

# **Desarrollo de formulaciones sólidas a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de larvas de *Aedes aegypti*.**

**Montserrat Medina, Regina Perdomo, Ana Fracchia**

## **Resumen**

Este proyecto tiene como objetivo desarrollar una formulación bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis* para el control del mosquito *Aedes aegypti*. Esta formulación deberá ser utilizada en tanques de almacenamiento de agua de comunidades rurales del Estado de Morelos. La formulación de base contiene *Bacillus thuringiensis* inmovilizado en un gel de alginato de calcio. Para incrementar el consumo por parte de las larvas, e incrementar la eficacia de la formulación, se evaluó el uso de diferentes atrayentes: ácido láctico, extracto de levadura y un concentrado de camarón. Asimismo se evaluó el efecto de la concentración de alginato de calcio. La mortalidad de las larvas se evaluó en bioensayos con 1 L de agua conteniendo 10 larvas. Finalmente se obtuvo las formulaciones que matan el 100% de las larvas de *Aedes aegypti*.

## **Introducción**

En México se usan insecticidas químicos como el Temefos<sup>1</sup>, insecticida químico, para matar las poblaciones de mosquitos en el agua que usan las comunidades rurales. Esos insecticidas son aplicados regularmente, a pesar de ser tóxicos, debido a la necesidad de prevenir las epidemias, como el dengue, que pueden provocar los mosquitos en zonas endémicas.

Hay cuatro serotipos de dengue y es transmitido por medio de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. Se demostró que en Morelos están los cuatro serotipos de dengue, por lo cual es un problema donde se necesita implementar nuevas estrategias de prevención y control de mosquitos. Es importante que actualmente las nuevas estrategias tengan insecticidas biológicos puesto que son inocuos para la salud humana.

---

<sup>1</sup> Becker, N. (1997) Microbial control of mosquitoes: management of the Upper Rhine mosquito population as model programme. *Parasitol Today*. P.p 485-487

Una alternativa para matar insectos, que no es tóxica para los humanos o para ningún otro animal, es el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria produce unas proteínas denominadas Cry y Cyt ó delta-endotoxinas, que son tóxicas a diferentes insectos. En particular, la bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti) produce las proteínas Cry y Cyt que son altamente específicas para matar larvas de mosquito *Aedes aegypti*. Estas proteínas no contaminan el ambiente ya que son biodegradables y no dañan a ningún organismo, incluyendo otros insectos. Las proteínas Cry y Cyt se insertan en la membrana de las células del intestino de las larvas de mosquito destruyendo el tejido intestinal y provocando su muerte. Por tal motivo, las toxinas de Bti tiene que ser ingeridas para que ejerzan su acción insecticida. Es por eso que es importante estimular su ingestión por parte de las larvas.

El proposito de este proyecto desarrollar una formulación basada en la bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti) para el control de larvas de *Aedes aegypti*. Esta formulación se va a utilizar para eliminar a las larvas de mosquito de tanques de almacenamiento de agua limpia y de agua estancada de los pueblos del Estado de Morelos. Como agentes estimulantes de la ingestión se evaluará el uso de ácido láctico, extracto de levadura y extracto de camarón.

### **Antecedentes**

Las toxinas de Bti son altamente tóxicas contra larvas de *Aedes aegypti* entre otros moscos. Se ha usado recientemente en 11 países africanos para controlar diferentes especies de mosquitos y ha sido exitoso. En Alemania también se ha usado y por su efectividad se ha dejado de usar en muchos casos el insecticida Temefos. En Brasil se ha usado también para control de las poblaciones de *Aedes aegypti*. El Bti se puede usar en reservorios de agua que los humanos usan sin tener efectos secundarios.<sup>2</sup>

Por otra parte, se han estudiado los hábitos de alimentación de las larvas y se ha descubierto que tienen diferentes preferencias por ciertos alimentos o sustancias como el polen del maíz y las hojas podridas (sirven como atrayentes) que aceleran su metabolismo<sup>3</sup>. También les atraen los desechos orgánicos (ácido láctico) y levaduras que son proteínas (extracto de levadura).

