo de larvas muertas de la polilla mediterránea de la harina, *Anagasta (Ephestia) kuhniella* (Zeller), por Berliner en Alemania. En 1951 Steinhaus revivió el interés de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner como patógeno de insectos (Heimpel y Angus, 1963). Esta bacteria es usada actualmente para controlar insectos de manera similar al uso de insecti-

cidas convencionales (Maddox, 1975; Ware, 1978).

Clasificación

Se han descrito numerosas especies de bacterias extracelulares asociadas con insectos, la mayoría saprófitas, comensales o simbioses, localizadas en el tracto digestivo (Sweetman, 1958). Muchas de ellas no forman esporas y son a menudo consideradas patógenos potenciales (Bucher, 1960). Mientras estas bacterias permanecen en el mesenteron, son relativamente poco importantes, sin embargo, cuando se introducen en la sangre del insecto, muchas de ellas se vuelven extremadamente patógenas. Factores como temperaturas extremas, presencia de otros microorganismos, parásitos o deficiencia alimentaria pueden hacer que estas bacterias penetren a la cavidad hemocélica (Steinhaus, 1958). Estas bacterias que no forman esporas tienen distribución cosmopolita, pero son de baja capacidad invasora, por lo que se han destinado pocos esfuerzos para su utilización como agentes de control microbiológico. Bacilos formadores de esporas son bastante comunes en insectos, pero son menos patógenos que los bacilocos, grupo al cual pertenecen la mayor parte de las bacterias entomopatógenas. Las

¹Instituto de Entomología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. Casilla 147, Santiago, Chile.

²Fac. Cs. Agrarias y Forest., Univ. de Chile. Casilla 1004, Santiago, Chile.

bacterias patógenas de insectos pertenecen al orden Eubacteriales, el que incluye la familia Bacillaceae, la cual se caracteriza por producir endosporas (Sweetman, 1958). La mayoría de las especies del género *Bacillus* atacan el sustrato mediante secreción de enzimas para disolver compuestos complejos y hacerlos asimilables para ser aprovechados por la bacteria en desarrollo (Heimpel y Angus, 1963; Ware, 1978).

Las bacterias formadoras de esporas más importantes como patógenos de insectos son *B. popilliae*, que causa la enfermedad lechosa en gusanos blancos y *B. thuringiensis*, que es patógena para muchas especies de larvas de Lepidoptera (Maddox, 1975)*.

Sustancias tóxicas producidas por Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis Berliner, conocido también como Serotipo H-3, HD-1 o *B.t.* var. *kurstaki*, es una bacteria formadora de esporas de amplia distribución que ataca larvas de muchas especies de Lepidoptera. Ha sido utilizada extensivamente en diversos cultivos agrícolas, especialmente contra cuncunillas en crucíferas hortícolas, alfalfa, fréjol, tabaco, tomate, etc., y también en algunas plagas forestales (Sweetman, 1958; Lecadet y Martouret, 1967; Bishop *et al.*, 1973; Arretz *et al.*, 1975; Thompson *et al.*, 1977; Dubois, 1981; Lewis *et al.*, 1984).

Esta bacteria forma un cuerpo parasporal cristalino (Salama *et al.*, 1984) que es tóxico para larvas de Lepidoptera (Maddox, 1975; Mardan y Harein, 1984). Estos cuerpos parasporales han sido obtenidos en forma relativamente pura, libre de esporas y restos celulares y causan parálisis en dichas larvas al ser aplicados en ellas (Heimpel y Angus, 1963).

La proteína de los cristales es termolábil, insoluble en agua y solventes orgánicos, excepto en condiciones alcalinas. Su principal agente activo es la 'endotoxina delta' (Ware, 1978). Otras sustancias tóxicas son la exotoxina termoestable o 'exotoxina beta', la cual es responsable de algunos efectos teratógenos en larvas

sobrevivientes, antibiótico bacilogénico, lecitinasa y fosfolipasas (Heimpel y Angus, 1963; Ware, 1978).

