

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE CEPAS NUEVAS DE *Bacillus thuringiensis* AISLADAS DE CHIAPAS CONTRA *Trichoplusia ni* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

José Fernando Ornelas-Pérez¹, María Guadalupe Maldonado-Blanco¹, Myriam Elías-Santos¹, María del Socorro Flores González², Carlos Francisco Sandoval-Coronado¹ y Luis J. Galán Wong. Instituto de Biotecnología, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza Nuevo León. fernaornelas@gmail.com.

RESUMEN: Se evaluó la toxicidad de 11 aislamientos de *Bacillus thuringiensis* provenientes de suelo de Chiapas. Estas cepas fueron cultivadas en medio de melaza y harina de soya durante 3 días a 30°C y 200 rpm. Después de la extracción del complejo espora-cristal se realizaron bioensayos preliminares usando dieta artificial contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* y a partir de estos se seleccionaron 3 cepas nativas para la determinación de CL₅₀. Las cepas M2-7, M2-9 y M2-11 causaron mortalidad del 100% a concentración de 5 µg/cm², posteriormente, se determinó la CL₅₀ de 242.64, 245.47 y 258.29 ng/cm², respectivamente; se utilizaron como cepas de referencia las cepas GM-7, IB-7, IB-62 y HD-1 que mostraron CL₅₀ de 278.99, 178.20, 147.40 y 254.14 ng/cm². La comparación de medias de las CL₅₀ de las cepas nativas y las de referencia mostró que las cepas nativas presentaron concentraciones letales medias significativamente similares a las cepas de referencia.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, aislamiento, fermentación, toxicidad, *Trichoplusia ni*.

Assessment of new strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from Chiapas against *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT: Eleven *Bacillus thuringiensis* isolates from Chiapas were bioassayed for toxicity against *Trichoplusia ni*. The strains were cultured in molasses and soybean flour for 3 days at 30° C and 200 rpm. After to recovery of the spore-crystal complex this was tested in artificial diet bioassays against *Trichoplusia ni* neonate larvae. The strains M2-7, M2-9 and M2-11 caused 100% mortality at 5 µg/cm² concentration, then they showed LC₅₀ of 242.64, 245.47 and 258.29 ng/cm², respectively. GM-7, IB-7, IB-62 and HD-1 strains were used as reference strain which showed LC₅₀ of 278.99, 178.20, 147.40 and 254.14 ng/cm². Means comparison of native and reference strains showed that native strains presented median lethal concentrations significantly similar than the reference strains.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, isolation, fermentation, toxicity, *Trichoplusia ni*.

Introducción

El continuo uso de insecticidas químicos ha ocasionado daños ecológicos y de salud por ello, constantemente se buscan nuevas alternativas biológicas. *Bacillus thuringiensis* es una alternativa de control biológico para evitar el uso de insecticidas químicos, también se tiene que con el uso de plantas transgénicas ha ocasionado que algunos insectos hayan desarrollado resistencia al control microbiano; de ahí surge la necesidad de buscar cepas nuevas de *Bacillus thuringiensis* que compensen dicha resistencia y tengan mayor actividad tóxica contra insectos lepidópteros debido a sus nuevas proteínas Cry.

En el presente trabajo el principal objetivo fue aislar, producir el complejo espora-cristal y evaluar la toxicidad de nuevas cepas nativas provenientes de suelo de Chiapas contra larvas del primer estadio de *Trichoplusia ni* utilizando dieta artificial y comparar la actividad tóxica contra cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis*, GM-7, IB-7, IB-62 y HD-1 que se conocen como altamente tóxicas contra el insecto de referencia.

Materiales y Método

Las muestras de suelo fueron obtenidas de diversas localidades del Estado de Chiapas. Se tomó 1 gramo de cada una de las muestras colectadas con las cuales se realizaron suspensiones en agua estéril y posteriormente se calentaron a una temperatura de 80° C, por 10 minutos, posteriormente se sembraron alícuotas en placas de Agar Nutritivo (Merck) a 30° C por 48 horas, de las colonias resultantes se realizaron frotis utilizando tinción con cristal violeta al 2% (Saleh *et al.*, 1970). Para la fase de producción del complejo espora-cristal se activaron las nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* en tubos con agar nutritivo inclinado a pH 7.0 incubándolas a 30°C por 24 hrs, posteriormente, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio melaza y harina de soya (Cuadro 1), después se incubaron en agitación a 200 rpm a 30° C por 72 hrs hasta obtener un 80% de esporulación.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo para la producción del extracto insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