La formulación anterior contenía el producto activo que son las delta-endotoxinas Cry y Cyt de Bti (estas proteínas matan a la larva). También contiene un agente solidificante

---

<sup>2</sup> Back, C., Barbazan, P. (1994) *Bacterial control in Africa using Bti and Bacillus sphaericus against Simuliidae and Culicidae.* Proc. VI Int Coll Invert Pathol Mocrb Control, France. p.p 254-258.

<sup>3</sup> Ye-Ebiyo Y, Pollack RJ, Kiszewski A, Spielman A (2003) *A component of maize pollen that stimulates larval mosquitoes (Diptera: Culicidae) to feed and increases toxicity of microbial larvicides.* *Immunology and Infectious Diseases.*  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=14765663](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=14765663)

que es el alginato (utilizado en alimentos humanos) y los atrayentes. Esta formulación es efectiva para matar larvas de mosquito ya que sólo mata a estos insectos.

### **Hipótesis**

El uso de una formulación a base de toxinas de Bti y de estimuladores de la ingestión permitirá alcanzar una mortalidad de 100 % de larvas de *Aedes aegypti* en menos de 24 hrs.

### **Objetivos**

- Generales:

Desarrollar una formulación del bioinsecticida estable (que no se disuelva), que mate el 100 % de las larvas en 24 hrs. y que no sea tóxico para los humanos ni ningún otro animal.

- Específicos:

- 1.- Revisar la literatura y definir diferentes atrayentes para adicionarlos a la formulación.
- 2.- Adicionar los atrayentes en diferentes concentraciones a la formulación y evaluar su efectividad en bioensayos.
- 4.- Evaluar la efectividad de las formulaciones mediante bioensayos.

### **Materiales**

- Alginato para solidificar (sal sódica, baja viscosidad, Sigma, USA)
- Producto activo mezcla de esporas y cristales producidos por Bti (por fermentación)
- Larvas de *Aedes aegypti*
- Knorr Suiza de camarón (caldo)
- Vaso de precipitado
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Tambos de 100 ml y de 2 litros
- Matraces
- Acido láctico (98 % pureza, Sigma, USA)
- Extracto de levadura (grado industrial, Marcor, grado industrial)
- Cloruro de calcio (92 % de pureza, J.T Baker, México)

### **Instrumentos**

Balanza, Pipetas automáticas, Parrilla de agitación, bomba peristáltica.

## Metodología

Trabajamos en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto y en el insectario.

Se analizó experimentalmente la mortalidad de las larvas en función del tiempo y del tipo de la formulación.

- En la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología-UNAM, realizamos las formulaciones adicionándole a la mezcla de alginato y el producto activo, las diferentes concentraciones de los atrayentes. La formulación actual consiste de 10 % (p/v) de mezcla de esporas-cristales de Bti mas 2 % (p/v) de alginato (sal sódica) como solidificante y el resto es agua (78 %). El cloruro de calcio tiene como función que la formulación se solidifique formando las perlitas.
- En el insectario IBT-UNAM realizamos las pruebas de toxicidad con larvas del mosquito *Aedes aegypti*. Se colocan 10 larvas en su última etapa de crecimiento como larvas en un vaso con 100 ml. de agua y se adicionan concentraciones diferentes del formulado. Cada formulación tenía tres repeticiones. El experimento testigo es agua sin formulado. La mortalidad de las larvas se cuantifica contra tiempo. Los datos se analizaron estadísticamente para obtener mortalidad media. Así encontramos experimentalmente que formulación adicionada de atrayentes que funciona mejor.

Empezamos haciendo las formulaciones con diferentes factores y porcentajes variables:

Concentración de alginato	1.5 %	2 %
Concentración de Ac. láctico	5 mM	10 mM
Concentración de extracto de levadura	0%	0.5%
Concentración de aromatizante ( <i>Knorr Suiza</i> camarón).	0	0.5%
BTi	10 %	10 %

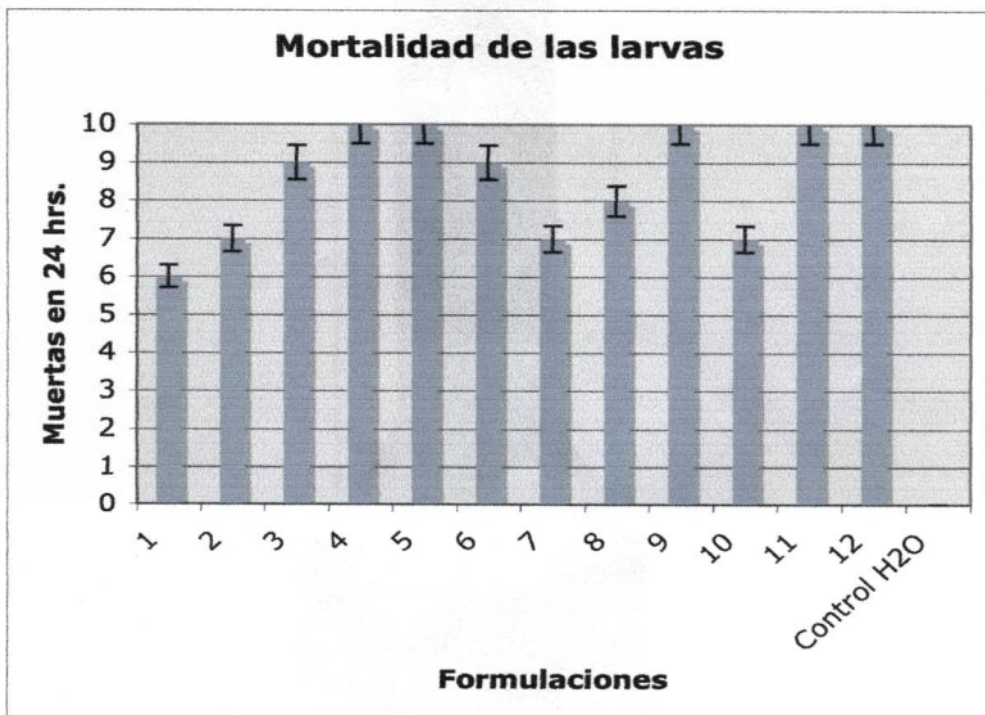
Las posibles combinaciones son 16. Sin embargo, por falta de larvas solo se evaluaron 12 formulaciones de las cuales se hicieron 3 repeticiones, teniendo así como número total 36 experimentos.

Estas eran analizadas mediante ensayos con larvas, y así escogimos las 5 mejores. Lo que define las formulaciones como mejores es el índice de mortalidad de larvas por formulación. Las mejores serán las que maten más larvas *A. aegypti* en menos tiempo.

## Resultados y Discusión

# de Formulación:

1. Alginato 2 %, Ac. Lactico 10 mM, Ext Levadura 0.25 %
2. Alginato 2 %, Ac. Lactico 10 mM
3. Alginato 2 % Ac. Lactico 5 mM
4. Alginato 2 % Ac. Lactico 5mM, Ext Levadura 0.25 %
5. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 5 mM
6. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 10 mM
7. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 5 mM, Ext Levadura 0.5 %
8. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 10 mM, Ext Levadura 0.25 %
9. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 5 mM,
10. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 10 mM,
11. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 5 mM, Ext Levadura 0.5 %, Camarón
12. Alginato 1.5 %, Ac. Láctico 10 mM, Ext Levadura 0.5 %, Camarón



# de Formulación	# de Muertas a las 24 horas	Desviación Estándar
1	6	0,778904307
2	7	0,477392962
3	9	0,125629727
4	10	0,427141071
5	10	0,427141071
6	9	0,125629727
7	7	0,477392962
8	8	0,175881618
9	10	0,427141071
10	7	0,477392962
11	10	0,427141071
12	10	0,427141071
Control H2O	0	2,587972374
Total	103	
Media	8,583333333	

### Resultados y discusión

Hay cuatro formulaciones con las cuales obtenemos el 100% de mortalidad a las 24 horas: 1, 5, 7 y 8. No obstante, tres de ellas presentaron enturbamiento del agua (1, 7 y 8), por lo que se determinó que la formulación # 5 fuera considerada la ideal para realizar este tipo de bioensayos.

La formulación #3, también presentó enturbamiento, lo mismo que la 4, aunque esta, en menor grado. Probablemente, la presencia del extracto de levadura, sea la causa de dicho enturbamiento, aunque esto no se puede asegurar, pues también podría ser efecto del proceso de realización de las perlitas.

- Las formulaciones más efectivas fueron las 4, 5, 9, 11 Y 12
- De todas estas sólo la 4 tiene una concentración de alginato del 2 % y todas las demás están al 1.5 %.
- De las formulaciones al 1.5 % sólo la 12 tiene ácido láctico al 10 mM, todas las demás están al 5 mM.
- El extracto de levadura y el caldo de camarón no parecen tener un efecto positivo claro.

En las formulaciones 3, 6 presentan una desviación estándar muy pequeña ya que llegan casi al 100 %. Se murió el 90 % de las larvas en 24 hrs.

La formulación 8 presenta una desviación estándar del 20 % ya que se murieron el 80 % las larvas *A. aegypti* en 24 hrs.

Las 2, 7 y 10 presentan una desviación estándar mucho mayor a las anteriores ya que tiene del 30 % porque la mortalidad es del 70 %.

Por último formulación 1 presentó la mayor desviación estándar ya que se murieron el 60 % de las larvas *A. aegypti*.

## **Conclusión**

Comprobamos nuestra hipótesis porque encontramos más de una formulación que mata el 100 % de las larvas en 24 horas. Encontramos los atrayentes más gustosos por las larvas que son el ácido láctico, el extracto de levadura y el caldo de camarón. Éstas fueron evaluadas en bioensayos de 100 ml. y de 1 L.

A pesar de que se evaluaron solo 12 de las 16 formulaciones planteadas, los resultados indican que una formulaciones planteadas, los resultados indican que una formulacion con 1.5 % de alginato y 5 mM de acido lactico no requiere de extracto de levadura o de camaron para matar el 100 % de las larvas en 24 horas. Sin embargo, es importante evaluar las formulaciones bioensayos que impliquen un seguimiento de la efectividad de las formulaciones con bioensayos de un mes de duracion que contemplen recambios de agua y de larvas.

## **Agradecimientos**

Agradecemos a nuestros asesores, el Dr. Leobardo Serrano, la Dra. Alejandra Bravo y Claudia Pérez, por darnos la oportunidad de participar en este trabajo. Finalmente, un agradecimiento a nuestro profesor, Enrique Galindo.

## Bibliografía

Back, C., Barbazan, P. (1994) *Bacterial control in Africa using Bti and Bacillus sphaericus against Simuliidae and Culicidae.* Proc. VI Int Coll Invert Pathol Microb Control, France. p.p 254-258.

Becker, N. (1997) *Microbial control of mosquitos: management of the Upper Rhine mosquito population as model programme.* Parasitol Today. p.p 485- 487.

Burges, H.D (1998). *Formulation of microbial biopesticides.* Ed. Kluwer Academic Publishers. Netherlands p.p1-33

Ferran A., Gambier J., Jean-Philippe D., Meyran J. (2002). *Taste Sensitivity of Detritivorous Mosquito Larvae to Decomposed Leaf Litter.* Journal of Chemical Ecology. Volumen 28, número 5. p.p 983-995

Pérez, C. (2003) *Tesis: Análisis molecular del sinergismo entre S-endotoxinas CryIIA y CytIA de Bacillus thuringiensis subespecie israelensis.* Instituto Biotecnología UNAM. Cuernavaca, Mor. p.p 13-33.

Secretaría de Salud. (1998). *Coordinación de Vigilancia Epidemiológica. Dengue y dengue hemorrágico. Guía práctica para su diagnóstico, tratamiento y manejo.* México.

Walker D., Edward, Merrit W., Richard (1991). *Behavior of larval Aedes triseratus (Diptera:Culicidae.)* Journal of Chemical Ecology. Vol.28, no.5

Ye-Ebiyo Y, Pollack RJ, Kiszewski A, Spielman A (2003) *A component of maize pollen that stimulates larval mosquitoes (Diptera: Culicidae) to feed and increases toxicity of microbial larvicides.* Immunology and Infectious Diseases. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list\\_uids=14765663](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=14765663)

## Anexo 1

Algunas de nuestras fotos:

