

## Estudios preliminares del efecto entomotóxico de *Bacillus laterosporus* frente a larvas de *Ocnogyna baetica* en Jaén

P. PALOMEQUE, M. MARTÍNEZ, E. VALDIVIA y M. MAQUEDA

En la bibliografía se encuentran numerosas citas sobre la patogenicidad del género *Bacillus* que van desde la secreción de exotoxina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y la producción de antibióticos hasta el efecto entomotóxico de los cristales paraesporales más profundamente estudiados en la especie *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus laterosporus* ha sido descrito como potencialmente patógeno de *Apis mellifera* en 1917, pero no existen otras referencias hasta 1976, en que se describe la producción del antibiótico laterosporamina. (SHOJI *et al.*, 1976).

En este trabajo llevado a cabo en el Departamento de Microbiología del C. Universitario de Jaén, se describe la acción tóxica de este microorganismo sobre los estados larvarios de *Ocnogyna baetica*, propia de zonas herbáceas incultas del Mediterráneo occidental, pero potencialmente peligrosa para cualquier cultivo próximo (*Vicia faba*, *Medicago sativa*, así como numerosos cereales), de donde se puede recoger.

P. PALOMEQUE, M. MARTÍNEZ. Dpto. Microbiología. C. Universitaria «Santo Reino». Jaén.

E. VALDIVIA, M. MAQUEDA. Facultad de Ciencias. Granada.

### INTRODUCCION

En las últimas décadas, la utilización de ciertas especies del género *Bacillus* en el control biológico de plagas de insectos (lepidópteros, coleópteros, heminópteros y dípteros) en plantas, ha sido objeto de numerosas investigaciones, ya que su empleo no parece afectar al hombre ni a los animales.

La especie más estudiada ha sido *B. thuringiensis* descubierta y descrita en 1915 por BERLINER, como patógena para las larvas de la mariposa de la harina (*Anagasta (Ephesia) kuehniella*). Unos años antes, ISHIWATA en Japón aisló una bacteria esporulada de larvas del gusano de seda muertas y las llamó «sotto Bacillen» (*B. sotto*). AOKI y CHIGASAKI continúan investigando con esta bacteria y en los años 1915-1916 publican

una serie de trabajos donde describen la bacteria y la enfermedad causada por ella en las larvas del gusano de seda.

Posteriormente, HEIMPEL y AUGUS (1958) revisaron la taxonomía de las bacterias patógenas de insectos y *B. sotto* pasó a ser considerada como una variedad de *B. thuringiensis* de BERLINER (1915).

El microorganismo originalmente aislado por BERLINER se perdió y en 1927 MATTES (1927) reaisló el *B. thuringiensis* de larvas de *A. kuehniella* y describió la enfermedad causada por el bacilo en el insecto.

Aunque ambos autores señalaron la presencia de un cuerpo paraesporal en el esporangio de esta bacteria, dicho cuerpo no fue relacionado con la patogenicidad hasta muchos años después por HANNAY (1953).

Subsiguientes estudios con estas y otras cepas de *Bacillus* (*B. thuringiensis entomo-*

*cidus*, *B. thuringiensis* Berliner, *B. thuringiensis* sotto, *B. thuringiensis* kurstaki, *B. thuringiensis* israelensis), demostraron que la entomotoxicidad de estas bacterias residía en los cristales paraesporales (HEJMPPEL and ANGUS, 1960; TYRELL *et al.*, 1979; YAMAMOTO and Mc LAUGHLIN, 1981; IIZUTA and YAMAMOTO, 1983; YAMAMOTO and IIZUTA, 1983).

Estos cristales paraesporales son producidos por la bacteria durante el proceso de esporulación y sus efectos tóxicos, así como la naturaleza química de los mismos, han sido aclarados en numerosos trabajos (SINGER, 1973; BULLA *et al.*, 1975; VANKOVA, 1978; LUTHY, 1980).

También han sido citadas como patógenas de insectos otras especies de *Bacillus*, unas cristalíferas (*B. larvae*, *B. popilliae*) y otras no productoras de cristales (*B. lentimorbus*, *B. cereus*).