Usos de Bacillus thuringiensis

La mayoría de los insectos susceptibles a *B. thuringiensis* son estados larvarios de Lepidoptera y algunas especies de Coleoptera y Diptera (Heimpel y Angus, 1963; Burgerjon y Martouret, 1971). Las larvas de Lepidoptera son las más afectadas por esta bacteria y de más de 200 especies estudiadas sólo muy pocas son tolerantes (Heimpel y Angus, 1963; Mardan y Harein, 1984). Algunas especies relativamente susceptibles han sido encontradas en los órdenes Hymenoptera (*Caliroa cerasi* L., Tenthredinidae) (Silva *et al.*, 1981), Coleoptera (*Epicauta pilme* (Meloidae) (Arretz, 1976), *Callosobruchus chinensis* (Bruchidae), *Tribolium* spp. (Tenebrionidae) (Singh y Hori, 1979), Orthoptera (*Dichroplus maculipennis*, Acrididae) y Diptera (*Musca domestica*, Muscidae) (Gingrich y Eschle, 1971; Arretz, 1976) y diversas especies de zancudos y simúlidos (Goldberg y Margalit, 1977; Dulmage *et al.*, 1985).

Un uso interesante de la exotoxina termoestable que se libera al medio de cultivo durante el proceso de producción de *B. thuringiensis* es su incorporación al alimento de animales domésticos. Esta exotoxina controla varias larvas de moscas, incluida *Musca domestica*, cuando se encuentra en concentración suficiente en los excrementos de dichos animales domésticos (Gingrich y Eschle, 1971).

En Chile se han efectuado diversos ensayos que han demostrado la eficacia y selectividad de *B. thuringiensis* contra cuncunillas en varios cultivos, incluyendo fréjoles, alfalfa, repollo y frutillas (Arretz *et al.*, 1975; Arretz, 1976; Merino y Arretz, 1976; Pacheco y Arretz, 1977).

Selectividad

Las principales ventajas del uso de entomopatógenos son su seguridad y especificidad. En particular, *B. thuringiensis* es inocuo en insectos benéficos tales como polinizadores, parasitoides y predadores, y no afecta a animales homeotermos, incluyendo al hombre (Maddox, 1975). Tampoco presenta fitotoxicidad ni período de carencia (período entre aplicación y cosecha).

*El *Bacillus popilliae* Dutky se trajo a Chile en 1946 para el control de larvas de *Hylamorpha*, *Phytoloemus* y otros Escarabeidos en el Sur de Chile, y se trabajó con éxito con este bactericida durante unos 10 años en Temuco.

Modo de acción

Bacillus thuringiensis mata insectos por septicemia (Maddox, 1975; Ware, 1978), la que se debe a la ruptura de las células del mesenteron luego de un cambio en el pH de sus contenidos (Heimpel y Angus, 1963).

El cuerpo parasporal cristalino característico de esta bacteria causa parálisis en las larvas. El desarrollo de esta parálisis es relativamente rápido y dependiendo de la especie, el insecto queda completamente incapacitado luego de 80 minutos de haber ingerido estos cristales (Heimpel y Angus, 1963).

Muchas larvas de lepidópteros son susceptibles sólo a la acción tóxica de los cristales, mientras que otras lo son a la acción combinada de esporas y cristales; unas pocas larvas de lepidópteros y algunas de himenópteros son afectadas sólo por las esporas de *B. thuringiensis* (Burgerjon y Martouret, 1971). Las especies de lepidópteros susceptibles sólo a cristales se dividen en 2 tipos, presentando ambos parálisis intestinal unos pocos minutos luego de ingerir cristales. El tipo I desarrolla una parálisis general y muere después de 1-7 horas. El tipo II no desarrolla parálisis general y muere después de 2-4 días de haber ingerido cristales. La mayoría de los insectos susceptibles pertenecen al tipo II. En ambos tipos el primer síntoma es el cese de la alimentación (Heimpel y Angus, 1959; Maddox, 1975).

La actividad del cristal depende del pH del estomodeo y mesenteron de la larva y de la acción de enzimas proteolíticas en el tracto digestivo. Las larvas de lepidópteros que tienen un pH intestinal fuertemente alcalino (sobre 8,9) y un sistema enzimático de acción proteolítica selectivo en medio alcalino son susceptibles al cristal. El cristal mismo es una protoxina, la que al ser activada por hidrólisis enzimática libera proteínas solubles que son directamente tóxicas (Lecadet y Martouret, 1967; Faust, 1974).

Durante el desarrollo de la parálisis hay un incremento progresivo de la alcalinidad de la hemolinfa, la que se cree ocurre debido a que la proteína del cristal actúa alterando la permeabilidad del epitelio del mesenteron de modo que se produce un equilibrio entre el grado de acidez del contenido intestinal altamente esta-

ble (tamponado; pH 10,2-10,5) y el de la hemolinfa relativamente poco estable (pH 6,8).

