

Producción, diseño y evaluación de formulados de *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti*

Fernández-Peña Gabriela¹, Maldonado-Blanco María Guadalupe¹,
Sandoval-Coronado Carlos Francisco¹, Elías-Santos Myriam¹,
Quiroz-Martínez Humberto², Flores-González María del Socorro¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Ave. Pedro de Alba y Ave. Manuel L. Barragán s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, CP 66455.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Entomología. Ave. Pedro de Alba y Ave. Manuel L. Barragán s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, CP 66455.

gaby_fer_p@hotmail.com

Fecha de aceptación: 13 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Se realizó la producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 225 en dos nuevos medios de cultivo solubles a base de (1) jarabe de maíz, sólidos de remojo del maíz y extracto de levadura, y otro (2) a base de harina de semilla de girasol y sacarosa, así como uno de referencia (3) con harina de soya, sólidos de remojo del maíz, melaza y sales minerales. Los extractos insecticidas producidos en los diferentes medios mostraron diferencias en el rendimiento, donde se obtuvo mayor rendimiento (18.9 g/L) en el medio de referencia, sin embargo este extracto resultó menos tóxico que el obtenido en el nuevo medio soluble 1, que mostró la menor CL₅₀ de 0.4712 mg/l a las 48 horas postaplicación. Los formulados granulados resultaron más efectivos que las tabletas contra larvas de *Aedes aegypti*, donde se mostró que los ingredientes de formulación proporcionaron protección a la toxina contra la degradación por la luz UV.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Aedes aegypti*, larvas, formulaciones.

ABSTRACT

The production of bioinsecticide of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 225 was carried on two new culture media based soluble (1) corn syrup, maize steep solids and yeast extract, and another (2) based on sunflower seed meal and sucrose, as well as one reference medium (3) with soybean meal, maize steep solids, molasses and minerals. Insecticidal extracts produced in the different media showed differences in yield, where higher yield (18.9 g / L) was obtained in the reference medium, however this extract was less toxic than that obtained in the new soluble medium 1, which showed lower LC₅₀ of 0.4712 mg / L at 48 hours post-application. The granular formulations were more effective than the tablets against *Aedes aegypti* larvae, where it was shown that the formulation ingredients provided protection to the toxin against degradation by uv light.

Key words: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Aedes aegypti* larvae, formulations.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son insectos que se encuentran distribuidos en todo el mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde las larvas y pupas siempre son acuáticas, (Faust *et al.*, 1974) dentro de la subfamilia *Culicidae* destacan cuatro géneros de importancia médica, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* y *Armigeres*, *Culex quinquefasciatus* es un vector importante de filariasis, *C. tritaeniorhynchus* transmite la encefalitis japonesa, (Service, 1986), en tanto que *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: *Culicidae*) es un vector de enfermedades virales como la fiebre amarilla, dengue clásico y dengue hemorrágico. La distribución del mosquito está limitada por la latitud, dada la incapacidad que tienen para soportar el invierno en los lugares donde la temperatura es más baja. Anualmente el pico de infecciones en nuestro país ocurre en los meses de octubre y noviembre, después de la temporada de lluvias, presentándose epidemias locales de marzo a junio.

El empleo de tácticas efectivas de control del mosquito es quizá la única manera por la cual las enfermedades transmitidas por estos insectos sean prevenidas o controladas (WHO, 1982). El dengue se ha convertido en la enfermedad más importante entre las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETVS). En los pasados 50 años este control involucró el uso de larvicidas y adulticidas químicos, que aunque fueron inicialmente efectivos, eventualmente resultaron en el desarrollo de resistencia en las poblaciones de mosquitos blanco, supresión severa de los organismos no blanco y/o contaminación general del ambiente (Klowden *et al.*, 1983).

