

C-106-12

" ESTUDIOS SOBRE *Bacillus thuringiensis* PRESENTES EN LARVAS MUERTAS DE *Prays oleae* BERN. (*Lep. Hyponomeutidae*). AISLAMIENTO, PRUEBAS DE TOXICIDAD Y POSIBILIDADES DEL CONTROL MICROBIANO DE LA PLAGA "

FRANCISCA ROIG VIVES



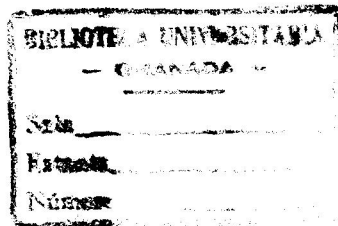
Biblioteca Universitaria de Granada



01533678

TESIS DOCTORALES DE LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA **61**

PROV. T. 7-33



3



A. 45. 111

FARMACIA

T  
13  
76

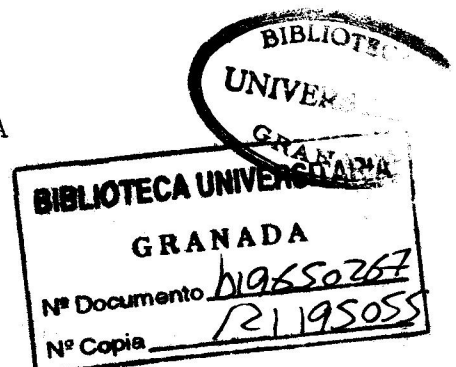
FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS SOBRE *Bacillus thuringiensis* PRESENTES EN LARVAS MUERTAS  
DE *Prays oleae* BERN. (Lep. Hyponomeutidae). AISLAMIENTO, PRUEBAS  
DE TOXICIDAD Y POSIBILIDADES DEL CONTROL MICROBIANO DE LA PLAGA.

FRANCISCA ROIG VIVES

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1974



Tesis Doctoral dirigida por el Dr. D. José Miguel Barea Navarro, Colaborador Científico del C.S. I.C. en la Estación Experimental del Zaidín.

Fué leída el día 14 de Diciembre de 1974, ante el Tribunal formado por los profesores: Montoya Gómez, Granada; Sañudo Palazuelos, Granada; Ramos Cormenzana, Granada; Macarulla Greoles, Granada; Oliveras Pascual, Granada.

Obtuvo la calificación de Sobresaliente *cum - laude*.

La Memoria que presentamos ha sido realizada en la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sección de Microbiología.

Su realización ha sido posible gracias a las becas que nos fueron concedidas por el Plan de Formación del Profesorado y Personal Investigador.

Esta Tesis Doctoral se inició bajo la dirección del Prof. Dr. - V. Callao Fabregat (q.e.p.d.); a su muerte, los Drs. Barea Navarro y - Ramos Clavero se hicieron cargo de la dirección de esta línea de estudio con parte correspondiente a Microbiología y parte a Fitopatología.

Los resultados aquí presentados corresponden a la parte de Microbiología, dirigidos por el Dr. Barea. La aplicación práctica de estos resultados, en ensayos de protección de plantas (concretamente - olivo), queda como línea de investigación a seguir, bajo la dirección del Dr. Ramos Clavero.

El director de esta Tesis dedica su participación en la realización de este trabajo a la memoria del Prof. Callao y agradece efusivamente al Dr. Ramos Clavero su colaboración en las labores de dirección.

Mi sincero agradecimiento:

Al Director de esta Tesis Doctoral, Dr. D. José Miguel Barea Navarro, Colaborador Científico del C.S.I.C. y al Dr. D. Pedro Ramos Clavero, Investigador Científico del C.S.I.C. por su colaboración en la dirección del trabajo.

Al Profesor D. Alberto Ramos, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia, padrino de esta Tesis, por su crítica constructiva a lo largo de la presente investigación.

A todos mis compañeros de la Sección de Microbiología, Fitopatología, de la Estación Experimental del Zaidín que en alguna forma han contribuido a que se lleve a cabo esta Tesis.

A las Srtas. Isabel López, M<sup>a</sup> Dolores Hernández y D. Juan Rodríguez, por su ayuda en técnicas de sus respectivas especialidades.

Asímismo, quiero agradecer al Prof. D. Luís Recalde Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidín, al Prof. D. Enrique Montoya, Jefe del Departamento de Microbiología y Bioquímica y al Prof. D. José Olivares, Jefe de la Sección de Microbiología del mencionado Centro, el habernos puesto a disposición el material e instalaciones necesarios para la realización de este estudio.

A la memoria del Prof. D. Vicente  
Callao Fabregat.

A mis padres.

## INDICE

	<u>Pág.</u>
OBJETO DEL TRABAJO. . . . .	7
INTRODUCCION . . . . .	10
Patología de insectos. Los microorganismos como agentes pa tógenos de insectos . . . . .	11
Posibilidades de control de insectos mediante microorganis mos . . . . .	12
Uso de las bacterias como insecticidas microbianos . . . . .	14
Clasificación de las bacterias entomógenas . . . . .	15
A. Bacterias entomopatógenas no esporuladas . . . . .	16
B. Bacterias patógenas esporuladas . . . . .	17
<i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .	20
Taxonomía del <i>B. thuringiensis</i> . . . . .	21
Materiales tóxicos producidos por bacilos cristalífe- ros . . . . .	23

	<u>Págs.</u>
Cristal proteína o $\delta$ -endotoxina . . . . .	23
$\beta$ -exotoxina . . . . .	26
Características de <i>Prays oleae</i> BERN. como plaga del olivar	29
Morfología . . . . .	30
Ciclo evolutivo y daños . . . . .	32
MATERIAL Y METODOS . . . . .	36
1. Aislamiento de <i>bacillus</i> en larvas muertas de <i>Prays oleae</i>	37
1.1. Toma de muestras y obtención de triturados de larvas muertas . . . . .	37
1.2. Aislamiento selectivo de <i>bacillus</i> . Técnica y medios de cultivo utilizados . . . . .	42
2. Identificación de bacterias esporuladas aisladas y selección de razas cristalíferas . . . . .	43
2.1. Pruebas bioquímicas de identificación hasta nivel de grupo <i>B. cereus</i> . . . . .	43
2.1.1. Crecimiento a 60°C, pH 6.0 . . . . .	45
2.1.2. Crecimiento en caldo glucosado y condiciones anaerobias . . . . .	45
2.1.3. Producción de lecitinasa . . . . .	45
2.2. Tinción específica de cuerpos parasporales . . . . .	46
3. Determinación mediante pruebas bioquímicas de los tipos de bacilos cristalíferos <i>B. thuringiensis</i> identificados	47
3.1. Producción de indol . . . . .	47
3.2. Prueba del Rojo de Metilo . . . . .	48
3.3. Producción de ureasa . . . . .	48
3.4. Utilización de citrato como única fuente de carbono . . . . .	48



	<u>Págs.</u>
3.5. Fermentación de azúcares . . . . .	48
3.6. Producción de Acetil-Metil-Carbinol . . . . .	49
3.7. Producción de lecitinasa . . . . .	49
3.8. Fermentación de salicina . . . . .	49
3.9. Producción de pigmento . . . . .	51
3.10. Fermentación de la sacarosa . . . . .	51
3.11. Hidrólisis del almidón . . . . .	51
3.12. Producción de velo . . . . .	51
4. Estudio sobre producción de $\beta$ -exotoxina por las razas - de <i>B. thuringiensis</i> aisladas . . . . .	52
4.1. Utilización de un microorganismo sensible a la $\beta$ - -exotoxina . . . . .	52
4.1.1. Obtención de cultivos de <i>B. thuringiensis</i> - para la investigación de la $\beta$ -exotoxina . . . . .	53
4.1.2. Bioensayo propiamente dicho . . . . .	54
4.1.3. Selección de las razas cristalíferas más - activas . . . . .	56
4.2. Estudio de la sensibilidad de otros microorganismos diferentes de " <i>Sarcina flava</i> ", a la $\beta$ -exotoxina, empleando las razas cristalíferas más activas. . . . .	57
5. Pruebas de toxicidad en insectario sobre larvas de <i>Prays oleae</i> de los bacilos cristalíferos tipados . . . . .	58
5.1. Obtención de cultivos de <i>B. thuringiensis</i> . . . . .	58
5.1.1. Obtención de cultivos de <i>B. thuringiensis</i> - con máxima cosecha de esporas y cuerpos pa- rasporales . . . . .	58
5.1.2. Obtención de cultivos con máxima cosecha de células vegetativas . . . . .	60

	<u>Págs.</u>
5.2. Descripción de la técnica seguida para la preparación de las larvas y acondicionamiento del insectario . . . . .	61
RESULTADOS . . . . .	63
1. Aislamiento de <i>Bacillus</i> en larvas muertas de <i>Prays oleae</i>	63
2. Identificación de <i>Bacillus</i> del grupo I aislados y selección de razas cristalíferas . . . . .	65
3. Determinación de los tipos de <i>Bacillus</i> cristalíferos - ( <i>B. thuringiensis</i> ) identificados . . . . .	69
4. Estudio sobre producción de $\beta$ -exotoxina por las razas - de <i>B. thuringiensis</i> aisladas . . . . .	73
5. Pruebas de toxicidad en insectario sobre larvas de <i>Prays oleae</i> BERN. de los <i>Bacillus</i> cristalíferos tipados . . .	79
DISCUSION . . . . .	90
CONCLUSIONES . . . . .	106
BIBLIOGRAFIA . . . . .	111

OBJETO DEL TRABAJO

## OBJETO DEL TRABAJO

En la Cuenca mediterránea en general y en la región andaluza - en particular, especialmente en las provincias de Granada, Jaén, Córdoba y Sevilla, los daños anuales causados por la "polilla" del olivo, - *Prays oleae* BERN. (Lep. Hyponomeutidae) a la producción oleícola, suelen ser bastante elevados. Estos daños son aún mayores que los causados por la mosca del olivo (*Dacus oleae* GM.) en la mayoría de los años, siendo además sus ataques más frecuentes en el tiempo que los del *Díptero*.

Según las observaciones llevadas a cabo por la Estación Experimental del Zaidín (Granada) en esta provincia, la caída de fruto en 1969 alcanzó un 58,8% del total existente, debiéndose achacar un 45% sólo y exclusivamente al ataque del *Lepidóptero*; los daños de 1970, supusieron la caída del 86,6% del total de las aceitunas (59,8% atribuí-

bles a *Prays oleae*), mientras que en 1971 la caída total del fruto observada, fué del 54% (40,5% debida a *Prays oleae*). En 1972, la caída del fruto fué afortunadamente de sólo un 10% del total. En 1973, vuelve a ser elevada, 89,3%, adjudicándosele al efecto de *Prays oleae* un 76,8%. En 1974, fué de un 90% la caída de la aceituna y el 70% se calculó ser debido al *Lepidóptero*.

En la Estación Experimental del Zaidín (Granada), desde hace algunos años, se realizan diversos estudios en colaboración con la O. I.L.B. (Organization International de Lutte Biologique) sobre *Prays oleae*, referidos especialmente al ciclo biológico, dinámica de población, factores limitantes, parasitismo, control (es decir, lucha directa con insecticidas) de la plaga y finalmente las posibilidades reales de la lucha biológica, mediante el estudio e identificación de los parásitos y depredadores que existan en la zona.

Para completar dichos estudios generales del insecto, se consideró importante el conocimiento de la flora microbiana de las larvas, especialmente la posible presencia de *Bacillus* cristalíferos -tóxicos para *Lepidópteros*- en larvas muertas, así como la consiguiente investigación para decidir la implantación futura de la lucha biológica usando microorganismos. Ello entraría dentro de las más modernas directrices internacionales (preconizadas por la FAO y O.I.L.B.), en lo que se ha decidido llamar "Lucha integrada" de grandes posibilidades en el control de plagas agrícolas.

Por ello, se decidió iniciar un estudio de la flora microbiana de las larvas del insecto en sus tres generaciones anuales, filófaga, antófaga y carpófaga, con objeto, en principio, de comprobar si dichos agentes microbianos tienen importancia directa o indirecta en algunos fenómenos de simbiosis o antagonismo con su organismo huésped.

Sin embargo, en los primeros aislamientos realizados a partir de larvas muertas del insecto, se encontraron *Bacillus* formadores de -

cuerpos parasporales, encuadrados en el grupo de *B. thuringiensis* - (Roig et al., 1973), posible causa de la mortalidad de las larvas. El OBJETO del presente trabajo se centró entonces en un estudio sobre este grupo de *Bacillus*.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el OBJETO del estudio que se propone realizar se puede esquematizar en los siguientes puntos:

1. Aislar *B. thuringiensis* en larvas muertas de *Prays oleae* e identificar los tipos aislados.
2. Determinar si con los tipos seleccionados se puede inducir la enfermedad en larvas vivas de *Prays oleae*.
3. Reaislar el mismo organismo a partir de las inoculaciones experimentales.

En otras palabras, comprobar si se cumplen los cuatro postulados de Kock en las relaciones: *B. thuringiensis* - *Prays oleae*. Ello abriría un gran campo de posibilidades en el control biológico de esta plaga del olivar.

INTRODUCCION

## INTRODUCCION

### Patología de insectos. Los microorganismos como agentes patógenos de insectos.

Desde sus primeros tiempos el hombre ha tenido conocimientos, - al menos empíricos, de que los insectos sufren enfermedades. Este conocimiento se ha ido desarrollando cada vez con mayor rapidez hasta constituirse una ciencia dentro de la Biología que se ocupa de la patología de los insectos. La enfermedad o ruptura del estado de salud del insecto se observó primeramente en los beneficiosos; concretamente, Aristóteles mencionó que las abejas sufrían enfermedades. Sin embargo, aplicando ya criterios científicos, Agostino Bassi mostró, a mediados del siglo pasado, que la enfermedad animal podía ser causada por un microorganismo pues observó que un hongo provocaba un estado patológico al gusano de seda. Las primeras investigaciones se limitaron a dos insectos domésticos: la abeja y el gusano de seda; sin embargo, gradualmente esos estudios se extendieron a otras especies de insectos causantes



de plagas. De esta manera, fué como nació la idea de utilizar las enfermedades producidas por microorganismos, para el control de insectos patógenos.

#### Posibilidades de control de insectos mediante microorganismos.

En términos generales se puede decir, que el principal papel de la lucha biológica aplicada contra insectos consiste en la regulación del nivel de población de la especie peligrosa por debajo del requerido para que los daños ocasionados tengan importancia económica. Dentro de la lucha biológica y como agentes naturales de control, los microorganismos son a veces de vital importancia en la regulación de poblaciones de insectos. Entre los microorganismos estudiados y que pueden ser eficaces en el control de las plagas, se incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos.

Los microorganismos para poder ser usados como agentes de control, deben ser efectivos, en condiciones naturales, frente a los numerosos productores de plagas, y operar igualmente en las circunstancias artificiales creadas por el hombre. Se han utilizado dos tipos de preparaciones: "*Insecticidas microbianos*" e "*Introducciones*". Los *insecticidas microbianos*, se aplican en un momento dado. Normalmente, se utilizan microorganismos incapaces de propagarse y persistir que se emplean regularmente y de forma masiva. Las *introducciones*, en cambio, quedan adaptadas permanentemente y son capaces de establecerse y persistir en nuevos ambientes; por ello, se utilizan cantidades relativamente pequeñas de inóculo.

Los microorganismos para ser usados en el control de plagas deben reunir las condiciones que, resumidas del trabajo de Burges y Hussey (1971), son las siguientes:

1. Deben tener virulencia suficiente para que causen una enfermedad

e inhiban la actividad de una plaga inducida por insectos. Las variaciones de la virulencia, cuando ocurran, no deberán ser tan grandes como para afectar una dosis recomendada o requerir ensayos frecuentes de su potencial patógeno.

2. El microorganismo patógeno no deberá ser sensible a los cambios del medio ambiente al que va a ser expuesto, tales como desecación, luz solar, temperatura ... etc., ni al método mediante el cual vaya a ser aplicado (pulverización, espolvoreo, ...) ni al vehículo de suspensión usado (aceite, agua, emulsionantes, ...).
3. El microorganismo deberá ser persistente y permanecer viable e infeccioso, hasta que tenga acceso al insecto.
4. El patógeno ha de ser específico para la plaga del insecto contra la que va a actuar, inactivo frente a la planta huésped que sufre la plaga y favorecer la acción de parásitos y depredadores.
5. Es de extrema importancia que el patógeno sea inócuo bajo las condiciones de uso para vertebrados, especialmente mamíferos.
6. Finalmente, debe ser posible la producción del referido microorganismo en cantidad y a un costo económico bajo, y en forma que sea a la vez práctica y satisfactoria.

Desgraciadamente, ningún microorganismo reúne todas estas condiciones pero, sin embargo, muchos de ellos tienen una combinación de propiedades que los hacen aconsejables para ser usados en el control de plagas.

Antes de la Segunda Guerra Mundial, los esfuerzos se centraron más en la aplicación de los microorganismos como *introducción*, pero posteriormente, la atención de los investigadores cambió hacia el uso de *insecticidas microbianos*. Ello se debió posiblemente a que los microorganismos aplicados como *introducciones*, eran afectados considerablemente por los pesticidas químicos. Sin embargo, los *insecticidas micro*

*bianos* tienen muchos caracteres en común con los químicos, por lo que se dedicó más énfasis a su estudio. Ahora se tiende al empleo de ambas formas de aplicación, dependiendo el uso de una u otra forma de las características biológicas y técnicas del problema concreto a resolver. No obstante, teniendo en cuenta que una bacteria: *B. thuringiensis* ha atraído casi exclusivamente el interés de la manufacturación comercial de preparados a base de dicha bacteria como *insecticidas microbianos*, no es de extrañar que dicha forma de aplicación haya sido la más extendida.

De cualquier forma, el valor de los agentes microbianos normalmente utilizados contra plagas depende en gran parte de si son o no afectados por los insecticidas químicos, lo cual es de enorme importancia en los programas de lucha integrada.

Hoy día, el uso de microorganismos patógenos y/o sus productos, se considera una importante medida de control biológico (Steinhaus, 1949; Hall, 1963 y 1964 y Tanada, 1967). Para un control biológico eficaz, es necesario un conocimiento ecológico y de la dinámica de población de la plaga, así como de la fisiología de los microorganismos, su modo de acción y posibilidades de producción por métodos industriales en gran escala. Como se ha indicado, las bacterias patógenas de insectos y sus toxinas no han de ser perjudiciales para las plantas, insectos beneficiosos o animales superiores, por eso son necesarias investigaciones completas de la toxicidad. Sólo una estrecha colaboración entre entomólogos, microbiólogos, químicos y toxicólogos puede dar lugar a la obtención de insecticidas microbianos eficaces y económicos.

#### Uso de las bacterias como insecticidas microbianos.

Ya se ha indicado que a mediados del siglo pasado, Agostino Bassi fué el primero que propuso el empleo de microorganismos para el

control de plagas de insectos. Más tarde, a finales de siglo, Pasteur observó la presencia de bacterias en gusanos de seda enfermos y desde entonces, han sido descritas alrededor de 90 especies o variedades de bacterias patógenas de insectos, como se deduce del trabajo de revisión de Falcon (1971) en el cual cita que entre 1963 y 1969, aparecieron 33 obras de revisión sobre bacterias patógenas de insectos.

#### Clasificación de las bacterias entomógenas.

Bucher (1960), propuso una clasificación en la cual estas bacterias fueron agrupadas según sus propiedades en relación a su patogenicidad, tales como dosis infectiva, hiesped específico y modo de acción. Dicho autor propuso la clasificación siguiente:

- a) Patógenos obligados: definidos como aquéllos asociados con un insecto específico enfermo. Tienen pocos tipos de hiesped, son fácilmente transmitidos, requieren condiciones de cultivo especiales y se multiplican probablemente sólo dentro de sus huéspedes específicos.
- b) Patógenos facultativos: son un grupo de bacterias que poseen algún mecanismo para perjudicar o invadir un tejido susceptible - pero no son parásitos obligados. Crecen espontáneamente en medios de cultivo artificiales y son capaces de multiplicarse en el intestino del insecto hiesped antes de la invasión del hemocele.
- c) Patógenos potenciales: son aquéllos que normalmente no se multiplican en el intestino de los insectos pero pueden hacerlo en el hemocele una vez que tengan acceso a él; se cultivan fácilmente en medios artificiales y no están asociados ni a enfermedades ni a insectos específicos.

Aplicando este criterio, hay muchas especies bacterianas que

pueden ser clasificadas como patógenas de insectos, pero es bien cierto que sólo unas pocas tienen posibilidades para poder ser utilizadas como *insecticidas microbianos*.

La mayor parte de las bacterias patógenas de insectos, se han encontrado en las familias *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* y *Pseudomonadaceae*.

Para su estudio, se pueden dividir en dos grandes grupos: no esporuladas y esporuladas.

#### A) Bacterias entomopatógenas no esporuladas.

Constituyen un grupo heterogéneo en el que se pueden señalar como representativos a *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*.

*Ps. aeruginosa*, ha sido clasificado según Bucher, como patógeno potencial, es decir que puede multiplicarse en el hemocele una vez haya tenido acceso a él. Se ha comprobado su patogeneidad para los *Ortópteros*, *Melanoplus bivittatus* SAY y *Camnula pellucida* SCUDDER. *Serratia marcescens*, está incluido según la clasificación de Bucher en el grupo de patógenos facultativos.

El uso de estos microorganismos como insecticidas encuentra algunas dificultades como son la gran sensibilidad a la desecación y luz solar y una tendencia marcada a perder su virulencia. Además, los géneros *Pseudomonas* y *Serratia*, tienen el inconveniente de incluir especies que muestran algún grado de patogeneidad para mamíferos.

Otros microorganismos no esporulados pertenecientes a los géneros *Aerobacter*, *Streptococcus* y *Achromobacter*, han sido aislados de larvas muertas de *Ostrinia nubilalis* HUBN., *Scotia ipsilon* HUFN. y *Heliothis zea* F.

Las bacterias de este grupo, tienen un extenso número de hués-

pedes en los órdenes Coleópteros, Dípteros, Himenópteros, Isopteros, Lepidópteros y Ortópteros.

#### B) Bacterias patógenas esporuladas.

Especies de la familia *Bacillaceae* son consideradas las de mayor interés para su uso como insecticidas microbianos, habiendo sido utilizadas bacterias del género *Clostridium* y principalmente *Bacillus*.

##### Género *Clostridium*.

En 1957, Bucher aisló dos bacterias anaerobias estrictas, de larvas enfermas de *Malacosoma pluviale* D. y las llamó *Cl. brevifaciens* y *Cl. malacosomae*; cuando estas larvas se alimentan de esporas de *Cl. brevifaciens*, en su intestino tiene lugar la esporulación y abundante reproducción del microorganismo; a las 72 horas, las larvas presentan unas características de arrugamiento y aplastamiento a las que sigue la muerte. *Cl. malacosomae* produce síntomas semejantes en dichas larvas. En relación con estos microorganismos, Bucher demostró que es posible inducir una enfermedad bajo condiciones de campo por introducción de esporas de *Cl. brevifaciens* o *Cl. malacosomae*; pero sin embargo el hecho de que estas bacterias no esporulen en medios artificiales, limita la producción de esporas a escala comercial (Bucher, 1961); la solución de estas dificultades puede representar nuevas oportunidades para la explotación de este grupo de microorganismos como *insecticidas microbianos*.

##### Género *Bacillus*.

Han sido ensayadas como insecticidas microbianos varias bacterias aerobias esporuladas, entre ellas, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, etc. (Angus, 1965).

*B. popilliae* causa la enfermedad blanda tipo A, en las larvas

del *Coleoptero Popillia japonica* NEW. y ha sido usado con éxito como agente de control biológico; así mismo, *B. cereus* ha sido aislado de larvas enfermas y muertas de numerosos insectos.

Algunos de estos microorganismos son patógenos potenciales y otros patógenos facultativos; la mayoría de ellos actúan por ingestión y se han encontrado huéspedes susceptibles en varios órdenes de insectos. Stephens (1952) aisló varias de estas especies de larvas enfermas de la polilla de la pescadilla; Heimpel (1954) también encontró variedades de *B. cereus*, en larvas enfermas de la procesionaria del pino y Smirnoff (1963a) aisló una variedad patógena para la oruga de la yema del abeto (*Choristoneura fumiferana* CLEM). Estas variedades de *B. cereus*, han sido ensayadas en pequeña escala bajo condiciones de campo, observándose que causan alguna mortalidad pero ésta no es lo suficientemente elevada para continuar estudiando su utilización.

No cabe duda que el mayor número de trabajos se ha dirigido al estudio de las llamadas bacterias cristalíferas, ya que poseen la mayor parte de las características de *B. cereus* y además producen un cuerpo parasporal proteínico o cristal en el momento de la esporulación, el cual contiene una endotoxina capaz de producir parálisis en el intestino de muchas larvas de *Lepidópteros*.

Este grupo está representado por *B. thuringiensis* y variedades, grupo que está estrechamente relacionado con el grupo *Cereus* ya que es semejante en la mayor parte de sus características bioquímicas, morfológicas y metabólicas (Heimpel y Angus, 1958). Sin embargo, y dado el gran interés que posee el estudio de este tipo de bacterias formadoras de cristales, se ha considerado oportuno su estudio en un capítulo aparte, máxime cuando *B. thuringiensis* es la clave de la investigación apuntada como objeto del presente trabajo.

Como se indicó anteriormente al hablar de *insecticidas microbianos* en términos generales, la efectividad de las bacterias entomo-

patógenas empleadas en el control microbiano de insectos, está influenciada por varios factores, particularizando en *B. thuringiensis* que se pueden sintetizar en:

1.- Selección de la especie o variedad de la bacteria, ya que en el caso concreto de *B. thuringiensis* existen grandes diferencias entre el uso de los distintos tipos de preparaciones comerciales.

2.- Efecto de la luz solar y temperatura. Cuando se aplica una bacteria como insecticida, se hace en forma de suspensión sobre la planta, y hasta que es ingerida por el huésped susceptible, está sometida a todos los factores físicos del medio ambiente. Cantwell y Franklin (1966) observaron que las esporas de *B. thuringiensis* expuestas a la luz ultravioleta en el laboratorio, se inactivaban rápidamente; sin embargo, este efecto era más lento por exposición a la luz natural.

La temperatura es otro factor limitante que actúa no solamente sobre la espora, sino también sobre el insecto y su desarrollo. Herfs (1965) demostró que la temperatura óptima para la aplicación en el campo de *B. thuringiensis*, es de 18-20°C.

3.- Presencia de Fitocidas. Kushner y Harvey (1962) demostraron la existencia de unas sustancias en extractos foliares que protegen a los insectos de las enfermedades bacterianas. Morris (1969), comprobó que la acidez elevada de ciertos extractos foliares podía neutralizar la alcalinidad del intestino de los *Lepidópteros* y, por lo tanto, los cristales tóxicos de *B. thuringiensis* no podrían disolverse; incluso si se disolviesen, el crecimiento bacteriano en el intestino podría ser inhibido.



### Bacillus thuringiensis.

En 1911 en Thuringia (Alemania), Ernest Berliner aisló una bacteria esporulada aerobia a partir de larvas enfermas de la polilla de la harina, *Ephestia kuehniella* