

Evaluación de la toxicidad/patogenicidad de una formulación de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bactivec)

Mancebo A*, González Navarro B, Riera L, Lugo S, González Torres Y, Arteaga ME y Fuentes D

Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. Finca Tirabeque, Carretera El Cacahual Km 2^{1/2}, Bejucal, Habana, Cuba. Fax: (537) 57 93 20. e-mail: cetex@cenpalab.inf.cu, mail@cenpalab.inf.cu.

Recibido 1 de Marzo de 2002 / Aceptado 11 de Marzo de 2003

Resumen: Existen varios agentes microbianos, incluyendo hongos, protozoos, virus y bacterias, que han sido utilizados como mosquitocidas. No obstante, entre esos agentes, el *Bacillus thuringiensis* es el más potente y ha sido el más ampliamente utilizado. El Bactivec es un biolarvicide producido en Cuba, que contiene *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* como agente activo. Con el objetivo de evaluar su toxicidad/patogenicidad, se administró el Bactivec en una dosis única de 5×10^8 unidades formadoras de colonias por vía oral a ratas, y por vía dérmica a dos grupos de conejos albinos, uno recibiendo una dosis de Bactivec de 1×10^9 unidades formadoras de colonia por animal, y el otro una dosis de 9.2×10^8 de unidades formadoras de colonia de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* por animal. En ambos ensayos las observaciones clínicas fueron diarias, y se evaluó el comportamiento del peso corporal. Además, en el ensayo por vía oral se estimó el aclaramiento mediante recolección de las heces fecales, y se evaluó la infectividad mediante toma de muestras de fluidos y órganos. Al final de los ensayos se realizó la necropsia a todos los animales. No ocurrieron mortalidades, ni evidencias de patogenicidad o toxicidad relacionada con el tratamiento en ninguno de los ensayos. En el ensayo de toxicidad/patogenicidad aguda oral se obtuvo que el microorganismo fue eliminado rápidamente sin provocar infección significativa. Se concluyó que el Bactivec no es patógeno por las vías oral y dérmica a las dosis evaluadas.

Palabras clave: Bactivec, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, toxicidad, patogenicidad, infectividad.

Abstract: Toxicity/pathogenicity evaluation of a *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* formulation (Bactivec). There are a number of microbial agents, including fungi, protozoa, viruses and bacteria, which act as mosquitocidal agents. However, among these agents, *Bacillus thuringiensis* is the most potent and widely used. Biolarvicide Bactivec is produced in Cuba and possesses the active biological agent, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. In order to evaluate its toxicity/pathogenicity, single dose administration of Bactivec was carried out to rats by oral route (dose of Bactivec: (5×10^8) colony-forming units) and to two groups of albino rabbits, by dermal application 1×10^9 colony-forming units per animal; dose of *Bacillus thuringiensis*

var *israelensis*: 9.2×10^8 colony-forming units per animal). In both assays, clinical examinations were performed daily after the administration, evaluating the animal body-weight gain. In the oral assay, clearance was estimated by collecting faeces and infectivity was evaluated by collecting samples of organs and corporal fluids. A gross necropsy of all of the animals was performed at the end of the study. There was no mortality or evidence of pathogenicity or treatment-related toxicity in either test (oral and dermal). In the acute oral toxicity/pathogenicity test, microorganism clearance was rapid, without causing any significant infection. It was concluded that, at the tested doses, Bactivec is not pathogenic following oral or dermal administration.

Key words: Bactivec, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, toxicity, pathogenicity, infectivity.

Introducción

El control de plagas de insectos con plaguicidas químicos ha generado varios problemas, incluyendo la resistencia a los insecticidas, desarrollo de plagas secundarias normalmente mantenidas bajo control por enemigos naturales, riesgos de seguridad para el hombre y los animales domésticos, contaminación del agua, decrecimiento en la biodiversidad, y otros problemas ambientales [1, 2]. El uso alternativo de los organismos entomopatógenos para el control microbiano, más allá del aspecto de la eficacia y los costos, incluye numerosas ventajas, como seguridad para los humanos y organismos no diana, reducción de residuos de plaguicidas en los alimentos, y aumento de la actividad de la mayoría de los demás enemigos naturales de la plaga a controlar [1].

El agente microbiano para el control biológico más ampliamente utilizado es el *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), con una historia de más de 40 años de uso [3]. La efectividad de la variedad *israelensis* hacia varios géneros de insectos ha sido probada ampliamente [4-7]. A pesar del reconocimiento a la seguridad en el uso de los agentes en base al *B. thuringiensis*, la evaluación toxicológica de éstos es un requisito de carácter obligatorio [8].

