

## PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis israelensis* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Gabriela Fernández-Peña<sup>1</sup>, María Guadalupe Maldonado-Blanco<sup>1</sup>, Zinnia Judith Molina Garza<sup>2</sup>, Myriam Elías-Santos<sup>2</sup>, Humberto Quiroz-Martínez<sup>3</sup> y María del Socorro Flores-González<sup>3</sup>. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Ave. Pedro de Alba s/n cruz con Ave. Manuel L. Barragán, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66450, México. gaby\_fer\_p@hotmail.com; mgpemald@hotmail.com

**RESUMEN:** En este trabajo se realizó la producción del ingrediente activo de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 225 en medios de cultivo solubles a base de (1) jarabe de maíz, sólidos de remojo del maíz y extracto de levadura, y (2) con harina de soya, sólidos de remojo del maíz, melaza y sales minerales. Se recuperó el complejo espora-cristal por el método de coprecipitación con lactosa y acetona y el rendimiento promedio para el medio 1 fue de 1.81 g/l, mientras que para el medio 2 fue 18.49 g/l. En el bioensayo preliminar contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio, se obtuvo promedio de 100% de mortalidad contra larvas tratadas con los extractos provenientes del medio a base de jarabe de maíz, sólidos del remojo de maíz y extracto de levadura, mientras que el medio a base de harina de soya y melaza no mostró mortalidad.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Aedes aegypti*, complejo espora-cristal.

### Biopesticide production of *Bacillus thuringiensis israelensis* in two media culture against *Aedes aegypti* larvae

**ABSTRACT:** In this work the production of the active ingredient of the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 225 was performed in a soluble culture media based on (1) corn syrup, corn steep powder and yeast extract, and (2) containing soybean flour, corn steep powder, molasses and mineral salts. The spore-crystal complex was recovered by coprecipitation method with lactose and acetone and the average yield for the culture media (1) was 1.81g/l, while for the culture media (2) was 18.49g/l. In addition, we carried out a preliminary bioassay against third instar larvae of *Aedes aegypti*, which showed 100% mortality of larvae treated with extracts from the medium based on corn syrup, corn steep powder and the yeast extract, whereas for the medium based on soybean flour and molasses showed no any mortality.

Key words: *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Aedes aegypti*, spore-crystal complex, fermentation, soluble media

### Introducción

Actualmente se busca sustituir el uso de insecticidas químicos por alternativas de control biológico que eviten los riesgos ecológicos y de salud causados por los químicos. Dentro de los agentes de control biológico más importantes está *Bacillus thuringiensis israelensis* que se ha usado extensivamente para el control de larvas de mosquitos debido a sus atributos ampliamente conocidos, tales como alta eficacia, especificidad, bajo desarrollo de resistencia y seguridad ambiental. En este trabajo nos proponemos realizar la producción del ingrediente activo de esta bacteria en medios solubles para la producción a nivel de matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, y comparar la producción en un medio de referencia a partir de melaza y harina de soya (Maldonado-Blanco, 2001). También se determinó la actividad tóxica de los extractos insecticidas producidos contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio tardío.

### Materiales y Método

Se utilizó la cepa *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 225, Bti, (Maldonado-Blanco, 2001) se llevó a cabo su producción en matraz agitado en 2 medios de cultivo, uno nuevo recientemente

formulado (1) a base de jarabe de maíz (1%) , sólidos de remojo del maíz (1%) y extracto de levadura (1%), y otro de referencia (2) que contiene harina de soya (1%) , sólidos de remojo del maíz (1%), melaza (1%) y sales minerales. (Maldonado-Blanco, 2001).

Cuadro 1. Medios de cultivo para la producción del complejo espora-cristal de Bti.

Medio 1		Medio 2	
Ingrediente	g/l	Ingrediente	g/l
Sólidos del remojo de maíz	10	Harina de Soya	10
Jarabe de Maíz	10	Sólidos del remojo de maíz	10
Extracto de Levadura	10	Melaza	10
CaCO <sub>3</sub>	1.0	CaCO <sub>3</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.3	MgSO <sub>4</sub>	0.3
ZnSO <sub>4</sub>	0.2	ZnSO <sub>4</sub>	0.2
FeSO <sub>4</sub>	0.2	FeSO <sub>4</sub>	0.2
MnSO <sub>4</sub>	0.2	MnSO <sub>4</sub>	0.2

Los matraces conteniendo los 2 medios, fueron incubados en agitador rotatorio para la fermentación a 30°C, 200 rpm y pH inicial 7, durante 72 hrs. En estas condiciones 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 espora-cristal según el método de Dulmage *et al.* (1970), mediante coprecipitación con lactosa y acetona. Una vez realizado esto, se calcularon los rendimientos del extracto insecticida en gramos por litro.

Se llevó a cabo un bioensayo preliminar contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio. Para esto se utilizaron vasos desechables con 150 ml de agua al cual se aplicó la cantidad a probar del insecticida producido. Los vasos se mantuvieron a temperatura promedio de 25 °C y humedad relativa del 50-70%, registrándose la mortalidad a las 24 horas. Las concentraciones que se utilizaron en los bioensayo fueron de 0.05 mg/l y 0.5 mg/l del complejo espora-cristal proveniente de los cultivos realizados en el nuevo medio y de referencia.

## Resultados y Discusiones

Se realizaron 4 fermentaciones en los 2 diferentes medios de cultivo soluble y de referencia, donde se obtuvieron rendimientos variables del 16.9 a 19.9 g/l para el medio de referencia compuesto por melaza y harina de soya, mientras que para el medio nuevo compuesto por jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura los rendimientos variaron de 1.21 a 2.82 g/l., mientras que Maldonado-Blanco (2001) obtuvo 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. Prabakaran y Balaraman (2006) obtuvieron 7.8 g/l de rendimiento obtenido en un medio que contenía 2.5% de harina de soya.

Con estos extractos se llevó a cabo un bioensayo preliminar contra larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio el cual mostró que el extracto insecticida producido en el medio de referencia a base de harina de soya y melaza (Maldonado-Blanco, 2001) no presentó mortalidad de larvas de *A. aegypti* en

las concentraciones probadas de 0.5 y 0.05 g/l, mientras que el medio soluble conteniendo jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura presentó 100% de mortalidad promedio a la concentración de 0.5 g/l, y 4% de mortalidad a 0.05 g/l. Ninguno de los controles presentó mortalidad durante el bioensayo. En comparación a nuestros resultados Maldonado-Blanco 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 usando el medio con pasta en polvo y harina de soya.

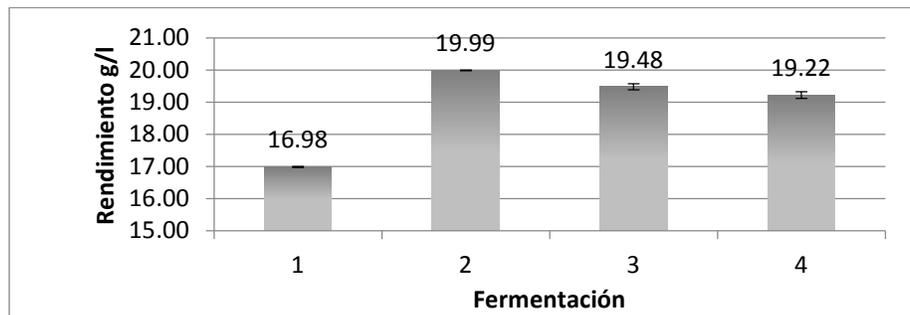


Figura 1. Rendimiento promedio en gramos por litro (g/l) del complejo espора- cristal de Bti 225 obtenido en el medio a base de melaza, sólidos del remojo de maíz y harina de soya.

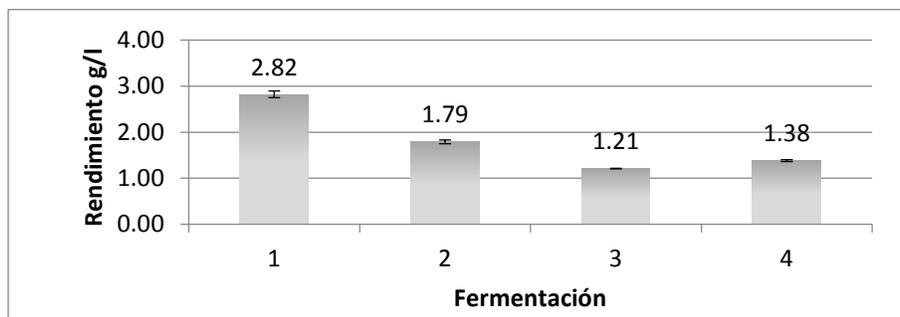


Figura 2. Rendimiento promedio en gramos por litro (g/l) del complejo espора- cristal de Bti 225 obtenido en el medio a base de sólidos de remojo de maíz, jarabe de maíz y extracto de levadura.

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

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad promedio presentados por los extractos insecticidas de Bti contra larvas de 3° estadio tardío de *Aedes aegypti*.

Tratamientos	% de Mortalidad Promedio		
	0.5 mg/l	0.05 mg/l	Control
Medio 1 (Referencia)	0%	0%	0%
Medio 2 (Soluble)	100%	4%	0%

### Conclusiones

El medio a base de melaza, sólidos de remojo de maíz y harina de soya mostró el mayor rendimiento del extracto con 18.49g/l en promedio, mientras que el medio a base de jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura tuvo un menor rendimiento promedio de 1.81 g/l.

El extracto insecticida producido a base de jarabe de maíz, sólidos de remojo de maíz y extracto de levadura, mostró mayor actividad tóxica contra larvas de *Aedes aegypti* (100%) que el extracto insecticida producido en medio de harina de soya y melaza (4%) a las concentraciones probadas de 0.5 y 0.05 mg/l.

### **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, y al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### **Literatura Citada**

- 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.
- 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. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Prabakaran, G. and Balaraman, K. 2006. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis var israelensis*. *Biological Control* 36 (2006) 288–292.
- Saleh, S. M. Harris, R. F, and Alien, O.N. 1970. Recovery of *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis* from field soils. *J. Invertebr. Pathol.* 15:55-59.