*B. larvae* produce una enfermedad de las abejas llamada «podredumbre del panal» (WHITE, 1906, 1912).

*B. popilliae* y *B. lentimorbus* producen la «enfermedad lechosa» en larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*, Newman) (DUTHY, 1940; PRIDAM *et al.*, 1964). La enfermedad se caracteriza porque la hemofilia de las larvas se llena de bacterias y esporas, adquiriendo una apariencia lechosa. Estas bacterias se han utilizado con éxito para combatir plagas del insecto mencionado, en áreas densamente infectadas, aunque no se conoce exactamente el mecanismo íntimo de la producción de la enfermedad ni se han detectado sustancias tóxicas en las bacterias.

Finalmente, *B. cereus* ha sido frecuentemente aislado de coleópteros, himenópteros y lepidópteros enfermos. Presumiblemente su patogenicidad se debe a la actividad fosfolipasa C, que actúa provocando alteraciones en el digestivo de los insecto susceptibles, con la consiguiente septicemia y muerte del insecto. Muchos lepidópteros son resistentes a la acción de *B. cereus*, porque

en las condiciones de alcalinidad de su digestivo la síntesis de fosfolipasa C es inhibida (BULLA *et al.*, 1975).

Otra especie de *Bacillus* productora de cristales paraesporales es *B. laterosporus* que fue referido en 1917 como potencialmente patógeno de abejas (Mc GRAY, 1917), pero desde entonces no existen otras referencias bibliográficas hasta 1976, en que se describe la producción del antibiótico laterosporamina (SHOJI *et al.*, 1976).

En nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la patogenicidad de esta bacteria para las larvas del lepidóptero *Ocnogyna baetica* propia de zonas herbáceas del Mediterráneo Occidental que suele encontrarse en terrenos incultos de campiña, pero potencialmente peligrosa para cualquier cultivo próximo (*Vicia faba*, *Medicago sativa*, así como numerosos cereales), debido a la voracidad de las larvas y al elevado número en que se encuentran.

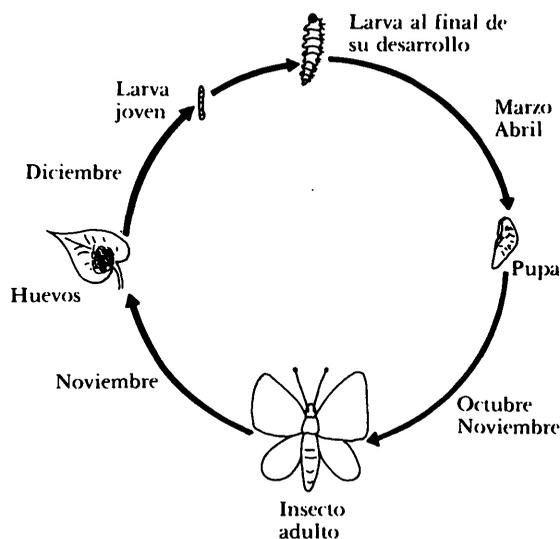


Fig. 1.—Esquema del ciclo vital de *O. baetica*: Las mariposas salen entre mediados de agosto y mediados de septiembre. Las larvas nacen a finales de noviembre-primeros de diciembre y son activas hasta abril cuando forman pupas. Los insectos adultos nacen a finales de octubre-noviembre.

Los resultados preliminares sobre la acción patógena de esta bacteria frente a las larvas de *O. baetica* se exponen en el presente trabajo.

**MATERIAL Y METODOS**

**Organismos**

*Bacillus laterosporus* CCM 1.612.

*Ocnogyna baetica*, lepidóptero, superfamilia Noctuoidea, familia Arctiidae, subfamilia Micrarctiinae, cuyo ciclo de vida se esquematiza (figura 1).

**Infección de larvas**

Las larvas de *O. baetica* en las últimas fases de su desarrollo (meses de marzo y abril), fueron alimentadas durante 14 días con hojas recogidas de su hábitat natural (sustrato de margas calizas con plantas nitrófilas propias de lugares secos y abiertos) previamente rociadas con un cultivo de 48 horas de *B. laterosporus* CCM 1.612 a 37°C. en BHI (infusión cerebro corazón, BBL).

**Medidas de las pupas**

Las pupas fueron medidas con un calibre

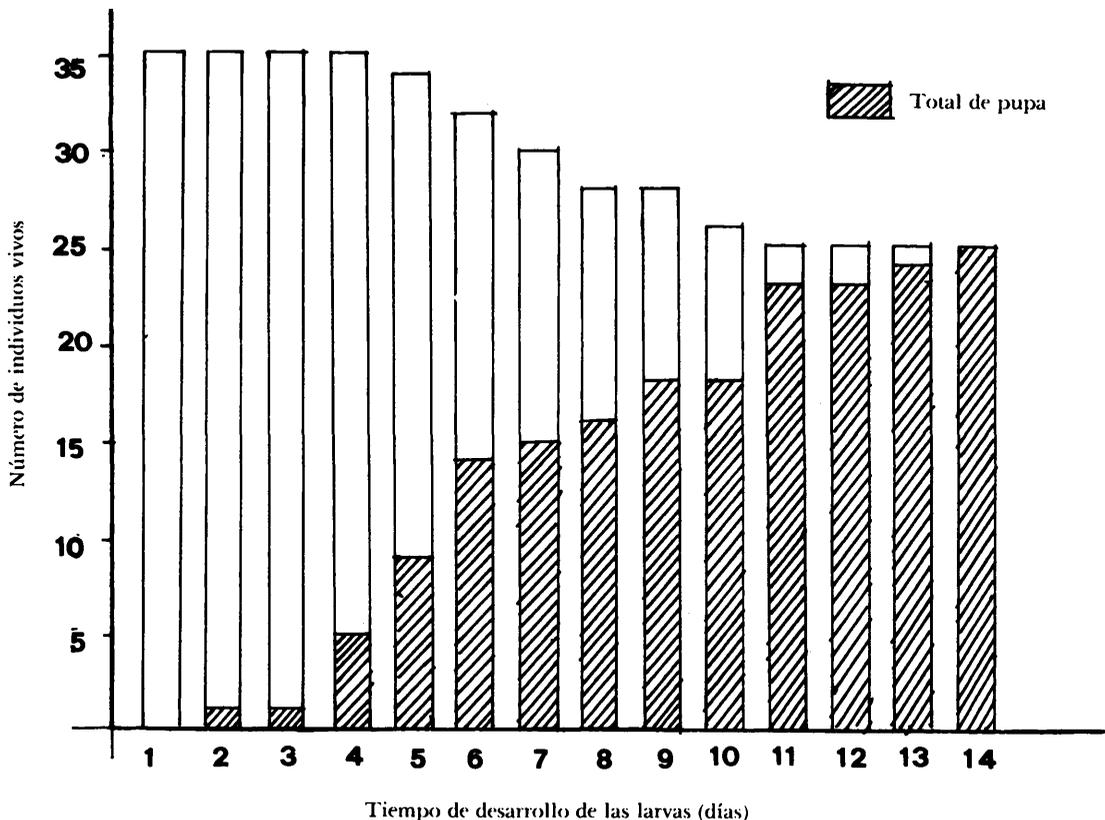


Fig. 2.—Esquema representativo de la mortalidad de individuos infectados (larvas) con respecto al tiempo en días y de la evolución seguida por las larvas infectadas. En la gráfica se refleja la mortalidad, así como la supervivencia representada por la formación de pupas.

MAGO, que posee una aproximación de 1/20 milímetros.

### Análisis físico-químico de las heces

Las heces (testigo y alteradas), previamente desecadas (24 h. a 100°C.), fueron sometidas a las siguientes pruebas:

a) Difracción con rayos X: se utilizó un difractor de rayos X, RIGAKU, modelo MINIFLEX. Radiación Cu K $\alpha$ ; intensidad, 500 C.P.S.; velocidad, 0,5°/min.

b) Análisis Térmico Diferencial (ATD): los termogramas presentados se obtuvieron en un equipo de termoanálisis METTLER TA 300, entre 37 y 710°C., calentando con una velocidad de 10°C./minuto.

c) Análisis elemental: se utilizó un analizador elemental de la marca PERKIN-ELMER 240 C.

## RESULTADOS

### 1) Toxicidad de *B. laterosporus* frente a larvas de *O. baetica*

En primer lugar observamos un 30% de mortalidad entre el quinto y el undécimo día en las larvas infectadas, mientras que las larvas usadas como testigo siguieron su ciclo normal de desarrollo (figura 2).

El 70% de larvas infectadas que no murieron formaron pupas, de morfología semejante a las testigo, aunque de tamaño considerablemente mayor. La longitud media de las pupas infectadas fue 3,6 milímetros superior a la de las testigo, y la anchura media fue 1,7 milímetros mayor en el caso de las infectadas.

Algunas de estas pupas (25%) murieron a las pocas semanas y otras (37,5%), que hemos disecado en el laboratorio, se encuentran considerablemente retrasadas en su desarrollo, ya que a estas alturas del ciclo deberían estar los adultos completamente forma-

dos y en su lugar encontramos sólo tejido blando y esbozos de digestivo.

En segundo lugar cabe destacar la disminución del número de heces/individuo y día en larvas infectadas con respecto a las testigo (figura 3), lo que está relacionado con el hecho de que las larvas alimentadas con hojas infectadas dejan rápidamente de comer o comen mucho menos que las testigo. Además, algunas de las heces procedentes de larvas infectadas (aproximadamente un 5% del total), aparecieron alteradas, mostrando un color rojo o pardo frente al verde habitual y con gran cantidad de agregados cristalinos de forma alargada, visibles al microscopio óptico (figura 4). Asimismo, en estas heces aparecían los contenidos vegetales menos degradados que en las heces normales, procedentes de testigos.

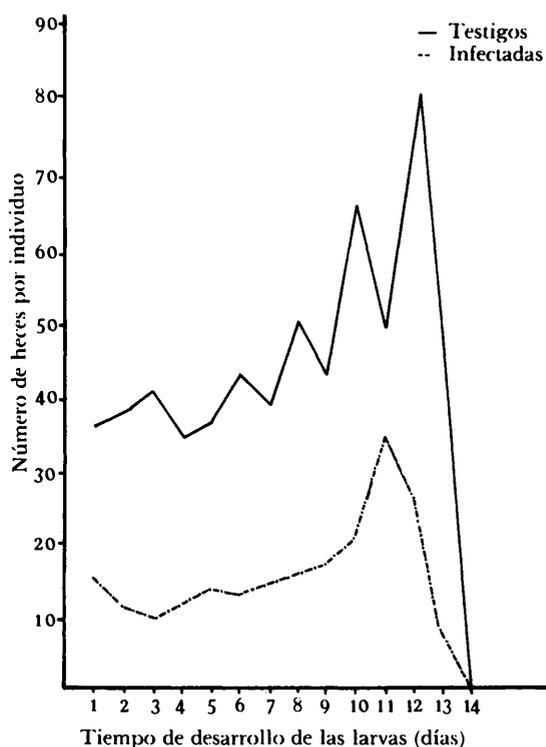


Fig. 3.—Comparación del número de heces considerados por individuo y día, procedentes de larvas testigo e infectadas.

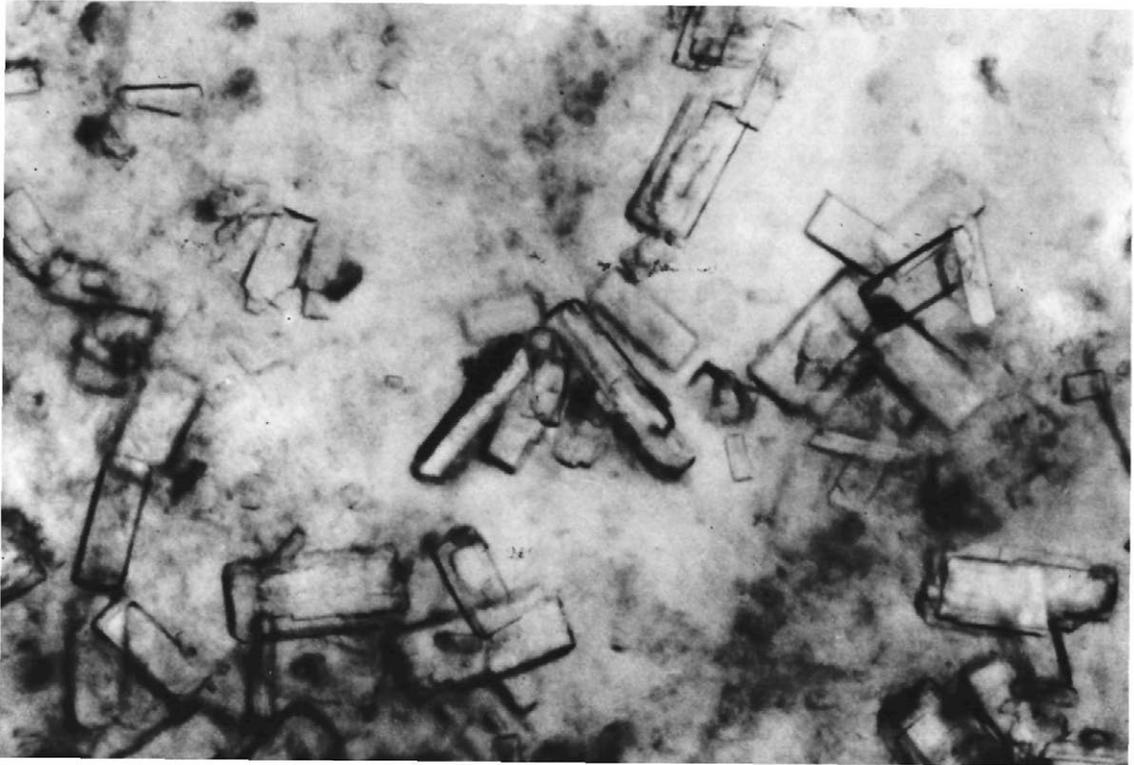


Fig. 4.—Microfotografía (400 x) óptica de los agregados cristalinos presentes en las heces alteradas.

## 2) Análisis físico-químico de las heces

A fin de hacer una aproximación inicial sobre la naturaleza química de estos cristales, realizamos varios análisis físico-químico de las heces (testigo y alteradas), previamente desecadas durante 24 horas a 100°C.

En primer lugar el registro de la difracción con rayos X de las heces alteradas mostró un pico claro a los 11,4°, no apareciendo ningún pico apreciable en el registro de las heces testigo (figura 5).

A continuación realizamos un análisis térmico diferencial de ambos tipos de heces (figuras 6 y 7), obteniéndose el porcentaje de masa perdida en cada paso (cuadro 1).

Como se puede apreciar, la muestra infectada resultó poseer un 1,321% más de com-

ponentes volátiles «ligeros» (proteínas, azúcares sencillos...) que la testigo. Asimismo, presentaba un 2,783% más de componentes volátiles «pesados» (celulosa, lignina...).

Finalmente, realizamos un análisis elemental de ambos tipos de muestra, cuyos resultados se muestran en el cuadro 2, en la

Cuadro 1.—Análisis Térmico Diferencial de las heces procedentes de larvas de *O. bactica* normales (testigo) e infectadas con *B. laterosporus*.

	Temperatura (°C.)			
	De 35 a 150°C.	De 150 a 350°C.	De 350 a 700°C.	Más de 700°C.
Testigo ...	10,596%	38,879%	34,813%	15,712%
Infectadas .	7,9943%	40,200%	37,596%	14,22%

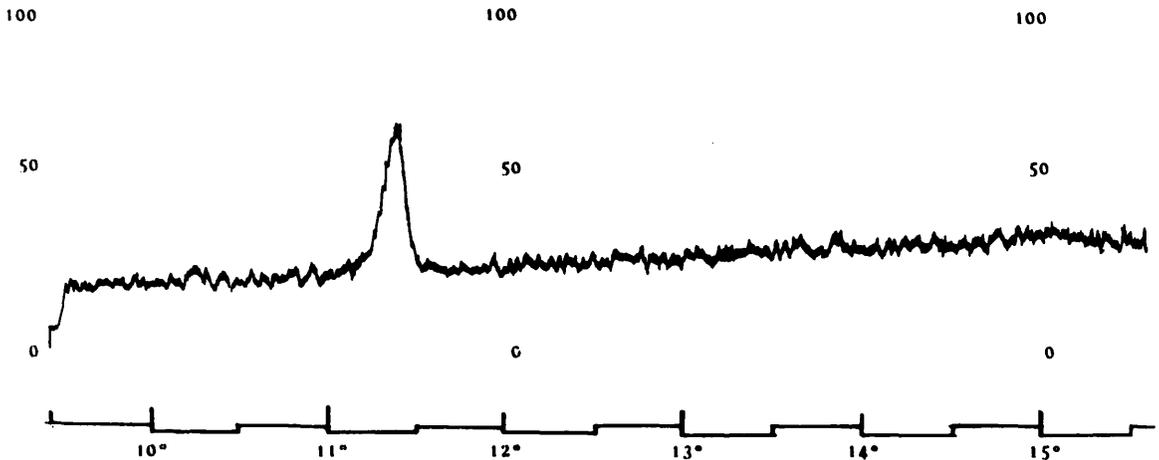


Fig. 5.—Análisis por difracción con rayos X de las heces alteradas (500 C.P.S. 0,5°/minuto).

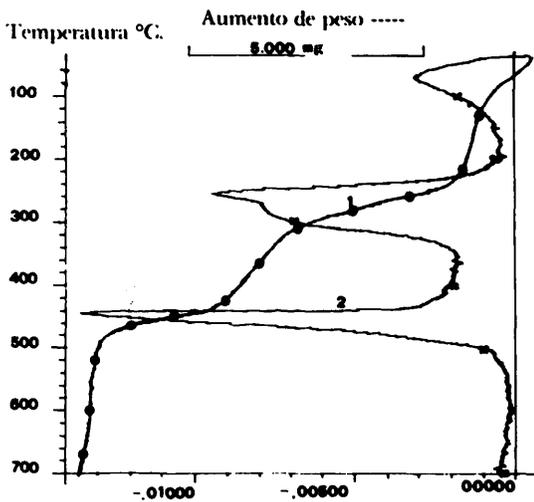
Cuadro 2.—Análisis elemental de las heces procedentes de larvas de *O. baetica* normales (testigo) e infectadas con *Bacillus laterosporus*.

	Análisis elemental (%)		
	C	H	N
Testigo .....	35,68	4,90	3,19
Infectadas .....	33,68	4,79	6,78

que se observa que el contenido en nitrógeno de las heces infectadas es algo mayor del doble que el de las heces testigo, lo cual debe suponer lógicamente, un mayor contenido proteico en el caso de las primeras.

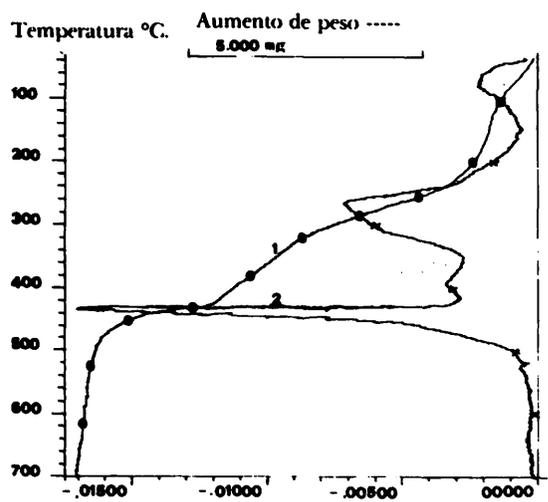
**DISCUSION**

Los resultados obtenidos hasta el mo-



Pérdida de masa (1) y de su derivada (2) en mg./seg.

Fig. 6.—Termograma de las heces testigo. Se relaciona el aumento de temperatura con la pérdida de peso (1) y con su derivada (2) expresado en mg./seg.



Pérdida de masa (1) y de su derivada (2) en mg./seg.

Fig. 7.—Termograma de las heces infectadas. Se relaciona el aumento de temperatura con la pérdida de peso (1) y con su derivada (2) expresado en mg./seg.

mento parecen demostrar que *B. laterosporus* es moderadamente tóxico para las larvas de *O. baetica*, aunque queda por valorar su actividad en el desarrollo de las pupas, dato que puede ser muy interesante y que requiere posteriores estudios. Dado que el ciclo de vida del insecto no permite disponer del material adecuado en todo momento, la repetición de las experiencias se ve limitada por esta circunstancia. De todos modos, pensamos que la toxicidad adicional en las pupas o la incidencia en el retraso de su desarrollo y por consiguiente en la eclosión del adulto y en la puesta del mismo, junto con el efecto directo de la bacteria sobre las larvas, podrían ser consideradas como pruebas preliminares a favor de la posible utilización de *B. laterosporus* en el control biológico de plagas de *O. baetica*.

Por otra parte, y respecto al análisis físico-químico de las heces, reunidas todas las observaciones, se aprecian «a groso modo» tres diferencias fundamentales en la composición química de ambos tipos de muestra.

Las heces infectadas mostraron: 1) mayor contenido en nitrógeno (6,78% frente a 3,19% en el testigo), lo cual indica un mayor porcentaje de proteínas; 2) mayor proporción de componentes volátiles «ligeros» (azúcares sencillos, proteínas...); 3) mayor proporción de componentes volátiles «pesados» (celulosa, lignina...).

Estos datos se pueden relacionar con nues-

tras observaciones de las heces alteradas al microscopio. La presencia de agregados cristalinos podría estar en conexión con el aumento de proteínas, si bien éste podría también atribuirse a una descamación del epitelio intestinal de las larvas infectadas, debido al efecto irritante de la toxina sobre el mismo, y el aumento de componentes volátiles «pesados» se relacionaría con la mayor proporción de tejidos vegetales poco digeridos presentes en heces procedentes de larvas infectadas.

Finalmente, pensamos, sería interesante determinar si estos agregados cristalinos, probablemente de naturaleza proteica, están en algún modo relacionados con los cristales paraesporales de la bacteria infectante, así como su papel en la patogenia de la infección, para lo cual será preciso la purificación de ambos, a fin de determinar su naturaleza y poder establecer su toxicidad.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a don José Miguel Cámara, Profesor del Departamento de Geología del Colegio Universitario de Jaén, a don Cristóbal Valenzuela Calahorro, antiguo Director del mismo y a don José Aguilar Ruiz, Director del Departamento de Edafología de la Facultad de Ciencias de Granada, su colaboración en los análisis físico-químicos realizados en las heces.

## ABSTRACT

PALOMEQUE, P., MARTÍNEZ, M., VALDIVIA, E. y MAQUEDA, M.: Estudios preliminares del efecto entomotóxico de *Bacillus laterosporus* frente a larvas de *Ocnogyna baetica* en Jaén, *Bol. Serv. Plagas*, 11: 147-154.

There are many references about the pathogeny of the genus *Bacillus*, including the production of exotoxins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), antibiotics, and the entomotoxic paraesporal bodies which have been deeply studied in *B. thuringiensis*.

The sp. *B. laterosporus* was described as potentially pathogen for *Apis mellifera* in 1917. However, not other references can be found until 1976. when SHOJI *et al.* (1976), described the production of the antibiotic «laterosporamina».

In this study, which has been carried out at the Dept. of Microbiology of the U.C. of Jaen, we describe the toxic effect of this microorganism over the larval stage of *Ocnogyna baetica*, an especie characteristic of the Herbaceous of the Western Mediterranean which normally lives in wild areas of the champaign, until also potentially dangerous of nearby crops (*Vicia faba*, *Medicago sativa*, as well as many cereals) from whose has been frequently isolated.

## BIBLIOGRAFIA

- OAKI, K. and CHIGASAKI, Y., 1915: Ueber die Pathogenität des sog. *Bacillus sotto* (Ishiwata) bei seidenraupen. *Mitt. Med. Fak. kais. Univ.*, Tokio, 13: 419-440.
- AOKI, K. and CHIGASAKI, Y., 1916: Ueber das toxins von sog. sotto-Bacillen. *Mitt. Med. Fak. kais. Univ.*, Tokyo, 14: 59-80.
- BERLINER, E., 1915: Ueber die Schalaffsucht der Nehl-mottenrange (Ephestia Küchniella, Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. *Z. angew. Entomol.*, 2: 29-56.
- BULLA, L. A. (jr.); RHODES, R. A. and St. JULIAN, G., 1975: Bacteria as insect pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29: 163-190.
- BULLA, L. A.; KRAMER, K. J.; COX, D. J.; JONES, B. L.; DAVIDSON, L. I. and LOOKHART, G. L., 1981: Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 256 (6): 3000-3004.
- DUTKY, S. R., 1940: Two new spore-forming bacteria causing milky diseases of Japanese beetle larvae. *J. Agr. Res.*, 57: 68.
- FAST, P. G. and DONAGHUE, T. P., 1971: The  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. II: on the mode of action. *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 135-138.
- HANNAY, C. L., 1953: Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature*, 172: 1004.
- HEIMPEL, A. M. and ANGUS, T. A., 1958: The taxonomy of insects pathogens related to *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.*, 4: 531-541.
- HEIMPEL, A. M. and ANGUS, T. A., 1960: Bacterial Insecticides. *Bacteriol. Rev.*, 24: 266-288.
- IZUKA, T. and YAMAMOTO, T., 1983: Possible location of the mosquitocidal protein in the cristall preparation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 19: 187-192.
- KLOWDEN, M. J.; GARY, A. H. and BULLA, L. A. (jr.), 1983: Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (2): 312-315.
- LUTHY, P., 1980: Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 8: 1-7.
- MATTES, O., 1927: «Parasitäre Krankheiten der Mehl-motten larven und versuche über ihre verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. *Sitzber. Ges. Beförder Ges Naturw. Marburg*, 62: 381-417.
- PRIDHAM, T. G.; G. St. JULIAN (jr.); ADAMS, G. L.; HALL, H. H. and JACKSON, R. W., 1964: Infection of *Bopillia japonica* Newman larvae with vegetative cells of *Bacillus popilliae* Dühthy and *Bacillus lentimorbus* Dühthy. *J. Insect. Pathol.*, 6: 204-213.
- SJAMASANTI, W.; PANTUWATANA, S. and BHUMIRATANA, A., 1982: Role of the paraesporal body in causing toxicity of *Bacillus thuringiensis* toward *Aedes aegypti* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 41-48.
- SHOJI, J.; SAKAZAKI, R.; WAKISAKA, Y.; KOIZUMY, K.; MAYAMA, M.; MATSUMOTO, K., 1976: Isolation of a new antibiotic: laterosporamina. *J. Antibiot.*, 29 (u): 390-393.
- SINGER, S., 1973: Insecticidal activity of recent bacterial isolated and their toxins against mosquito larvae. *Nature*, 244: 110-111.
- THOMAS, W. E. and ELLAR, D. J., 1983: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxins: effects on insects and mammalian cells «in vitro» and «in vivo». *J. Cell. Science*, 60: 181-157.
- TYRELL, D. J.; DAVIDSON, BULLA, L. A. (jr.) and RAMOSKE, W. A., 1979: Toxicity of parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. *App. Environ. Microbiol.*, 38: 656-658.
- TYRELL, D. J.; DAVIDSON, L. I.; BULLA, L. A. (jr.); ANDREWS, E. R. (jr.); KRAMER, K. J.; DAVIDSON, L. I. and NORDIN, P., 1981: Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Bacteriol.*, 145: 1052-1062.
- VANKOVA, J., 1978: The heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol.*, 23: 162-174.
- WHITE, G. F., 1906: The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases. *Tech. Ser. Burc. Entomol. U.S. Dep. Agr.*, nº 14.
- WHITE, G. F., 1912: The cause of European foulbrood. *U.S. Dep. Agr. Bur. Entomol. Circ.*, 157: 1-15.
- YAMAMOTO, T. and Mc. LAUGHLIN, R. E., 1981: Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva. *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103: 414-421.
- YAMAMOTO, T.; IZUKA, T. and ARONSON, J. N.: Mosquitocidal Protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: identification and Partial Isolation of the Protein. *Cur. Microbiol.*, 9: 279-284.
- YAMAMOTO, T. and IZUKA, T., 1983: Two types of entomocidal toxins in the Parasporal Crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 227 (1): 233-241.