El aumento de alcalinidad causa daño al epitelio intestinal. La parálisis del tracto digestivo está acompañada por una disminución de la alcalinidad al punto en el cual la germinación y multiplicación vegetativa de esporas causan la muerte por septicemia (Heimpel y Angus, 1963), luego de haber entrado a la cavidad hemocélica (Maddox, 1975).

Síntomas en larvas

La larva que ha ingerido *B. thuringiensis* muestra típicamente una disminución del apetito hasta dejar de alimentarse, permaneciendo inactiva e inmóvil durante un período variable, dependiendo de factores ambientales tales como temperatura, humedad, tipo de alimento, etc., y del vigor y edad de la larva (Sweetman, 1958; Heimpel y Angus, 1963; Dulmage *et al.*, 1985). La inactividad es continuada por descargas líquidas orales y anales, y finalmente por la muerte del insecto (Arretz *et al.*, 1975). Las larvas sobrevivientes presentan crecimiento retardado y un período de desarrollo prolongado (Mardan y Harein, 1984). Después de la muerte el cuerpo se oscurece rápidamente, hasta tomar un color café oscuro y se deforma. Los tejidos internos se descomponen en un fluido viscoso y generalmente de mal olor, el cual contiene innumerables organismos bacterianos (Sweetman, 1958).

Efectos teratógenos

En algunos experimentos con dosis reducidas de *B. thuringiensis* se interfiere el metabolismo de los insectos durante el estado de pupa. Los adultos emergentes son de menor tamaño, deformes, sin partes bucales y a veces no pueden salir de la envoltura pupal y extender sus alas (Arretz *et al.*, 1975; Mardan y Harein, 1984).

Bacterias relacionadas con *Bacillus thuringiensis*

Otras bacterias patógenas relacionadas con esta bacteria son *B. thuringiensis* var. *israelensis* y *B. sphaericus*, las cuales son patógenas de larvas de zancudos y simúlidos (Goldberg y Margalit, 1977; DesRochers y García, 1983; García *et al.*, 1983; Dulmage *et al.*, 1985).

Bacillus sphaericus fue reconocido como patógeno de zancudos en California en 1965. Desde entonces se han aislado diversas razas patógenas en diferentes países que parecen afectar a una gran variedad de mosquitos, particularmente del género *Culex*. La raza "1593" de *B. sphaericus* no ha presentado efectos adversos en crustáceos, efeméridos, quironómidos, hemípteros, coleópteros, odonatos, simúlidos y en el pez predator de mosquitos *Gambusia affinis* (Bair & Girard) (Mulligan *et al.*, 1978; Singer, 1979). De gran interés es la capacidad de *B. sphaericus* de desarrollarse en aguas de desecho (Hertlein *et al.*, 1979). Esta característica aumenta la posibilidad de control de zancudos en hábitats en los cuales muchos insecticidas sintéticos, así como *B. thuringiensis* var. *israelensis*, son esencialmente inefectivos. Además, *B. sphaericus* parece ofrecer automantenimiento y acción larvicida subsecuente durante períodos relativamente prolongados luego de la introducción original. La acumulación de cadáveres de zancudos y larvas en aguas de desecho en California ha contribuido a aumentar la mortalidad de *C. pipiens* en forma dramática (DesRochers y García, 1983).

Aplicación

Las aplicaciones repetidas de un patógeno utilizado de manera similar a insecticidas químicos para la reducción temporal de poblaciones de insectos, pueden ser consideradas como insecticidas microbianos. Estos pueden ser aplicados en aspersiones, espolvoreos, en cebos, o en combinación con otros patógenos, muchos insecticidas organosintéticos, quimioesterilizantes y feromonas (Maddox, 1975). La microgota asperjada, o el tamaño de partícula espolvoreada, su depósito, cubrimiento y pérdida de los insecticidas microbianos, así como las propiedades de los equipos de aplicación que afectan estas características, son muy importantes, pero no han sido estudiadas en detalle (Falcon, 1971). En general, se obtienen mejores resultados si los insecticidas microbianos son aplicados sobre estados tempranos de desarrollo del insecto (Maddox, 1975; Mardan y Harein, 1984). Algunas larvas de lepidópteros son repelidas por alimento tratado con diversas formulaciones de *B. thuringiensis*, lo que representa un menor nivel de daño (Mardan y Harein, 1984; McGaughey, 1980).

Los insecticidas microbianos son generalmente más efectivos a temperaturas mayores. A estas temperaturas los insectos consumen más alimento, con lo que ingieren mayor cantidad de patógeno. Además, a temperaturas relativamente altas, los agentes patógenos se desarrollan más rápidamente (hasta cierto punto de inactivación) (Maddox, 1975).

Un adecuado cubrimiento y distribución son necesarios para asegurar la ingestión del patógeno por las larvas. El equipo de aplicación debe ser ajustado de manera de proporcionar cubrimiento en el envés de las hojas del cultivo. Si el insecto es de hábito nocturno, la aplicación de insecticidas microbianos debe efectuarse al atardecer de manera de permitir la ingestión del agente patógeno antes de la exposición a la luz solar directa. La luz solar directa es dañina para la mayoría de los patógenos de insectos (Brand *et al.*, 1975; Maddox, 1975; Pinnock *et al.*, 1975; Leong *et al.*, 1980; Lynch *et al.*, 1980).

Combinaciones de *Bacillus thuringiensis* e insecticidas organosintéticos

Los efectos de combinaciones de patógenos e insecticidas han sido revisados por Benz (1971).

El uso combinado de *B. thuringiensis* con insecticidas organosintéticos depende de su compatibilidad. Las esporas de una bacteria representan su forma más resistente, por lo que Salama *et al.*, (1984) estudiaron el efecto de diversos insecticidas químicos en la esporulación de *B. thuringiensis* var. *entomocidus* (HD-355). En el grupo de los organofosforados, profenofos inhibió la esporulación en mayor grado que phoxim. El grupo de los piretroides representado por fenvalerate, cypermethrin y permethrin fue generalmente de menor efecto en la esporulación que los compuestos organofosforados y carbamatos. Entre los carbamatos estudiados carbaryl tuvo mayor efecto negativo en la esporulación que methomyl. Estos autores también evaluaron los efectos de formulaciones seleccionadas de la bacteria en combinación con insecticidas sobre el gusano de la hoja del algodón, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) en Egipto. Los piretroides y la mayoría de los compuestos organofosforados estudiados potenciaron la actividad de *B. thuringiensis* vars. *galleriae* (HD-129) y *entomocidus* contra *S. littoralis*. Los carbamatos, el regulador de crecimiento diflubenzuron y

una combinación de methomyl y diflubenzuron presentaron un efecto aditivo al ser aplicados en forma conjunta con *B. thuringiensis*. Las interacciones sinergizadas sugieren que aplicaciones de piretroides con *B. thuringiensis* pueden representar un método seguro y efectivo para controlar *S. littoralis*.

Investigaciones realizadas por Dougherty *et al.* (1971), Sutter *et al.*, (1971), Morris (1972) y Altahtawy y Abaleess (1972), han indicado que gardona, aldrin, heptacloro, DDT, methomyl, dibromo, paration y carbaryl pueden inhibir el crecimiento de *B. thuringiensis*, no así diazinon, phorate, dieldrin y piretrinas.

El uso de insecticidas químicos en dosis bajas tales como piretroides y algunos compuestos organofosforados en combinación con dosis bajas de formulaciones de *B. thuringiensis* parece ser un método adecuado para controlar plagas, según lo demostrado para *S. littoralis* por Salama *et al.* (1984). Los piretroides afectan rápidamente el sistema nervioso, causando una parálisis y pueden también alterar la permeabilidad de las células del insecto al sodio y potasio y el metabolismo del nitrógeno (O'Brien, 1967). La endotoxina de *B. thuringiensis* causa una rápida parálisis en el mesenteron y una permeabilidad selectiva de su epitelio (Fast y Angus, 1965). De este modo, la condición de stress en el insecto puede ser el resultado de la alta potenciación de *B. thuringiensis* en combinación con piretroides, lo cual permite reducir las dosis bacteria/insecticida, de manera de minimizar la contaminación del medio ambiente y propender a la conservación de parásitos, predadores y otros agentes de control natural. Dosis reducidas significan un menor costo de control (Salama *et al.*, 1984).

Aplicaciones de *B. thuringiensis* en mezclas con clorfenamidina han controlado efectivamente diversas cuncunillas en crucíferas hortícolas, incluyendo *Pieris rapae* (L.), *Plutella xylostella* (L.), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) y *Trichoplusia ni* (Hübner) (Chalfant, 1969; Creighton *et al.*, 1972; Fox *et al.*, 1974; Creighton y McFadden, 1974, 1975).

Bacillus thuringiensis puede también ser aplicado en combinación con otros patógenos, como en el caso de *Heliothis-virus* (Ignoffo *et al.*, 1974; Luttrell *et al.*, 1982) o del virus de la polihedrosis nuclear de *Trichoplusia ni* (McVay *et al.*, 1977; Young *et al.*, 1980).

Determinación de la potencia insecticida de organismos entomopatógenos

La estandarización de insecticidas microbiológicos es muy importante. Si dicha estandarización no es efectuada, la potencia insecticida varía entre partidas, haciendo imposible las recomendaciones de las cantidades de microorganismos patógenos necesarias para obtener un nivel de control de una plaga específica (Maddox, 1975; Dulmage *et al.*, 1985).

La determinación de la potencia de productos con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* se efectúa por medio de bioensayos utilizando la polilla mediterránea de la harina, *A. kuhniella*, el gusano medidor del repollo, *T. ni*, y *Heliothis virescens*. Los resultados son expresados en Unidades Internacionales (U.I.) de actividad. En este sistema todos los productos son comparados con un Estándar Internacional, el cual contiene por definición 1000 U.I./mg (Dulmage *et al.*, 1971, 1976; Burgerjon y Dulmage, 1977; Lewis *et al.*, 1984). Una variedad de *B. thuringiensis*, E-61, ha sido designada como estándar primario de referencia para cada formulación de esta bacteria (Maddox, 1975).

Existen diversas formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* en muchos países. La mayoría son polvos mojables (Biotrol XK WP, Dipel WP, Larvatrol 5D-25W-75W, Sok-Bt WP, Thuricide HP, etc.), aunque hay también suspensiones acuosas de esporas (Amdal 6000, Bactospeine, Sok-Bt LC, Thuricide HPC, etc.). La efectividad de cada formulación se mantiene por años, dependiendo de que las condiciones de almacenamiento sean adecuadas.

LITERATURA CITADA

- ALTAHTAWY, M.M. and I.M. ABALESS. 1972. Compatibility of the bioinsecticide Thuricide 90TS flowable with insecticides used in the chemical control of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Bull. Entomol. Soc. Egypt Ecn. Ser. 3: 209-217.
- ARRETZ, P. 1976. Control biológico de plagas de leguminosas. Investigación Agrícola (Chile) 2: 19-25.
- ARRETZ, P., y J. ARAYA. 1977. Control químico y microbiológico de huevos y larvas de *Pieris brassicae* L. Ibid. 3: 69-73.
- ARRETZ, P., J. ARAYA y M. AVENDAÑO. 1975. Control de la polilla del fréjol, *Epinotia aporema* Wals., con *Bacillus thuringiensis* Berliner. Ibid. 1: 183-190.

- BENZ, G. 1971. Synergism of microorganisms and chemical insecticides: 327-355 in, Burgess, H.D., and N.W. Hussey (eds.), *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, New York. 861 pp.
- BISCHOP, E.J., T.J. HELMS, and K.A. LUDWIG. 1973. Control of bagworm with *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 66: 675-676.
- BRAND, R.J., D.E. PINNOCK, K.L. JACKSON, and J.E. MILSTEAD. 1975. Methods for assessing field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. *J. Invertebr. Pathol.* 25: 199-208.
- BUCHER, G.E. 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. *J. Insect Pathol.* 2: 172-195.
- BURGERJON, A., and H. DULMAGE. 1977. Industrial and international standardization of microbial pesticides. I. *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* 22: 121-129.
- BURGERJON, A., and D. MARTOURET. 1971. Determination and significance of the host spectrum of *Bacillus thuringiensis*: 305-325 in, Burgess, H.D. and N.W. Hussey (eds.), *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, New York. 861 pp.
- CHALFANT, R.B. 1969. Control of the cabbage looper and diamond back moth caterpillar on cabbage and collards in Southern Georgia. *J. Georgia Entomol. Soc.* 4: 65-74.
- CREIGHTON, C.S. and T.L. McFADDEN. 1974. Complementary actions of low rates of *Bacillus thuringiensis* and chlordimeform hydrochloride for control of caterpillars on cole crops. *J. Econ. Entomol.* 67: 102-104.
- . 1975. Cabbage caterpillars: efficacy of chlordimeform and *Bacillus thuringiensis* in spray mixtures and comparative efficacy of several chemical and *B. thuringiensis* formulations. *Ibid.* 68: 57-60.
- CREIGHTON, C.S., T.L. McFADDEN, R.B. CUTHBERT, and J.A. ONSAGER. 1972. Control of four species of caterpillars on cabbage with *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*, 1969-1970. *Ibid.* 62: 1399-1402.
- DESROCHERS, B., and R. GARCÍA. 1983. The efficacy of *Bacillus sphaericus* in controlling mosquitoes breeding in sewer effluent. *Proc. California Mosquito and Vector Control Association* 51: 35-37.
- DOUGHERTY, E.M., C.F. RICHELDERFER, and R.M. FAUST. 1971. Sensitivity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to various insecticides and herbicides. *J. Invertebr. Pathol.* 17: 292-293.
- DUBOIS, N.R. 1981. *Bacillus thuringiensis*. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1584: 445-454.
- DULMAGE, H.T., O.P. BOENING, C.S. REHNBERG, and G.D. HANSEN. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 240-245.
- DULMAGE, H.T., A.J. MARTÍNEZ, and T. PEÑA. 1976. Bioassay of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) delta-endotoxin using the tobacco budworm, U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. No 1528.
- DULMAGE, H.T., R.E. McLAUGHLIN, L.A. LACEY, T.L. CONCH, R.T. ALLS, and R.I. ROSE. 1985. HD-968-S-1983, a proposed U.S. standard for bioassays of preparations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*-H-14. *Bull. Entomol. Soc. Amer.* 31: 31-34.
- FALCON, L.A. 1971. Microbial control as a tool in integrated control programs: 346-364 in, Huffaker, C.B. (ed.), *Biological Control*. Plenum Press, New York.
- FAST, P.G., and T.A. ANGUS. 1965. Effects of parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* Ishiwata on the permeability of the gut wall of *Bombyx mori* (Linn.) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 20-32.
- FAUST, R.M. 1974. Bacterial diseases: 87-183 in, Cantwell, G.E. (ed.), *Insect Diseases*. Marcel Dekker, New York.
- FOX, C.J.S., T.H. HALIBURTON, K.P. BUTLER, and F. HUSTON. 1974. Control of caterpillars on cabbage with chemical and biological insecticides. *Phytoprotection* 53: 82-86.
- GARCÍA, R., B. DESROCHERS, W. TOZER, and J. McNAMARA. 1983. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Serotype H₁₄) for mosquito control. *Proc. California Mosquito and Vector Control Association* 51: 25-29.
- GINGRICH, R.E., and J.L. ESCHLE. 1971. Susceptibility of immature house flies to toxins of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 64: 1183-1188.
- GOLDBERG, L.J., and J. MARGALIT. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37: 355-358.
- HEIMPEL, A.M., and T.A. ANGUS. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in lepidopterous larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 22: 80-85.
- . 1963. Diseases caused by certain sporeforming bacteria: 21-73 in, Steinhaus, E.A. (ed.), *Insect Pathology*, Vol. 2. Academic Press, New York. 689 pp.
- HERTLEIN, B.C., R. LEVY, and T.W. MILLER, JR. 1979. Recycling potential and selective retrieval of *Bacillus sphaericus* form soil in a mosquito habitat. *J. Invertebr. Pathol.* 33: 217-221.
- IGNOFFO, C.M., D.L. HOSTETTER, and R.E. PINNELL. 1974. Stability of *Bacillus thuringiensis* and *Baculovirus heliothis* on soybean foliage. *Environ. Entomol.* 3: 117-119.
- LECADET, M.M., and D. MARTOURET. 1967. Enzymatic hydrolysis of the crystal of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 322-330.
- LEONG, K.L.H., R.J. CANO, and A.M. KUBINSKI. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. *Environ. Entomol.* 9: 593-599.
- LEWIS, F.B., G.S. WALTON, J.B. DIMOND, O.N. MORRIS, B. PARKER, and R.C. REARDON. 1984. Aerial application of Bt against spruce budworm: 1982 Bt cooperative field tests-combined summary. *J. Econ. Entomol.* 77: 999-1003.
- LUTTRELL, R.G., W.C. YEARIAN, S.Y. YOUNG, and D.L. HORTON. 1982. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* - spray adjuvant viral insecticide combinations against *Heliothis* spp. *Environ. Entomol.* 11: 783-787.
- LYNCH, R.E., L.C. LEWIS, and E.C. BERRY. 1980. Application efficacy and field persistence of *Bacillus thuringiensis* when applied to corn for European corn borer control. *J. Econ. Entomol.* 73: 4-7.
- MADDOX, J.V. 1975. Use of disease in Pest Management. Chapter 6: 189-223 in, Metcalf, R.L., and W.H. Luckman (eds.), *Introduction to Insect Pest Management*. John Wiley & Sons, New York. 587 pp.
- MARDAN, A.M., and P.K. HAREIN. 1984. Susceptibility of a malathion - resistant strain of indianmeal moths (*Lepi-*

- doptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 77: 1260-1263.
- MCGAUGHEY, W.H. 1980. *Bacillus thuringiensis* for moth control in stored wheat. Can. Entomol. 112: 327-331.
- MCVAY, J., R.R.T. GUDAUSKS, and J.D. HARPER. 1977. Effects of *Bacillus thuringiensis*-nuclear polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. J. Invertebr. Pathol. 29: 367-372.
- MERINO, C., y P. ARRETZ. 1976. Plagas de la frutilla, III. Control químico y microbiológico de gusanos cortadores y moluscos. Investigación Agrícola (Chile) 2: 81-86.
- MORRIS, O.N. 1972. Susceptibility of some forest insects to mixtures of commercial *Bacillus thuringiensis* pathogen to the insecticides. Can. Entomol. 104: 1414-1415.
- MULLIGAN, F.S., C.H. SCHAEFER, and T. MIURA. 1978. Laboratory and field evaluation of *Bacillus sphaericus* as a mosquito control agent. J. Econ. Entomol. 71: 774-777.
- O'BRIEN, R.D. 1967. Insecticides, action and metabolism. Academic Press, New York.
- PACHECO, F., y P. ARRETZ. 1977. Evaluación del control químico y microbiológico de *Rachiplusia nu* (Guenée) en fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante dos criterios de aplicación. Investigación Agrícola (Chile) 3: 85-89.
- PINNOCK, D.E., R.J. BRAND, J.E. MILSTEAD, and K.L. JACKSON. 1975. Effect of three species on the coverage and field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. J. Invertebr. Pathol. 25: 209-214.
- SALAMA, H.S., M.S. FODA, F.N. ZAKI, and S. MOAWAD. 1984. Potency of combinations of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 77: 885-890.
- SILVA, J.C., P. ARRETZ, y J. ARAYA. 1981. Control selectivo del chape del cerezo, *Caliroa cerasi* L. (Hymenoptera, Tenthredinidae). Investigación Agrícola (Chile) 6: 27-32.
- SINGER, S. 1979. Bacteria: Potential of *Bacillus sphaericus* and sporeforming bacteria for pest control: 283-298 in, Burgess, H.D. (ed.), Microbial Control of Insects and Mites, 2. Academic Press, London.
- SINGH, D.R., and K. HORI. 1979. A laboratory study of the effectiveness of certain bacteria on storage pests. Res. Bull. Obihiro Univ. 11 (3): 463-468.
- STEINHAUS, E.A. 1958. Stress as a factor in insect disease. Proc. 10th. Int. Congr. Entomol., Montreal, 1956, 4: 725-730.
- SUTTER, G.R., A.D. ABRAHAMSON, E.W. HAMILTON, and I.D. BICK. 1971. Compatibility of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* and chemical insecticides. I. Effect of insecticides on bacterial replication rate. J. Econ. Entomol. 64: 1348-1350.
- SWEETMAN, H.L. 1958. The principles of biological control. Interrelations of hosts and utilization in regulation of animal and plant populations: 30-41. W.M.C. Brown Co., Publishers. 560 pp.
- THOMPSON, C.G., J. NEISESS, and H.O. BATZER. 1977. Field tests of *Bacillus thuringiensis* and aerial application strategies on western mountainous terrain. USDA Forest Serv. Research Paper PNW-230. 12 pp.
- WARE, G.W. 1978. The Pesticide Book. Ed. by W.H. Freeman and Co., San Francisco. 197 pp.
- YOUNG, S.Y., L.A. MCCAUL, and W.C. YEARIAN. 1980. Effect of *Bacillus thuringiensis* - *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis virus mixtures on the cabbage looper *Trichoplusia ni*. J. Georgia. Entomol. Soc. 15: 1-8.