Hoy en día la prevención de la aparición y aumento de resistencia a los insecticidas por parte de los insectos, la conciencia del problema de contaminación ambiental y el alto costo de nuevos insecticidas químicos hacen evidente que el control de insectos no puede depender durante más tiempo del uso exclusivo de los productos químicos, lo que ha propiciado la utilización de métodos alternos como el control biológico. Entre los agentes de control biológico destacan las bacterias entomopatógenas, entre las cuales se encuentra *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) H-14, quien ha demostrado ampliamente su efectividad, además de sus ventajas de seguridad ambiental, especificidad, bajas expectativas de desarrollo de resistencia en los insectos, además de la relativa facilidad de su producción a gran escala así como la estabilidad de almacenamiento y vida media larga (Su y Mulla, 1999).

En el caso de Bti, hasta la fecha, se han utilizado diferentes preparaciones de esta bacteria, tales como líquidos, polvos, gránulos, pellets, microgránulos y otros, que se aplican a los sitios de criaderos dependiendo de la especie de mosquito (Thiér., y *et al* 1996). Sin embargo, a pesar de sus diversos atributos, las formulaciones a base de este microorganismo presentan ciertas desventajas, como son la sedimentación rápida de la toxina en el ambiente acuático donde se aplica, así como la degradación que surge debido a la acción de la luz ultravioleta del sol, por lo cual uno de los objetivos es formular la toxina, mediante la incorporación de sustancias de liberación lenta así como fotoprotectores solares, que incluyen diversos cromóforos. Debido a ello, nos propusimos la producción del bioinsecticida, en dos medios de cultivo, y uno de referencia, evaluación de la actividad tóxica de los extractos insecticidas producidos así como la formulación de dichos extractos, en dos tipos, tabletas y granulados, contra larvas de tercer estadio tardío de *Aedes aegypti*.

METODOLOGÍA

Producción del extracto insecticida

Se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) 225, perteneciente al Cepario del Instituto de Biotecnología, el cual fue activado en agar nutritivo durante 24 horas y posteriormente con este cultivo se inocularon matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad conteniendo tres medios de cultivo, dos recientemente formulados (1) a base de jarabe de maíz (1%), sólidos de remojo del maíz (1%) y extracto de levadura (1%), y el (2) a base de harina de semilla de girasol (2%) y sacarosa (1%); junto con estos

se empleó un (3) medio de referencia (3) que contenía harina de soya (1%), sólidos de remojo del maíz (1%), melaza (1%) y sales minerales. (Maldonado Blanco, 2001).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo líquidos para la producción del bioinsecticida

Ingredientes Medio Referencia	g/100 ml	Ingredientes del Medio Nuevo 1	g/100 ml	Ingredientes del Medio Nuevo 2	g/100 ml
Harina de Soya	1	Jarabe de Maíz	1	Harina de Girasol	2
Sólidos de remojo de maíz	1	Sólidos de remojo de maíz	1	Sacarosa	1
Melaza	1	Extracto de Levadura	1	CaCO ₃	0.6
CaCO ₃	0.6	CaCO ₃	0.6	MgSO ₄	0.18
MgSO ₄	0.18	MgSO ₄	0.18	ZnSO ₄	0.12
ZnSO ₄	0.12	ZnSO ₄	0.12	FeSO ₄	0.12
FeSO ₄	0.12	FeSO ₄	0.12	MnSO ₄	0.12
MnSO ₄	0.12	MnSO ₄	0.12		
pH inicial 7.		pH inicial 7.		pH inicial 7.	

Los matraces conteniendo los tres medios, fueron incubados en agitador rotatorio para la fermentación a 30°C, 200 rpm y pH inicial 7, durante 72 horas. Se incluyeron 4 repeticiones por cada medio usado y estos se repitieron 3 veces sucesivas. Para determinar el final de las fermentaciones se hicieron frotis del cultivo, para observar la producción de esporas y cristales mediante frotis utilizando tinción con cristal violeta al 2% (Saleh *et al.*, 1970). Posteriormente, se obtuvo el complejo espора-cristal según el método de Dulmage *et al.* (1970), mediante coprecipitación con lactosa y acetona. Después, se calcularon los rendimientos del bioinsecticida producido en los tres medios en gramos por litro.

