

Caracterización serológica de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner aisladas de insectos españoles

H. K. ALDEBIS, E. VARGAS OSUNA y C. SANTIAGO-ALVAREZ

Cepas de *Bacillus thuringiensis* de los serotipos H 3a3b3c (*B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*), H 7 (*B. thuringiensis* subesp. *aizawai*), H 27 (*B. thuringiensis* subesp. *mexicanensis*) y H 34 (*B. thuringiensis* subesp. *konkukian*) se han aislado de ortópteros, lepidópteros y coleópteros de España.

Las cepas de los serotipos H 3a3b3c y H 27 sólo aparecieron en insectos provenientes de las Islas Canarias y las de los serotipos H 7 y H 34 de insectos de procedencia peninsular.

H. K. ALDEBIS, E. VARGAS OSUNA y C. SANTIAGO-ALVAREZ. Cátedra de Entomología Agrícola. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apartado de Correos 3048. 14080 Córdoba.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, cepas, caracterización serológica.

INTRODUCCION

El poder insecticida de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner reside en un cuerpo de naturaleza protéica (HANNAY y FITZ-JAMES, 1955), el cristal, cuerpo parasporal o δ -endotoxina, que producido durante la fase de esporulación resulta tóxico por ingestión para los insectos susceptibles (ANGUS, 1954). El espectro de su actividad insecticida, que en un principio parecía circunscribirse a especies de lepidópteros (HEIMPEL y ANGUS, 1959), se ha extendido a especies de dípteros (GOELDBERG y MARGALIT, 1977) y coleópteros (KRIEG *et al.*, 1983).

En la actualidad esta bacteria es la base de gran número de insecticidas microbianos que, por ser selectivos y específicos, comienzan a reemplazar a los insecticidas convencionales en la lucha contra plagas tanto de interés agrícola y forestal como médico-veterinario (LÜTHY *et al.*, 1982). Además las técnicas para clonar, manipular y transferir el gen que codifica la δ -endotoxina, amplían

las posibilidades insecticidas, porque posibilitan su expresión en sistemas alternativos (GELERNTER y SCHWAB, 1993; ELY, 1993; MARRONE y MACINTOSH, 1993).

Estos aspectos prácticos han impulsado a buscar cepas de la bacteria en los hábitats naturales donde con relativa frecuencia se la encuentra (DULMAGE y AIZAWA, 1982), para ampliar su acción insecticida a otros órdenes de insectos o para obtener cepas con mayor poder insecticida que las conocidas.

El presente trabajo es una contribución enmarcada en la corriente mundial para el aislamiento de nuevas cepas de *B. thuringiensis*, en el que se hace referencia a la caracterización serológica de cepas aisladas de insectos provenientes de diversos hábitats de la geografía española.

MATERIALES Y METODOS

En las muestras de insectos enfermos traídos al laboratorio para diagnosticar el ento-

mopatógeno causante, virus, hongo, protozoo, etc. se encontraron individuos con *B. thuringiensis* en su hemocele. Se trituraron en agua estéril por medio de un homogeneizador y del filtrado se tomó 1 ml que se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril. En placas con agar nutritivo (AN) que contenía Polimixina B se echaron 0,1 ml de cada una de las diluciones realizadas a partir de la dilución madre. Las placas se pusieron en la estufa a 30° C. Transcurridas 72 horas se procedió a la observación de las colonias, las de *B. thuringiensis*, que se reconocían por la presencia de espora y cristal conjuntamente, se aislaron pasándolas a estria de AN.

La caracterización serológica se realizó por la prueba de aglutinación siguiendo el método descrito por DE BARJAC (1981).

El poder insecticida de las cepas se determinó, para larvas de *Dociostaurus maroccanus*, *Spodoptera littoralis*, *S. exigua*, *Mythimna loreyi*, *Heliothis armigera* y *Agrotis segetum*, por el método de bioensayo descrito por VARGAS-OSUNA y SANTIAGO-ALVAREZ (1988), utilizando una suspensión acuosa del complejo espora-cristal obtenido según el método de OHBA *et al.* (1981).

RESULTADOS

Los individuos de los que se aisló *B. thuringiensis*, que procedían de diferentes luga-

res de la Península e Islas Canarias, pertenecían a 9 especies de insectos, distribuidas en tres Ordenes: Orthoptera, Lepidoptera y Coleoptera (Cuadro 1). Se aislaron 16 cepas de las cuales una, la que procedía del ártico *Ocnogyna baetica* perdió el cristal en el proceso de purificación.

Las cepas aisladas se reparten en cuatro serotipos (Cuadro 2) siendo el H7, *B. thuringiensis* subesp. *aizawai*, el más abundante y extendido, le sigue en abundancia el H3a3b3c, *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, que sólo se aisló de insectos de procedencia canaria y los dos serotipos restantes se aislaron uno en Canarias, el H27 *B. thuringiensis* subesp. *mexicanensis*, y el otro en la Península, el H34 *B. thuringiensis* subesp. *konkukian*.

Las cepas aisladas de los acrididos y del noctuido *M. loreyi* no tuvieron actividad tóxica para las larvas de *D. maroccanus*. Por el contrario la cepa aislada de *M. loreyi* fue tóxica para las larvas de *S. littoralis*, *S. exigua* y *M. loreyi*. La actividad tóxica del resto de las cepas todavía no ha sido ensayada.

DISCUSION

La fuente primigenia de *Bacillus thuringiensis* fueron insectos y en la actualidad

Cuadro 1.—Origen de las cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas

ORDEN	Familia	Especie	Localidad
ORTHOPTERA	Acrididae	<i>Dociostaurus maroccanus</i>	Badajoz
		<i>Chortipus bicolor</i>	Hierro Badajoz
LEPIDOPTERA	Phyticidae	<i>Ephestia kühniella</i>	Tenerife
	Pieridae	<i>Pieris rapae</i>	Tenerife
	Pyralidae	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Badajoz
	Arctiidae	<i>Ocnogyna baetica</i>	Jaén
	Notodontidae	<i>Taumatopoea pityocampa</i>	Jaén Córdoba
	Noctuidae	<i>Mythimna loreyi</i>	Badajoz
COLEOPTERA	Tenebrionidae	<i>Tenebrio molitor</i>	Tenerife

Cuadro 2.—Serotipos de *Bacillus thuringiensis* caracterizados

Especie	Estado	Origen	Serotipo	Ref.
<i>D. maroccanus</i>	Lver.	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EADm092
	L	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EADm192
	L	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EADm292
	L	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EADm392
	L	Hierro	27; <i>mexicanensis</i>	EADm492
<i>Ch. bicolor</i>	L	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EACb092
<i>E. kühniella</i>	L	Tenerife	3a3b3c; <i>kurstaki</i>	EAEk092
<i>P. rapae</i>	L	Tenerife	3a3b3c; <i>kurstaki</i>	EAPr092
<i>O. nubilalis</i>	L	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EAOn092
<i>T. pityocampa</i>	L	Jaén	7; <i>aizawai</i>	EATp092
	L	Córdoba	7; <i>aizawai</i>	EATp192
	L	Jaén	34; <i>konkukian</i>	EATp093
	L	Jaén	7; <i>aizawai</i>	EATp193
<i>M. loreyi</i>	L	Badajoz	7; <i>aizawai</i>	EAMl090
<i>T. molitor</i>	L/A	Tenerife	3a3b3c; <i>kurstaki</i>	EATm092

esta primacía le corresponde al suelo (DULMAGE y AIZAWA, 1982; MARTIN y TRAVERS, 1989). Con anterioridad a estos datos ya se habían aislado cepas del *Bacillus thuringiensis* de insectos en España pertenecientes a los serotipos H 1, *B. thuringiensis* subesp. *thuringiensis*, H 3a3b3c, *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* y H 4a4b, *B. thuringiensis* subesp. *sotto* (SANTIAGO-ALVAREZ, 1974; SANTIAGO-ALVAREZ *et al.*, 1974; ROIG *et al.*, 1975). El serotipo H1 se encontró en la Península en larvas de *Prays oleae* (ROIG *et al.*, 1975) y en Canarias en larvas de *Plusia chalcites* (SANTIAGO-ALVAREZ, 1974; SANTIAGO-ALVAREZ *et al.*, 1974); el serotipo H 3a3b3c se encontró en una población peninsular de *Ephestia kuehniella* (SANTIAGO-ALVAREZ, 1974; SANTIAGO-ALVAREZ *et al.*, 1974) y el H 4a4b en larvas de *P. oleae* (ROIG *et al.*, 1975).

Los serotipos H3a3b3c, *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* y H7, *B. thuringiensis* subesp. *aizawai*, son ricos en cepas con toxicidad para lepidópteros (NAVON, 1993), patotipo A, por ello su presencia en larvas de lepidópteros puede responder a una in-

fección natural. Sin embargo la infección sólo revistió carácter de epizootia en la población de *E. kühniella* estudiada mientras en las restantes especies parece ser debida a una relación fortuita. Estas observaciones están de acuerdo con lo que apunta la literatura en cuanto a que el *B. thuringiensis* no origina epizootias en las poblaciones de campo (BURGES, 1973) pero sí en las que se encuentran en ambientes confinados (DULMAGE y AIZAWA, 1982).

Los serotipos H27 *B. thuringiensis* subesp. *mexicanensis* y H34 *B. thuringiensis* subesp. *konkukian* se han descubierto recientemente (INSTITUTO PASTEUR, 1992) y aun se conocen pocos detalles sobre su actividad insecticida. No obstante las cepas EA 10390 (*B. thuringiensis* subesp. *mexicanensis*) y EA 10490 (*B. thuringiensis* subesp. *konkukian*) aisladas del suelo presentaron toxicidad para la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pytiocampa* (VARGAS-OSUNA *et al.*, 1994).

La presencia de cepas del serotipo H7 en larvas de los acrididos *D. maroccanus* y *Chortipus bicolor* puede ser debida a la ingestión natural de la bacteria con el alimen-

to pues en los suelos del área de procedencia de los acrídidos, Valle de La Serena (Badajoz), se aisló una cepa de *B. thuringiensis* subesp. *aizawai* (Ref. EA 10090) altamente tóxica para *S. littoralis* y *S. exigua* (SANTIAGO-ALVAREZ y ALDEBIS, 1991). De manera similar pudo haber llegado a las larvas del coleóptero *Tenebrio molitor* la cepa del serotipo H 3a3b3c aislada de ellas.

El verdadero valor práctico de estos aislamientos, para su empleo en la lucha contra insectos de interés agrícola y forestal, no lo sabremos hasta que no hayamos concluido

la determinación de las patogenicidades y la caracterización de los patotipos.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor desea agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de la Beca Postdoctoral de Formación de Personal Investigador (Estancias Temporales de Científicos y Tecnólogos Extranjeros en España), gracias a lo cual ha sido posible la realización del presente trabajo.

ABSTRACT

ALDEBIS, H. K.; VARGAS OSUNA, E. y SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1994: Serological characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner strains isolated from Spanish insects. *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**(3): 765-769.

Bacillus thuringiensis strains of the serotypes H 3a3b3c (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), H 7 (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*), H 27 (*B. thuringiensis* subsp. *mexicanensis*) y H 34 (*B. thuringiensis* subsp. *konkukian*) were isolated from Orthoptera, Lepidoptera and Coleoptera in Spain.

Strains of the serotypes H 3a3b3c and H 27 were only found in insects collected from Canarias Islands, and the serotypes H 7 and H 34 in insects from Peninsular surveys.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, strains, serological characterization.

REFERENCIAS

- ANGUS, T. A., 1954: A bacterial toxin paralysing silk-worm larvae. *Nature*, **173**: 545.
- BURGES, H. D., 1973: Enzootic diseases of insects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **217**: 31-49.
- BARJAC, H. DE, 1981: Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. En *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980* (H. D. Burges, ed.), pp. 35-43, Academic Press, London.
- DULMAGE, H. T. y AIZAWA, K., 1982: Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En *Microbial and viral pesticides* (E. Kurstak, ed.), pp. 209-237, Marcel Dekker, New York.
- ELY, S., 1993: The engineering of plant to express *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. En *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice* (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs, eds.), pp. 105-124, John Wiley & Sons, New York.
- GELERNTER, W. y SCHWAB, G. E., 1993: Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. En *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice* (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs, eds.), pp. 89-104, John Wiley & Sons, New York.
- GOELDBERG, L. J. y MARGALIT, J., 1977: A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia inguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* mosquito. *News*, **37**: 353-358.
- HANNAY, C. L. y FITZ-JEMES, P., 1955: The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Can. J. Microbiol.*, **1**: 694-710.
- HEIMPEL, A. M. y ANGUS, T. A., 1959: The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.*, **1**: 152-170.
- INSTITUTO PASTEUR, 1992: Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. *Catalogue 1. International Entomopathogenic Bacillus Centre. Paris, France.*
- KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGEBROOK, G. A. y SCHNETTER, W., 1983: *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Z. Angew. entomol.*, **5**: 500-507.

- LUTHY, P.; CORDIER, J. I. y FISHER, H. M., 1982: *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic consideration and application. En *Microbial and viral pesticides* (E. Kurstak, ed.), pp. 35-74, Marcel Dekker, New York.
- MARRONE, P. G. y MACINTOSH, S. C., 1993: Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. En *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs, eds.), pp. 221-235, John Wiley & Sons, New York.
- MARTIN, P. A. y TRAVERS, R. S., 1989: Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Env. Microbiol.*, **55**: 2437-2442.
- NAVON, A., 1993: Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice* (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey y S. Higgs, eds.), pp. 125-146, John Wiley & Sons, New York.
- OHBA, M.; ONO, K. y IWANANI, S., 1981: Two subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan, *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (serotype 18) and *B. thuringiensis* subsp. *tochigiensis* (serotype 19). *J. Inverteber. Pathol.*, **38**: 184-190.
- ROIG, F.; RAMOS, P. y BAREA, J. M., 1975: Toxicidad de varias estirpes de *Bacillus thuringiensis* aisladas de larvas muertas de *Prays oleae* (Bernard). *Microbiol. España*, **28**: 153.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1974: Bacterias entomopatógenas en lepidópteros españoles. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica Madrid. 188 pp.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C.; ARROYO, M. y ALFARO, A., 1974: Aislamiento de un *Bacillus thuringiensis* Berl. en lepidópteros españoles. *SHILAP*, **5**: 74-81.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C. y ALDEBIS, H. K., 1991: Two *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera littoralis* y *Spodoptera exigua*. *Internacional Conference on the biology of Bacillus thuringiensis*, 28-31 julio, Oxford.
- VARGAS-OSUNA, E. y SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1988: Differential response of male and female *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep., Noctuidae) individuals to a nuclear polyhedrosis virus. *J. Appl. Ent.*, **105**: 374-378.
- VARGAS-OSUNA, E.; MUÑOZ LEDESMA, J.; ALDEBIS, H. K. y SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1994: Patógenos y parásitos para el control de la procesionaria del pino, *Thaumetopoea pityocampa* (D. y Schiff.) (Lep.: Noctodontidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **20** (en prensa).