Los ensayos de seguridad requeridos para el registro de productos microbianos de *Bt* han evolucionado a través de los años, basado en revisiones de la EPA de estudios completos de toxicidad

* A quien dirigir la correspondencia.

dad/patogenicidad [9,10]. Mientras que en los primeros productos microbianos desarrollados sobre *Bt* se realizaron estudios subcrónicos y crónicos, la EPA decidió posteriormente que la evaluación del riesgo por exposición aguda es suficiente para valorar la seguridad de nuevos productos de *Bt*. Los ensayos de toxicidad/patogenicidad aguda oral y dérmica están incluidos en el Nivel 1 de evaluación toxicológica de los Agentes Microbianos para el Control de Plagas (AMCP), que tiene el propósito de valorar la patogenicidad, infectividad/persistencia inusual, y toxicidad de estos productos [11].

La sustancia de ensayo evaluada en nuestro estudio fue el Bactivec, biolarvícida líquido que contiene como agente biológico activo esporas y proteínas cristalinas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*), siendo efectivo para el control de las larvas de los mosquitos. Su acción se produce por ingestión, produciendo parálisis intestinal y envenenamiento por la acción de la endotoxina liberada a partir de las proteínas cristalinas producidas por las esporas de la bacteria. Destruye las larvas de los mosquitos entre la primera y tercera etapa de vida entre las 24 y 48 horas después de la ingestión, permaneciendo en el medio un período de 15 a 90 días, dependiendo del tipo de criadero y la especie a controlar.

Material y Métodos

Los estudios se realizaron cumpliendo las normas internacionales [12], y lo establecido en el cuidado y uso de animales de laboratorio [13, 14].

Local experimental

Los ensayos se realizaron en salas protegidas herméticas, con aire climatizado y ultrafiltrado por filtros HEPA. Poseen una autoclave de doble puerta, además de contar con un dispositivo de Transferencia Rápida Estéril (DPTE) para la entrada de materiales que no pueden ser esterilizados por calor como la sustancia de ensayo. La temperatura de las salas fue 22 ± 3 °C, la humedad relativa del 50-65 %, y el fotoperíodo 12:12 luz/oscuridad.

Toxicidad/patogenicidad aguda oral

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dawley con calidad higiénico sanitaria SPF. Se emplearon 36 ejemplares jóvenes y adultos de ambos sexos, de 7 semanas de edad, con peso promedio de 180.98 g en las hembras y de 201.33 g en los machos. Previo al comienzo del ensayo, se estableció un tiempo de aclimatación de 7 días.

Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales se alojaron durante el período de aclimatación y en el estudio, en cajas plásticas de policarbonato tipo T4, con fondo de rejilla sin encamado. El alimento (EMO 1002, ALYCo®) y el agua fueron esterilizados por vapor húmedo en Autoclave SAKURA FOA 24 de doble puerta, incluida en la barrera de la sala protegida, y suministrados *ad libitum*.

Grupos experimentales y dosificación

Los animales se distribuyeron en 4 grupos, a dos de los cuales se les administró la sustancia de ensayo: sacrificios intermedios (9 animales por sexo, para análisis de infectividad y aclaramiento), y grupo tratado (3 animales/sexo). Se utilizó un nivel de dosis de 5×10^8 UFC del producto por animal tratado, en dosis única mediante una cánula curva metálica, en un volumen constante de 2 ml por animal. Los grupos autocontrol (alojado junto con los animales del grupo tratado, para análisis de posible transmisión del agente biológico de individuo inoculado a no inoculado) y control, de 3 animales/sexo cada uno, no fueron administrados. El estudio se prolongó durante 21 días tras la administración de la sustancia.

Observaciones clínicas

Los animales fueron observados diariamente. Las observaciones incluyeron, entre otras, cambios en piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora, y patrón de comportamiento. Se prestó atención a la posible ocurrencia de algunos signos como temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación, sueño y coma. Los pesos individuales fueron determinados el día anterior a la administración de la sustancia, a los 3 días, semanalmente, y a la muerte, sacrificio intermedio o final.

Análisis de infectividad

Para la evaluación de la infectividad del *Bti* (capacidad del microorganismo de reproducirse en el cuerpo del hospedero), se realizaron sacrificios de 3 animales/sexo del grupo sacrificios intermedios en los días 3, 7 y 14, para tomar muestras de órganos, análisis efectuado también en los animales de los grupos tratado y autocontrol al finalizar el ensayo. En estas muestras, correspondientes a riñones, cerebro, hígado, bazo, pulmones, sangre y nódulos linfáticos, se realizó el conteo del *Bti* mediante recuento de viables, cultivándose en Agar Mac Conkey. A los 3 días se realizó la lectura, contando las colonias típicas crecidas en el medio de cultivo (colonias amarillentas, reseca, medianas).

Aclaramiento

Para estimar la eliminación del *Bti* del cuerpo de las ratas, las heces de los animales del grupo tratado fueron recolectadas a las 3 horas de administrado el producto, y a los días 3, 7, 14, y 21 del ensayo; y procesadas para el recuento de viables, cultivándose en Agar Mac Conkey. A los 3 días se realizó la lectura, contando las colonias típicas crecidas en el medio de cultivo (colonias amarillentas, reseca, medianas).

Patología

El último día del ensayo se sacrificaron los animales del grupo tratado, los controles, y los animales del grupo autocontrol, siendo realizadas necropsias completas. La eutanasia se efectuó mediante dislocación cervical, previa anestesia con éter dietílico. Igual procedimiento se aplicó en los animales del grupo de sacrificios intermedios en los días establecidos.

Análisis estadístico del peso corporal

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS 8.0 para Windows. Se realizaron pruebas de distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y una vez establecida esta, se analizó la homogeneidad de varianza por el test de Levene. Al no obtenerse homogeneidad de varianza en las hembras, se realizó el análisis de ambos sexos mediante pruebas no paramétricas, utilizándose el test U de Mann-Whitney, para muestras aleatorias independientes.

Toxicidad/patogenicidad aguda dérmica

Animales

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda White. Se emplearon 20 ejemplares jóvenes y adultos de ambos sexos, de 12 semanas de edad, con peso promedio de 1,923 kg en las hembras y de 2,067 kg en los machos.

Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de rejilla de acero inoxidable. El alimento (CMO:1400, ALYCo®) y el agua (esterilizada por vapor húmedo húmedo en Autoclave SAKURA FOA 24 de doble puerta, incluida en la barrera de la sala protegida) fueron suministrados *ad libitum*.

Grupos experimentales y dosificación

Los animales se distribuyeron en 2 grupos de 5 animales/sexo en salas independientes. 24 horas antes del inicio del ensayo, el pelo fue removido de las áreas dorsal y ventral del lomo de cada animal, asegurándose el 10% del área de la superficie corporal. A un grupo se le aplicó 4 ml de Bactivec por animal de ensayo (2.5×10^8 UFC/ml), y al otro 4 ml de una suspensión de *Bti* (2.3×10^8 UFC/ml). Las sustancias se mantuvieron en contacto con la piel por 24 horas, mediante gasa porosa y cinta no irritante. En ambos grupos, se utilizó la piel no tratada como control. El estudio se prolongó por 14 días tras la aplicación de las sustancias.

Observaciones clínicas

Los animales se observaron diariamente. Las observaciones incluyeron, entre otras, cambios en piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso

central y autónomo, actividad somatomotora y patrón de comportamiento. Se prestó atención a la posible ocurrencia de algunos signos como temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación, sueño y coma. Los pesos individuales fueron determinados poco antes de la aplicación de las sustancias y a los 7 y 14 días.

Patología

Al término de 14 días tras la aplicación de las sustancias, a todos los animales se les practicó la eutanasia mediante contusión y desangramiento, y se realizaron necropsias completas.

Resultados

Tanto en la vía dérmica como por la oral no se reportaron muertes, ni signos clínicos de toxicidad debidos a la administración o aplicación de la sustancia de ensayo. El comportamiento de los animales fue el normal para cada especie, conservando sus hábitos y características [14].

En el estudio por vía oral, se detectó la excreción del producto el día 3 después de la administración; no se obtuvo aislamiento del *Bti* en las heces fecales en los demás días (Tabla 1). Con respecto al estudio de la infectividad, la tabla 2 refleja el resultado del recuento del producto en los órganos de los animales de sacrificios intermedios, donde se aprecia la muy escasa y aislada infectación de las ratas, demostrándose ésta sólo en el 3er día del ensayo, no siendo aislado el microorganismo en los días posteriores. Con relación a los animales del grupo autocontrol, alojados junto con los tratados, los resultados mostraron la no infectación de los mismos.