Evaluación del bioinsecticida

Se llevó a cabo un bioensayo preliminar contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio criadas en laboratorio. Para esto se utilizaron vasos desechables con 150 mL de agua declorada al cual se aplicó la cantidad necesaria del bioinsecticida producido. Las concentraciones que se utilizaron en los bioensayos preliminares fueron 0.05 y 0.5 mg/L del complejo espора-cristal utilizando diluciones a partir de una suspensión stock conteniendo 50 mg/L. A cada vaso se colocaron 25 larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío, tres repeticiones por cada concentración y un control no tratado, Los vasos se mantuvieron a temperatura de 25 ± 2°C y humedad relativa del 50-70%, registrándose la mortalidad a las 24 y 48 horas. Para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) se utilizaron seis concentraciones a partir de la solución stock con 50 mg/L: 1.00, 0.8, 0.5, 0.3, 0.1 y 0.5 mg/l. Estos tratamientos, de igual forma, que en el bioensayo preliminar fueron aplicados a vasos conteniendo 25 larvas tercer estadio tardío y 150 mL de agua destilada, así como también se registró la mortalidad a las 24 y 48 horas. Los resultados se analizaron mediante un programa de Probit computarizado (United States Applied and Environmental Health. 1989).

Elaboración de formulaciones

Una vez calculada la CL₅₀, los formulados insecticidas se diseñaron en base a las proporciones que se muestran en las Tablas 2 y 3, en dos tipos: granulados y tabletas. Se preparó un lote de cada una de las combinaciones descritas, para posterior evaluación.

Efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad tóxica de formulaciones

Para determinar el efecto de la luz uv sobre los formulados y verificar si los ingredientes de la formulación podrían proporcionar una protección contra la degradación de la toxina de Bti, los formulados preparados fueron irradiados con luz UV de 254 nm de longitud de onda, a una distancia de 5 cm por un tiempo de

24, 48 y 72 horas. Una vez irradiados, se llevó a cabo un bioensayo para cada lote de cada tipo de formulado, esto se llevó a cabo en recipientes conteniendo 1 litro de agua de clorada a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa del 50-70%. Se incluyeron 4 repeticiones y su respectivo control no tratado. En base a la CL_{50} obtenida, se agregó a cada vaso, en cantidad de 3 veces la CL_{50} . Se agregaron 16 mg de los formulados preparados con 10% de ingrediente activo y 10.6 mg de los formulados elaborados al 15% de ingrediente activo.

Tabla 2. Formulados preparados como tableta

INGREDIENTE	TABLETA 1	TABLETA 2	TABLETA 3	TABLETA 4
POLÍMERO 1	0%	0%	10%	5%
POLÍMERO 2	10%	5%	0%	0%
ACARREADOR 1	40%	40%	40%	40%
ACARREADOR 2	40%	40%	40%	40%
INGREDIENTE. ACTIVO	10%	15%	10%	15%

Tabla 3. Formulados granulares

INGREDIENTE	GRANULADO 1	GRANULADO 2	GRANULADO 3
POLÍMERO 1	0%	5%	6.6%
POLÍMERO 2	10%	5%	3.3%
FOTOPROTECTOR	1%	1%	1%
ACARREADOR	79%	79%	79%
INGREDIENTE. ACTIVO	10%	10%	10%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la producción del extracto insecticida de Bti cepa 225 se obtuvieron rendimientos con ligera variación para un promedio de 18.9 g/l para el medio de referencia (Fig. 1) compuesto por melaza y harina de soja, mientras que para el medio nuevo 1 compuesto por jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura los rendimientos variaron de 1.2 a 2.8 g/l. (Fig. 2) y entre 3.1 y 10.8 g/l para el medio nuevo 2 compuesto por harina de semilla de girasol y sacarosa (Fig.3). Otros investigadores como Maldonado Blanco (2001) obtuvieron rendimientos desde 9.1 hasta 15.7 g/l en un medio compuesto a base de melaza (10 g/l), sólidos de remojo de maíz (10 g/l), pasta en polvo (30 g/l) y sales minerales. En tanto, Prabakaran y Balaraman (2006) obtuvieron 7.8 g/l en un medio que contenía 2.5% de harina de soja.

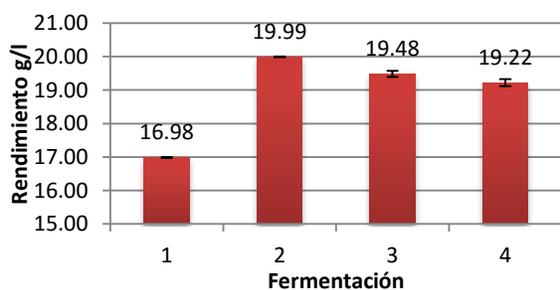


Figura 1. Rendimiento (g/l) del complejo esporacristal de Bti 225 obtenido en el medio de referencia a base de melaza, sólidos del remojo de maíz y harina de soja.

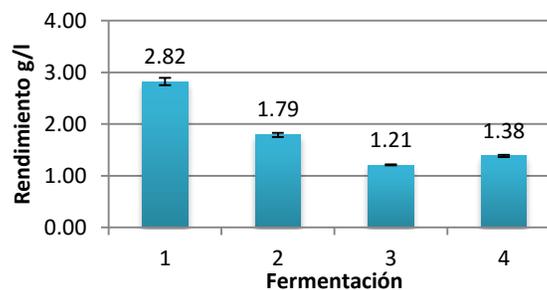


Figura 2. Rendimiento (g/l) del complejo esporacristal de Bti 225 obtenido en el medio soluble 1 a base de sólidos de remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura.

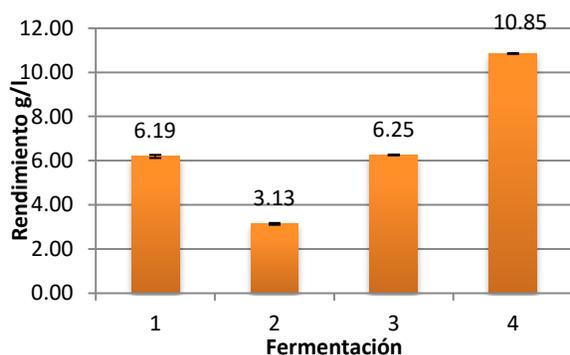


Figura 3. Rendimiento (g/l) del complejo esporacristal de Bti 225 obtenido en el medio soluble 2 a base de harina de semilla de girasol y sacarosa.

Los resultados de bioensayos preliminares mostraron que el extracto insecticida de Bti producido en el medio de referencia a base de harina de soya y melaza presentó baja mortalidad a las 24 y 48 horas respectivamente, aplicado a la concentración de 0.05 mg/l (Tabla 4) mientras que cuando se aplicó a 0.5 mg/l mostró mayor mortalidad de 29 y 33% a las 24 y 48 horas respectivamente; mientras que el medio nuevo soluble 1 conteniendo jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura presentó 100% de mortalidad a las 24 y 48 horas aplicado a la concentración de 0.5 mg/l, y causó 24 y 28% de mortalidad a las 24 y 48 horas respectivamente, con 0.05 mg/l (Tabla 5). Por otro lado, el extracto insecticida producido a base de harina de semilla de girasol y sacarosa presentó 1% de mortalidad a las 24 y 48 horas aplicado a la concentración de 0.05 mg/l y apenas 3% con 0.5 mg/l a los mismos tiempos (Tabla 6). Ninguno de los controles no tratados presentó mortalidad durante los bioensayos. En comparación a nuestros resultados Maldonado Blanco (2001), obtuvo valores promedio de 47.2 y 59.75% de mortalidad con la concentración de 0.05 mg/l., contra larvas de *Aedes aegypti* de cuarto estadio temprano con los extractos obtenidos en el medio compuesto por pasta en polvo y harina de soya.

Los resultados demuestran que aunque el nuevo medio a base a jarabe de maíz, sólidos del remojo de maíz y extracto de levadura presentó menos rendimiento en comparación con el medio de referencia, la actividad tóxica de este extracto fue mayor.

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad promedio de larvas de 3° estadio tardío de *Aedes aegypti*, presentados por los extractos insecticidas de Bti obtenidos en el medio de referencia.

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

Tabla 5. Porcentajes de mortalidad promedio de larvas de *Aedes aegypti*, presentados por los extractos insecticidas de Bti obtenidos en el medio 1 soluble.

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

Tabla 6. Porcentajes de mortalidad promedio de larvas de *Aedes aegypti*, presentados por los extractos insecticidas de Bti obtenidos en el medio 2 soluble.

Tiempo	0.05 mg/LI	0.5 mg/LI	Control
24 hrs	1%	3%	0%
48 hrs	1%	3%	0%
72 hrs	7%	11%	0%

En relación a la CL₅₀, en promedio obtuvimos 1.3114 mg/l para el extracto producido en el medio de referencia a base de harina de soya y melaza y 0.5321 mg/l para el bioinsecticida obtenido en el medio a base de jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura, ambas CL₅₀ a las 24 horas; mientras que a las 48 horas, se obtuvo un promedio de 1.0720 mg/l con el extracto producido en el medio

a base de harina de soya y melaza y 0.4712 mg/l para el medio a base de jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura. Estos promedios fueron comparados mediante una prueba T (Student) al nivel de 0.05, demostrando una diferencia altamente significativa entre los extractos, donde el bioinsecticida más tóxico fue obtenido en el nuevo medio 1 soluble (Fig 4 y 5). En comparación a nuestros resultados Maldonado Blanco (2001), obtuvo valores promedio de CL_{50} de entre 0.2675 0.0685 mg/l en un medio compuesto a base de melaza (10 g/l), sólidos de remojo de maíz (10 g/l), pasta en polvo (30 g/l) y sales minerales.

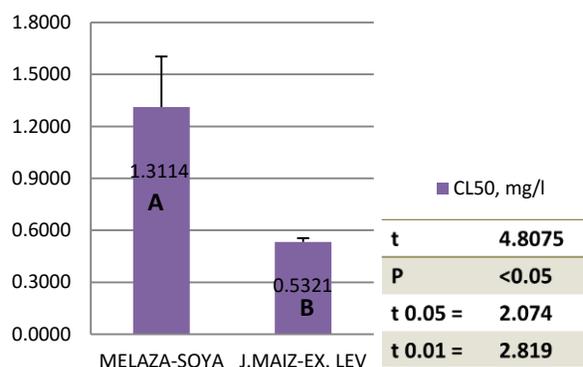


Figura 4. Comparación de CL_{50} de extractos de Bti 225 producidos en los medios melaza-soya y jarabe de maíz-extracto de levadura contra larvas de *Aedes aegypti* a las 24 horas de exposición..

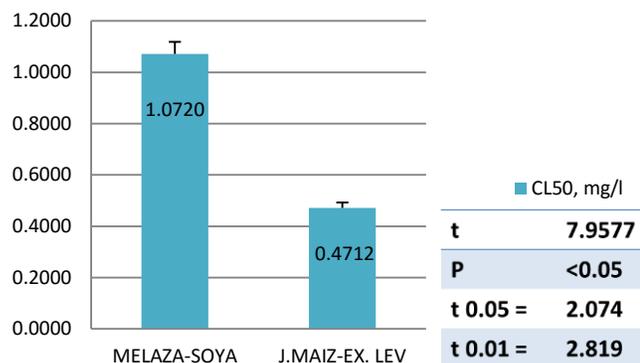


Figura 5. Comparación de CL_{50} de extractos de Bti 225 producidos en los medios melaza-soya y jarabe de maíz-extracto de levadura contra larvas de *Aedes aegypti* a las 48 horas de exposición.

En los resultados de la irradiación de formulados (tabletas y granulados) durante 24, 48 y 72 horas, después de 24 horas post aplicación muestra que la actividad tóxica de las tabletas fue menor que las de las formulaciones granulares quienes mantuvieron dicha actividad tóxica contra larvas de *Aedes aegypti*, con solo pequeñas reducciones. Esto muestra que los ingredientes de la formulación podrían proteger la toxina de Bti de la degradación causada por la luz ultravioleta del sol, cuando se aplican en el ambiente. En relación a esto, Araújo *et al.*, (2007), elaboraron una tableta de 250 mg a base de Polvo técnico de Bti, la cual contenía 15% de ingrediente activo, ingredientes adyuvantes y agente de protección solar; con la que obtuvo una mortalidad de 99.1%, a las 26 semanas en condiciones de laboratorio, aunque sin exposición a la luz solar.

Tabla 7. Porcentajes de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* después de la exposición por 24 horas, a formulados de Bti irradiados con luz UV durante 24, 48 y 72 horas.

FORMULADO	% MORTALIDAD		
	24 H	48 H	72 H
TABLETA 1	66	65	72
TABLETA 2	68	66	85
TABLETA 3	77	86	87
TABLETA 4	71	85	93
GRANULADO 1	98	99	94
GRANULADO 2	97	100	100
GRANULADO 3	98	100	99

CONCLUSIONES

En la producción del extracto insecticida de Bti, el medio de referencia mostró el mayor rendimiento del extracto insecticida con 18.49 g/l en promedio, sin embargo, su actividad insecticida fue menor, mientras que el medio nuevo 1, a base de ingredientes solubles tuvo un rendimiento promedio de casi 10 veces menos (1.81 g/l), sin embargo, su actividad insecticida fue mayor. Por otro lado el rendimiento promedio del extracto obtenido en el nuevo medio 2 fue de 6.61 g/l, con muy baja actividad insecticida, menor que el medio de referencia.

El extracto insecticida producido en el medio nuevo 1, mostró la menor CL_{50} de 0.4712 mg/l a las 48 horas postaplicación, lo que se significa que mostró una mayor actividad tóxica.

Los formulados diseñados como granulados resultaron más efectivos contra larvas de *Aedes aegypti*, con valores cercanos al 100% de mortalidad, que las tabletas, incluso al haber sido irradiados con luz ultravioleta hasta por periodos de 72 horas. Esto demuestra que la selección de los ingredientes que los componen es adecuada para la protección y efectividad del extracto insecticida en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS

- Araújo A. P., Varjal M. A., Oliviera S., Mariz E. M., Regis L. (2007). Evaluation of an experimental product base on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol Control*, 41: 339-347.
- Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. (1970). Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 15-20.
- Faust, E. C., P. F. Russel, y R. C. Jung. (1974). Parasitología clínica. Reimpresión 1979. Salvat (Eds), S. A. Mallorca, España. p 88.
- Klowden, M. L., G. A. Held and L. A. Bulla. (1983). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to adults of *Aedes aegypti* mosquitoes. *App. Environ Microbiol* 46: 112-115.
- Maldonado Blanco. M.G. (2001). Producción y Formulación de un bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* H-14 para el control de mosquitos culicidos en el noreste de México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Prabakaran, G. & Balaraman, K. (2006). Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biol Control* 36: 288–292.
- Saleh, S. M. Harris, R. F, & Alien, O.N. (1970). Recovery of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* from field soils. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 55-59.
- Service, M. W. (Ed) (1986). Blood-sucking insects: vectors of disease. Edward Arnold.London.
- Su, T. and M. S. Mulla 1999. Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquitoes in microcosms. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 356-365.
- Thiéry, I. C. Back, P. Barbazan and G. Sinégre (1996). Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* dans la demoustication et la lute contre les vecteurs de maladies tropicales. *Ann. Inst. Pasteur* 7: 247-260.
- United States Applied and Environmental Health. (1989) Pest Management Program. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland
- World Health Organization (1982). Information document produced by the WHO Division of Vector Biology and control. WHO/VBC/79.750 and VBC/BCDS/79.01. Geneve Switzerland: 1-44.