	Ingredientes	g / l
Medio de Producción Melaza y Harina de soya	Melaza	10
	LRM	10
	Harina de Soya	10
	CaCO ₃	1.0
	MgSO ₄	0.3
	ZnSO ₄	0.02
	FeSO ₄	0.02
	MnSO ₄	0.02
	pH	7.0

Para la recuperación del complejo espora-cristal, se utilizó el método de precipitación con lactosa y acetona (Dulmage, 1970). Posteriormente se llevó a cabo la evaluación de los extractos insecticidas mediante bioensayos contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* utilizando dieta artificial (Shorey, 1965). En los bioensayos preliminares se utilizaron concentraciones en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$: 50, 5 y 2.5 con tres repeticiones cada uno. Estas concentraciones del complejo espora-cristal fueron vertidas sobre la superficie de placas de microtítulo conteniendo 1 ml de la dieta Shorey (24/concentración). Las placas tratadas y control se mantuvieron en condiciones de 30°C y 50-80% de humedad relativa durante tres días. Los resultados de mortalidad se registraron al tercer día post-aplicación del bioinsecticida y se sometieron a Análisis de Varianza, seguido de diferenciación de medias, mediante el método de Diferencia Mínima Significativa al nivel del 0.05 (Olivares-Saénz, 1994). Posteriormente las cepas con mayor toxicidad se evaluaron para la determinación de la Concentración Letal Media, donde se utilizaron 6 concentraciones en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 5, 4, 3.5, 3.0, 2.5 y 2.0 por triplicado. Los resultados de mortalidad obtenidos al tercer día post-aplicación fueron sometidos al análisis estadístico Probit computarizado (United States Applied and Environmental Health, 1989) para obtener la CL_{50} .

Resultados y Discusión

Se obtuvieron 11 aislamientos de *Bacillus thuringiensis* provenientes de suelos de localidades de Chiapas. En la figura 1 se muestran los porcentajes de mortalidad de larvas de *Trichoplusia ni* causados por las 24 cepas de *Bacillus thuringiensis* a las 72 horas post-aplicación.

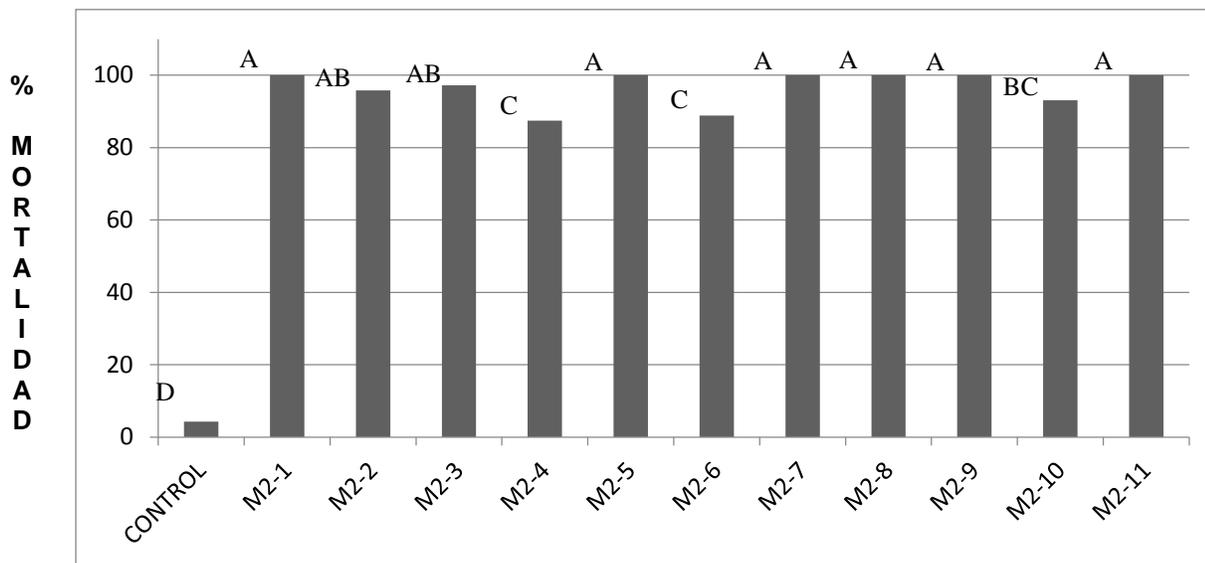


Figura 1. Mortalidad de larvas de *Trichoplusia ni* mostradas por cepas nuevas nativas de *Bacillus thuringiensis* nativas de Chiapas (ANOVA, DMS, $p < 0.05$). $F = 4.7717$, $gl = 10,22$, $p < 0.001$.

Las cepas M2-1, M2-5, M2-7, M2-8, M2-9 y M2-11 mostraron mortalidad del 100%, mientras que las cepas M2-2, M2-3 y M2-10 presentaron mortalidad mayor al 93%. Las cepas con menor toxicidad fueron M2-4 y M2-6, con mortalidad del 87%, a concentración de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F = 4.7717$, $gl = 10,22$, $p < 0.001$). En la selección de las cepas a las cuales se determinaría la CL_{50} se tomó en cuenta aquellas cepas que presentaron mayor toxicidad contra *Trichoplusia ni* a concentración de $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las cepas que conjuntamente presentaron alta toxicidad mayor del 80% a esta concentración fueron M2-7, M2-9 y M2-11. En la tabla 2 se presentan los resultados de la determinación de la CL_{50} de las cepas M2-7, M2-9 y M2-11 y la comparación con las cepas de referencias, GM-7, IB-7, IB-62 y HD-1. La comparación de medias de CL_{50} ($F = 1.647$, $g.l. = 6, 14$; $p < 0.206$) mostró que la actividad tóxica de las cepas nuevas aisladas de suelo de Chiapas: M2-7, M2-9 y M2-11 fueron significativamente semejantes a las cepas de referencia: GM-7, IB-7, IB-62 y HD-1 probadas contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*. Al comparar el trabajo de Gallegos Morales *et al.* (2003), los cuales mostraron que la CL_{50} de las preparaciones de esta bacteria sobre larvas del primer estadio de *Trichoplusia ni* varía de $9.31 \pm 2.82 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ del extracto crudo de *Bacillus thuringiensis* obtenido por fermentación, por mililitro de dieta artificial suministrada al insecto de prueba con los resultados de las cepas nativas aisladas de suelo de Chiapas resultaron que éstas mostraron mayor actividad tóxica con CL_{50} de $242.64 \text{ ng}/\text{cm}^2$.

Conclusiones

Se aislaron 11 cepas nuevas nativas de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo del Estado de Chiapas. La mayoría de las cepas evaluadas mostraron actividad tóxica superior al 87% contra *Trichoplusia ni* en concentraciones de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las cepas M2-7, M2-9 y M2-11 mostraron CL_{50} promedio de 242.64, 245.47 y 258.29 ng/cm^2 , respectivamente. Así mismo las cepas de referencia GM-7, IB-7, IB-62 y HD-1 mostraron CL_{50} promedio de 278.99, 178.20, 147.40 y 254.14 ng/cm^2 , respectivamente. La comparación de medias de CL_{50} ($F = 1.647$, $g.l. = 6, 14$; $p < 0.206$) mostró que la actividad tóxica de las cepas nuevas aisladas de suelo de Chiapas fueron significativamente semejantes

a las cepas de referencia probadas contra *Trichoplusia ni*.

Cuadro 2. Comparación de CL₅₀, en ng/cm², de los extractos insecticidas de las cepas nuevas de *Bacillus thuringiensis* de suelos de Chiapas, probados en bioensayos contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* usando dieta artificial analizados mediante ANOVA, DMS ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las medias indican diferencia significativa entre las cepas.

Repetición	M2-7	M2-9	M2-11	GM-7	IB-7	IB-62	HD-1
1	302.71	251.82	169.78	322.97	184.93	172.99	257.44
2	187.06	235.51	263.55	331.35	250.92	201.11	275.24
3	238.17	249.09	341.55	182.65	98.76	68.10	229.76
Media	242.64a	245.47a	258.29a	278.99a	178.20a	147.40a	254.14a
Desv. estándar	57.95	8.73	86.00	83.53	76.3	70.1	22.91

Agradecimientos

Se agradece al CONACYT por la beca tesis otorgada

Literatura Citada

- Dulmage, H. T. Correa, J. A. and Martinez A. J. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr Pathol. 15: 15-20.
- Gallegos, M. G., Cepeda, S. M., Aranda., H. and Tejada, M. L., 2003. Evaluation of the action of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) on second instar larvae of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Agrociencia. 37:405-411.
- Olivares-Sáenz, E. 1994. Paquetes de diseños experimentales FAUANL (Programa computarizado) Version 2.5 Facultad de Agronomía Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, Nuevo León Mexico.
- 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.
- Shorey, H. H. and R.L. Hale, 1965. Mass rearing of larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium, Journal economist Entomology. 58:522-524. USA.
- United States Applied and Environmental Health. Pest Management Program 1989. Pest Resistance Data System. Probit Analysis and Probit Plot. Baltimore, Maryland USA.