

## EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE AISLADOS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SOBRE *CYLAS FORMICARIUS ELEGANTULUS*

Eslinda Fernández, Orietta Fernández-Larrea, Felicia Piedra, M. Milán y Y. Díaz

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no.1 514 e/ 5a.B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

### RESUMEN

El tetuán del boniato (*Cylas formicarius elegantulus*) es la plaga que mayor afectación causa a este cultivo en Cuba. Con el fin de buscar nuevas alternativas de biocontrol a sus ataques, realizamos este trabajo, en el que se hizo la evaluación de la virulencia a nivel de laboratorio de cinco biopreparados de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos por fermentación sumergida a partir de las cepas LBT-9, LBT-12, LBT-19, LBT-20 y LBT-25. En el estudio de fermentación se emplearon cuatro variantes de medios de cultivo complejos a fin de obtener el mejor para la reproducción de las cepas con mayor virulencia contra este insecto. Se determinaron las fracciones de los biopreparados con mejor efecto insecticida. Los biopreparados que mostraron mayor virulencia contra este insecto fueron LBT-19, LBT-20 y LBT-25. Los medios complejos MO y M10 fueron considerados los mejores para la reproducción de estas cepas. La biomasa y el cultivo fermentado total fueron los que mostraron mejor efecto toxicológico y patológico sobre esta plaga.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Cylas formicarius elegantulus*, control biológico, virulencia

### ABSTRACT

*Cylas formicarius elegantulus* is the plague that bigger affectation causes to the cultivation of the sweet potato in Cuba. With the purpose of looking for new biological control alternatives to the attacks of this plague we carry out this work. In which was carried out the evaluation from the virulence at laboratory level of five *Bacillus thuringiensis* products obtained by submerged fermentation starting from the strains LBT-9, LBT-12, LBT-19, LBT-20 and LBT-25. Also in the study of fermentation four variants of complexes cultivation media were used to obtain the best for the reproduction of the strains more virulent against this insect. In another hand the fractions of the biological cultures were determined with better insecticide effect. The biological cultures that showed higher virulence against this insect was: LBT-19, LBT-20 and LBT-25. The complex MO and M10 media were considered the best for the reproduction of these strains. The biomass and the all fermentation broth were those that showed better toxic and pathological effect on this plague.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Cylas formicarius elegantulus*, biological control, virulence

### INTRODUCCIÓN

El cultivo del boniato constituye uno de los principales alimentos para el hombre y los animales, tanto en Cuba como en el resto del mundo, por su gran contenido de sustancias nutritivas, especialmente azúcares. El costo de producción de este cultivo se ve encarecido por la gran cantidad de productos químicos que se utilizan para el control de su principal plaga, *Cylas formicarius elegantulus* Summ, conocida como tetuán del boniato, sin que se vean reducidos los daños, que pueden estar entre 30-40% de la producción. En nuestro país esta especie de coleóptero se convirtió en un problema serio para la producción en 1994, debido al notable incremento de los daños, con la consiguiente disminución de los rendimientos globales y de los tubérculos con calidad comercial [INIFAT, 1995].

Los resultados del trabajo *Manejo integrado del tetuán del boniato* mostraron que es posible reducir el daño técnico y económico cuando se utiliza *Beauveria bassiana*, *Paccilomyces fumosoroseus*, *P. lilacinus* y *Pheidole megacephala*, en un 17,3; 13,6; 22,2 y 14,8% respectivamente, en relación con el 32% que se logra con el tamarón (60%) [Piedra et al., 1995].

Con el objetivo de buscar nuevas estrategias de biocontrol para esta plaga, nos propusimos evaluar la virulencia de *Bacillus thuringiensis* sobre adultos de *Cylas formicarius* a nivel de laboratorio. Para lograr esto se observó la reacción de los insectos al ingerir el alimento asperjado con cinco biopreparados obtenidos por fermentación sumergida a partir de cinco cepas de esta bacteria. También se emplearon cuatro variantes para encontrar el mejor medio de cultivo donde se re-

produjeron los aislados que causaron mayor mortalidad. Se determinaron las fracciones de los medios de cultivo con mayor efecto insecticida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislados bacterianos

El experimento se llevó a cabo en los laboratorios del INISAV, utilizando las cepas LBT-9, LBT-12, LBT-19, LBT-20 y LBT-25, pertenecientes al cepario de este centro, las que fueron seleccionadas atendiendo a su origen y serotipo. Las pertenecientes al serotipo H1 fueron empleadas como control.

### Medios de cultivo

Los medios empleados para el mantenimiento y crecimiento de los cultivos fueron: agar nutriente; caldo Luria-Bertani (g/L) extracto de levadura, 5,0; triptona, 10,0; NaCl, 10,0, y los medios complejos: MO (g/L) levadura panadera, 2,5; levadura torula, 5,0; almidón, 2,5; M3 (g/L) almidón, 5,0; harina de soya, 8,0;  $\text{CaCO}_3$ , 1,0; M4 (g/L) almidón, 5,0; levadura torula, 35,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2,0; M10 (g/L) almidón, 5,0; levadura torula, 10,0; harina de soya, 5,0;  $\text{CaCO}_3$ , 0,3 (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los aislados

Aislados	Origen	Serotipos
LBT-9	<i>G. mellonella</i>	H1
LBT-12	?	H1
LBT-19	CIGB	*
LBT-20	CIGB	H8a8b
LBT-25	<i>P. litus</i>	*

\*No se observó reacción positiva frente a los antisueros flagelares (H1 → H28.)

### Procedimientos

#### a) Selección de los aislados (Bioensayo 1)

Se hicieron crecer en caldo LB hasta esporulación total en una zaranda termostata BIOZART 2013 durante 48 horas, con un régimen de agitación de 140 rpm y una temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Posteriormente se adicionó ácido sórbico (0,5%), y los ensayos biológicos se realizaron con diez insectos en la fase adulta para cada réplica, y se emplearon tres para cada tratamiento. Los insectos fueron colocados en frascos de vidrio estériles de 9,5 X 12,5 cm. Después fueron dispuestos sobre hojas de boniato sanas, previamente asperjadas en el laboratorio con los cultivos fermentados y completamente esporulados de cada cepa, a razón de  $10^8$  esporas/mL, de forma tal que las aspersiones dieron una cobertura uniforme al material de alimentación. Se co-

locaron tres réplicas como testigo. Los insectos se obtuvieron a partir de un pie de cría de laboratorio.

Se realizaron observaciones diarias para registrar la mortalidad durante 10-15 días. Los insectos muertos se colocaron en cámara húmeda para realizar los reaislamientos. La selección de los aislados se realizó teniendo en cuenta la mortalidad acumulada de cada uno y la presencia de esporas y cristales típicos de *B.t.* observados en cada uno de los reaislamientos y en el testigo.

#### b) Selección de los medios de cultivo

Los aislados seleccionados se hicieron crecer hasta esporulación total en los medios MO, M3, M4 y M10. Estos cultivos se agitaron durante 29-56 horas a  $31 \pm 1^\circ\text{C}$  y 140 rpm. Posteriormente se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer para cada variante en cada medio de cultivo. Se tomó en cuenta la presencia de cristales típicos para cada aislado, según las observaciones de las tinciones simples realizadas, lo que nos permitió asumir este conteo como equivalente de la cantidad de cristales [Bernhard y Utz, 1993].

Los medios de cultivo se seleccionaron teniendo en cuenta la mayor producción de esporas, sus componentes y el tiempo de fermentación.

#### c) Separación de fracciones (Bioensayo 2)

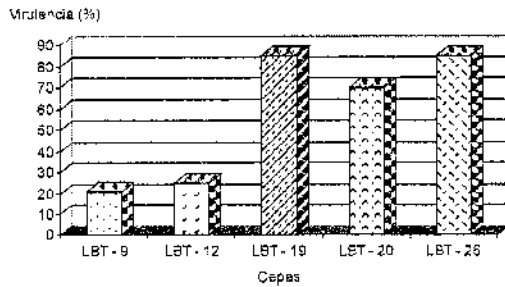
Los cultivos fermentados totales en los medios seleccionados fueron centrifugados a 5 000 rpm durante quince minutos, se lavaron dos veces con solución salina fisiológica. Posteriormente la biomasa fue resuspendida en solución NaCl (0,85%) pH = 7,2, manteniéndose el mismo volumen del cultivo inicial. La concentración y el rendimiento de esporas se cuantificó por conteo en cámara de Neubauer. El sobrenadante se dividió en partes iguales. Una de ellas fue tratada en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante quince minutos, y la otra sin tratamiento, por lo cual para cada aislado se ensayaron tres fracciones y el cultivo fermentado total (CFT).

Los ensayos de patogenicidad se realizaron para las fracciones y el CFT, que se realizaron siguiendo la metodología descrita anteriormente para la selección de los aislados con mayor efectividad biológica.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de aislados

De los cinco aislados ensayados al nivel de laboratorio, sólo tres resultaron efectivos contra *C. formicarius* (LBT-19, LBT-20 y LBT-25), con una virulencia entre 70-85% en un período entre 10-15 días (Fig. 1).

Virulencia de aislados de *B.t.* sobre *C. formicarius*.

Estos resultados concuerdan con lo planteado por Krieg (1981), quien obtuvo en sus experimentos una alta susceptibilidad con esta bacteria cuando la enfrentó a diferentes ordenes de coleópteros.

Las cepas LBT-9 y LBT-12 no mostraron una alta virulencia sobre *C. formicarius*. Esto pudo deberse a que pertenecen al serotipo H1. Sin embargo, la LBT-20, perteneciente al serotipo H8a8b, mostró una mortalidad del 70% sobre estos insectos. Keller y Langenbruch (1993) plantearon que parece existir una relación entre el serotipo y el patotipo de los aislados que ejercen cierto control sobre coleópteros, siendo la conocida variedad san diego o morrisoni patogénica contra este orden de insectos. A esta variedad pertenece la cepa LBT-20.

Aunque no se ha podido determinar el serotipo de los aislados LBT-19 y LBT-25 debido a que no respondieron a los antisueros flagelares probados, sí mostraron actividad sobre este insecto, por lo que estos resultados no concuerdan con lo planteado por Keller y Langenbruch (1993). Estos aislados pueden diferir en serotipo con la LBT-20, pero está probado que la acción insecticida la realizan las deltaendotoxinas [Knowles y Dow, 1994; Wasano y Ohba, 1997; Bravo, 1997]. Además, aunque no se observó una mortalidad a las 48-72 horas, el comportamiento de los insectos se fue menos activo, cesando su actividad alimentaria, por lo que dejaron de producir daños.

#### Selección de medios

La selección y el mejoramiento de medios de cultivo constituyen el primer paso para obtener un biopreparado con alta efectividad biológica, de forma tal que el microorganismo pueda reproducirse y excretar al medio la mayor cantidad de productos con acción insecticida.

El MO resultó ser el mejor medio para la producción de esporas del aislado LBT-19, mientras que el M10 lo fue para el LBT-25; sin embargo, el LBT-20 no mostró diferencias significativas en la producción de esporas con las distintas variantes de medios ensayados (Tabla 2), por lo que podemos concluir que los mejores resultados se obtuvieron en los medios MO y M10, medios que se

acercan a la relación teórica C:N 1:2, necesaria para el desarrollo y esporulación de *B.t.*, según lo planteado por Rowe (1990) y Bernhard y Utz (1993).

Todos los medios probados contenían carbohidratos y fuentes nitrogenadas; las diferencias fundamentales en estas últimas estuvieron dadas por sus características y proporciones presentes en los medios complejos. Como conocemos, cada cepa posee una capacidad fisiológica diferente para asimilar los nutrientes, y en cada medio ensayado existe una disposición que puede estar balanceada o no, por lo que los resultados obtenidos dependen de estas causas y su interacción. En este caso la formación de esporas y la concentración de estas en cada uno de los medios de cultivo probados para la cepa LBT-20 no mostraron diferencias significativas, lo que hace probable que la capacidad fisiológica de esta cepa sea mayor.

Tabla 2. Concentración de esporas ( $10^8$  esp/mL) de los aislados reproducidos en medios de producción

Medios	LBT-19	LBT-20	LBT25(esp/mL)
MO	6,94a	2,33a	5,30b
M3	3,08b	2,95a	4,44b
M4	3,96b	3,11a	3,80b
M10	4,48b	3,60a	6,65a
	S = 0,04 C.V. = 8,8%	S = 0,74 C.V. = 15%	S = 0,10 C.V. = 7,9%

\* Las letras que difieren presentan diferencias significativas ( $p=0,05$ .)

Es conocido que las fuentes de nitrógeno amínico, como el extracto de levadura, favorecen la esporulación, mientras que las fuentes de nitrógeno amónico, como el hidrogenofosfato de amonio, alargan la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria [Rowe, 1990; Devisety, 1994]. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos corroboran este planteamiento, porque el tiempo de fermentación de todos los aislados en el medio M4 fue más largo que en resto de los medios. Estos resultados son similares a los obtenidos por Galán *et al.* (1996) y Vallejo *et al.* (1996), para cepas de *B.t.* que crecen en presencia de sales de amonio.

El hecho de que los resultados para la mejor reproducción de los aislados sea en diferentes medios, concuerda con lo planteado en los estudios de Bernhard y Utz (1993) y Vallejo *et al.* (1996), cuando recomiendan optimizar un medio de cultivo para cada cepa.

#### Separación de fracciones

Cuando se produce un insecticida microbiano existen diferentes formas para establecer el método de recobrado del ingrediente activo. En estos experimentos se obtuvo que

para estos insectos las fracciones con mayor actividad biológica lo constituyeron el CFT y la biomasa, por lo que los metabolitos excretados por la bacteria al sobrenadante tratado y al que no recibió tratamiento, no ejercieron un control apreciable a nivel de laboratorio. Se puede deducir que resulta conveniente la concentración de la biomasa por centrifugación, precipitación o filtración para obtener concentraciones de esporas y cristales insecticidas que permitan ejercer un mejor control del tetuán del boniato, como lo recomienda Payne (1993) en su patente sobre el uso de *B.t.* contra el escarabajo colorado de la papa [Devisetty, 1994; Galán, 1996] (Tabla 3).

Tabla 3. Virulencia de fracciones en MO y M10 sobre *C. formicarius* (en porcentaje)

Fracciones	LBT-19	LBT-20	LBT-25
CFT	60b	79,3a	82,7b
Sobrenadante sin tratar	33b	31b	34c
Biomasa	100a	79,3a	100a
Sobrenadante tratado	46b	31b	34 c
Testigo	—	—	—
S	0,32	0,33	0,17
C.V.	14,2%	13,8%	6,9%

Debido a que la mortalidad acumulada fue mayor en la biomasa que en el CFT para los biopreparados obtenidos a partir de las cepas LBT-19 y LBT-25 y similar para la LBT-20, se hace necesario aclarar que la biomasa contenía fundamentalmente esporas y cristales insecticidas, con un porcentaje de pureza superior a los que se encontraban en el CFT. Este resultado concuerda con lo planteado por Keller y Langenbruch (1993), y Payne (1993), quienes refieren que la principal actividad insecticida de *B.t.* se encuentra en las deltaendotoxinas.

En los reaislamientos realizados a partir de insectos muertos se observó el crecimiento de colonias típicas de *B.t.*, lo que hizo evidente la patogenicidad a causa de la ingestión bacteriana.

Estos experimentos nos permiten concluir la primera etapa de la elaboración de un producto insecticida potencial contra *C. formicarius elegantulus*, basado en las propiedades insecticidas de la biomasa de estos tres aislados.

## CONCLUSIONES

- Los mejores aislados para el control de *C. formicarius* fueron LBT-19, LBT-20 y LBT-25.

- Los medios MO y M10 fueron considerados los mejores medios para la reproducción de estos aislados.
- Las fracciones contenidas en la biomasa y el CFT fueron las que mostraron mayor virulencia.

## REFERENCIAS

- Arévalo, N. K.: «Toxinas de *Bacillus thuringiensis*», Galán, L. J.; C. R. Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*, UNAM, México, 1996, p. 209.
- Bravo, A.: Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains», *Journal of Bacteriology* 179(9): 2793-2801, 1997.
- Bernhard, K.; R. Utz.: «Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses», Wiley and Sons. *Bacillus thuringiensis and Environmental Theory and Practice*, Colorado State University, Estados Unidos, 1993, pp. 255-256.
- Devisetty, B. N.: «Production and Formulation Aspects of *Bacillus thuringiensis*», Akhurst, R. J. *Proceeding of the 2<sup>nd</sup> Canberra Meeting on Bacillus thuringiensis*, 1993, p. 95.
- Galán-Wong, et al.: «Producción de *Bacillus thuringiensis*. Galán, L. J.; C. R. Padilla; H. A. L. Olivera (eds.). Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*, UNAM, México, 1996, pp. 139-145.
- Instituto de Investigaciones Fundamentales en la Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt (INIFAT): «Nuevo enfoque multidisciplinario para la lucha integrada contra el tetuán del boniato (*Cylas formicarius*) en Cuba», Proyecto de Investigación, 1995.
- Keller, B.; G. A. Langenbruch: «Control of Coleopteran Pest by *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins. A Genetic Approach», Wiley and Sons. *Bacillus thuringiensis and Environmental Theory and Practice*, Colorado State University, Estados Unidos, 1993, pp. 73-74.
- Knowles, B. H.; J. A. T. Dow: «Models for the Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Vivo», Freer y col. (eds.). *Bacterial Protein Toxins*, Zbl Bakt. Suppl. 24, New York, 1994, pp: 345-346.
- Krieg, A.; G. A. Langenbruch: «Susceptibility of Arthropod Species to *Bacillus thuringiensis*», Burges, H.D. (ed.), Academic Press, Londres/New York, 1981, pp: 837-899.
- Neal, J. W. Jr. et al.: «Activity of the Thermostable Beta-Exotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner on *Tetranychus urticae* and *T. cinnabarinus*», *J. Agric. Entomol.* 4(1): 33-40, 1987.
- Payne: «Coleopteran-Active *Bacillus thuringiensis* Isolates and Genes Encoding Coleopteran-Active Toxins», Patente 5,262,324, Mycogen Corporation, 1993.
- Piedra, F. et al.: «Manejo integrado del tetuán del boniato *C. formicarius* (Summ)», Resúmenes X Fórum de Ciencia y Técnica INISAV, 1995.
- Rowe, G. E.: «Metabolism of Bacterial Sporulation Based on Branched Chain Aminoacids Cycles», *J. Ferm.* 77: 1-14, 1990.
- Royalty, R. N.; F. R. Hall; R. A. J. Taylor: «Effects of Thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) Mortality, Fecundity and Feeding», *J. Econ. Entomol.* 83(3): 792-798, 1990.
- Vallejo, L.; S. Orduz: «Producción de un bioplaguicida a base de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, a nivel de laboratorio», *Rev. Col. Entomología* 22 (1): 61-67, 1996.
- Wasano, N.; H. Saitoh; M. Ohba: «A High Homology Exists in N-terminal Amino Acid Sequences of Deltaendotoxins Between Lepidoptera-specific and Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis* Strains», *Letters in Applied Microbiology* 24: 438-440, 1997.