Los gráficos 1 y 2 reflejan las curvas ponderales en el ensayo de toxicidad aguda oral, donde se aprecia el paralelismo de estas; además, el análisis estadístico (Test U de Mann-Whitney) no arrojó diferencias significativas entre los grupos tratado y autocontrol para ninguno de los sexos. El gráfico 3 refleja el paralelismo de las curvas ponderales en el ensayo agudo dérmico, en el que el aumento de peso de los animales fue constante durante el ensayo y se corresponde con lo establecido para esta especie [14].

Discusión

Existe numerosa información sobre la evaluación de la toxicidad del *Bt* en humanos y otros mamíferos, siendo considerado prác-

Tabla 1. Resultados del aclaramiento.

Animal		Tiempo de toma de muestras				
		3 Horas	3 Días	7 Días	14 Días	21 Días
Hembras	1	0	2.5×10^2	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	2.5×10^4	0	0	0
Machos	1	0	0	0	0	0
	2	0	5×10^3	0	0	0
	3	0	2.5×10^4	0	0	0

Tabla 2. Recuento del producto en el grupo de sacrificios intermedios el día 3.

Grupo	Animal	Riñón	Cerebro	Hígado	Bazo	Pulmón	Sangre	Nódulos linfáticos
Día 3	Hembras	1	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0
Machos	1	0	0	2.5×10^2	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	2.5×10^2	3×10^4
	3	0	0	0	0	0	0	7.5×10^2

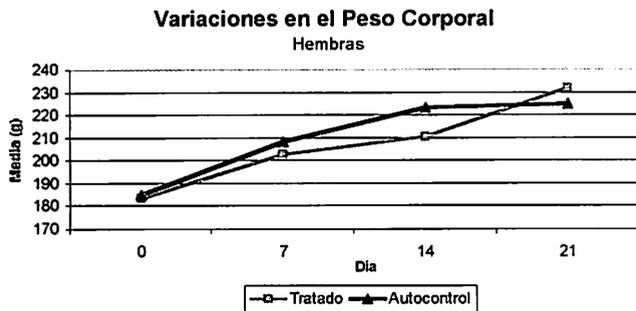


Fig. 1. Comportamiento del peso corporal en el ensayo de toxicidad/patogenicidad aguda oral. Hembras.

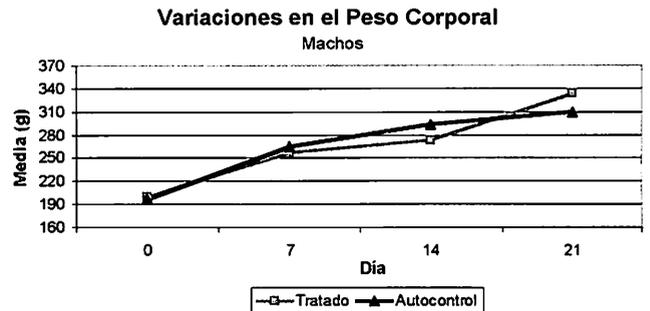


Fig. 2. Comportamiento del peso corporal en el ensayo de toxicidad/patogenicidad aguda oral. Machos.

ticamente no tóxico, lo cual ha propiciado que la EPA considere la exposición dietaria a sus residuos, como no dañina para los humanos [9]. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud considera que estos productos no constituyen riesgo para el hombre u otros vertebrados [15].

Humanos adultos voluntarios expuestos a dosis diarias de 1000 mg ó 1×10^{10} esporas de *Bt* durante 3 días, no mostraron toxicidad/infectividad y todos los cultivos de sangre resultaron negativos [16, 17]. La administración por vía oral a ratas de dosis mayores de 1.2×10^{11} esporas de *Bti/g*, no arrojó toxicidad, mientras que un estudio de administración diaria oral durante 13 semanas de más de 4000 mg/kg, tampoco mostró signos de toxicidad [17]. Otros estudios sobre algunas variedades de *Bt*, utilizando igualmente la exposición oral en ratas, arrojaron resultados similares [17-19].

En nuestro ensayo oral, se demostró una muy escasa presencia de la bacteria en los tejidos y órganos analizados, lo cual se relaciona a su vez con la rápida eliminación observada en el aclaramiento. Resultados similares obtuvieron Siegel y Shadduk, los cuales encontraron que el *Bti* no persiste en el sistema digestivo de los mamíferos que lo ingieren [20]. Otros investigadores refieren que tras la ingestión del *Bt* este no se distribuye sistémicamente, sino que se mantiene confinado en el tracto gastrointestinal, de donde es aclarado [17].

Nuestros resultados en el ensayo dérmico, en el cual no se obtuvo toxicidad, coinciden con otros estudios, según los cuales la DL_{50} dérmica para un formulado de *Bt* en conejos fue de 6289 mg/kg, y una simple aplicación dérmica de 7200 mg/kg de *Bt* no fue tóxica para conejos [21]. En otros experimentos la exposición dérmica de ratas a dosis de 4.6×10^{10} UFC/kg arrojó una baja toxicidad, y se encontró que la exposición de conejos a

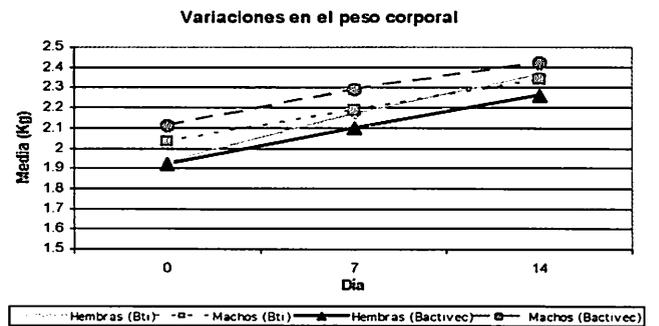


Fig. 2. Comportamiento del peso corporal en el ensayo de toxicidad/patogenicidad aguda dérmica.

varias subespecies de *Bt* causó una moderada irritación dérmica [17].

Los resultados obtenidos concuerdan con la alta especificidad del *Bt*, dada por su mecanismo de acción. Durante la esporulación, *Bt* produce inclusiones cristalinas que contienen una o más proteínas llamadas delta-endotoxinas (proteínas Cry) [22]. Esos cristales se disuelven en el pH alcalino del intestino del insecto, y las protoxinas son liberadas y proteolíticamente activadas en un fragmento tóxico. Esa toxina se liga a un receptor específico de alta afinidad en las células epiteliales del intestino y se inserta parcialmente en la membrana celular, generando poros. Esto resulta en la lisis de las células epiteliales del intestino y, por último, conlleva a la muerte del insecto [22, 23].

Las proteínas Cry son altamente específicas, por lo que los mamíferos y otras muchas especies no son susceptibles a estas proteínas, lo cual se explica porque las condiciones requeridas

para los diferentes pasos explicados no existen en ellos [24]. Las proteínas Cry requieren pH alcalinos para ser solubles, con valores por encima de 10 para una solubilidad efectiva. En el pH del tracto gastrointestinal de los mamíferos (1, 2), las proteínas Cry tienen una solubilidad extremadamente limitada [24]. Las proteínas Cry deben ser proteolíticamente digeridas hacia la forma insecticida activa, debiendo permanecer activas antes que ser degradadas [25]. Sin embargo, en condiciones de simulación de las condiciones gastrointestinales de los mamíferos en ensayos *in vitro*, los cuales son menos fuertes que el sistema gastrointestinal de humanos y animales, esas proteínas son rápidamente degradadas [26-28]. Por último, se requiere el enlace de las proteínas Cry a los receptores para ejercer alguna actividad [24]. Noteborn *et al.* no detectaron enlazamiento específico de proteínas Cry al tejido del tracto gastrointestinal de ratas y ratones en ensayos *in vivo*. El análisis inmunocitoquímico *in vitro* de secciones del tracto gastrointestinal de ratones, ratas, monos y humano, no reveló sitios de enlace para las proteínas Cry en esos tejidos [29].

Estos resultados, en general, apoyan la seguridad en la ingestión de estas proteínas para humanos y animales debido a: la ausencia de condiciones apropiadas para solubilizar las proteínas Cry; la rápida degradación de estas tras su consumo; y la falta de receptores específicos para las proteínas Cry, los cuales son requeridos para su actividad [25]. Por lo tanto, en nuestros ensayos, resulta lógica la no existencia de efectos tóxicos en los animales de experimentación sometidos a la exposición oral. Asimismo, existía una muy baja probabilidad de que se infectaran las ratas del grupo autocontrol y de que se manifestaran signos por vía dérmica, ya que las proteínas Cry deben ser ingeridas para ser efectivas, no teniendo actividad por contacto [25].

En conclusión, los ensayos realizados, bajo las condiciones experimentales, evaluaciones realizadas y resultados obtenidos, concuerdan en que el Bactivec, cuyo agente biológico activo es el *Bacillus thuringiensis var israelensis*, no es tóxico ni patógeno en los animales evaluados.

Bibliografía

- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 21, 230-248.
- Iyaniwura T (1991) Nontarget and environmental hazards of pesticides. *Rev Environ Health* 9(3):161-76.
- Baum JA, Johnson TB, Carlton BC (1999) *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products. En: *Methods in Biotechnology. Vol 5. Biopesticides: Use and Delivery* (F. R. Hall and J. J. Mean, Eds.), pp. 189-209. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Priest FG (1992) Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 72:357-369.
- Skovmand O, Kerwin J, Lacey LA (2000) Microbial control of mosquitoes and black flies. En: "Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests" (L. A. Lacey and H. K. Kaya, Eds.) pp. 767-785. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Guillet P, Kurtak DC, Pilippon B, Meyer R (1990) Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for onchocerciasis control in West Africa. En: "Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies: Biochemistry, Genetics, and Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*" (H. de Barjac and D. Sutherland, Eds.). pp. 187-201. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NJ.
- Skovmand O, Sanogo E (1999) Experimental formulations of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. *J Med Entomol* Jan; 36(1):62-7.
- U.S. Environmental Protection Agency (2000) Code of Federal Regulations. Protection of Environmental, 40, part 158. Data requirements for registration. USA.
- U.S. Environmental Protection Agency (1998) *EPA Registration Eligibility Decision (RED) Bacillus thuringiensis*, EPA 738-R-98-004, Marzo.
- U.S. Environmental Protection Agency (1998b) (*RED Facts*) *Bacillus thuringiensis*, EPA-738-F-98-001.
- U.S. Environmental Protection Agency (1996) Group C-Toxicology Test Guidelines. En: Series OPPTS 885-Microbial Pesticide Test Guidelines. Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- U. S. Environmental Protection Agency (2000) Good Laboratory Practice Standards. Code of Federal Regulations 40, Chapter I, Part 160.
- World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science (ICLAS) (1998) Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals.
- Universities Federation for Animal Welfare (1999) The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. Seventh Edition. Volume 1, Terrestrial vertebrates. Part 3, Species kept in the laboratory. Blackwell Science Ltd. 1999.
- IPCS (2000) International Programme on Chemical Safety—Environmental Health Criteria 217: *Bacillus thuringiensis*. WHO.
- U.S. Environmental Protection Agency (1986) Pesticide Fact Sheet Number 93: *Bacillus thuringiensis*. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 10-147.
- McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD (1995) A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45, 95-105.
- Carter JN, Baker MN, Denton SM (1993) Acute Oral Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of EG7673, HRC Study Report No. ECO 1/930923. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.
- Carter JN, Liggett MP (1994) Acute Oral Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of EG 7841, HRC Study Report No. ECO 6/942538. Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, England.
- Siegel JP, Shaddock JA (1990) Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* from mammals. *J Econ Entomol* Apr; 83(2):347-55.
- Abbott Laboratories (1982) Toxicology Profile: Dipel, *Bacillus thuringiensis* Insecticide. Chemical and Agricultural Products Division, North Chicago, IL, 10-149.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806 (1998).
- Rajamohan F, Lee MK, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progr. Nucleic Acid Res.* 60, 1-27.
- English L, Slatin SL (1992) Mode of action of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 1-7.

25. Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL (2000) Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, 156–173.
26. Spencer TM, Orozco EM, Doyle RM (1996) Petition for Determination of Non-regulated Status: Insect Protected Corn (*Zeamays L.*) with cry1Ac Gene from *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*. DEKALB Genetics Corporation, October 14, 1986.
27. Noteborn HPJM, Rienenmann-Ploum ME, van den Berg JHJ, Alink GM, Zolla L, Kuiper HA (1994) Consuming transgenic food crops: The toxicological and safety aspects of tomato expressing Cry1Ab and NPTII. En: *ECB6: Proceeding of the 6th European Congress on Biotechnology*. Elsevier, Amsterdam.
28. U.S. Environmental Protection Agency (1995) EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis Subspecies tenebrionis* Cry3A Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences in Potato, May 5, 1995 (Monsanto).
29. Noteborn HPJM, Rienenmann-Ploum ME, van den Berg JHJ, Alink GM, Zolla L, Kuiper HA (1993) Food safety of transgenic tomatoes expressing the insecticidal crystal protein Cry1Ab from *Bacillus thuringiensis* and the marker enzyme APH(39)II. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 58/4b.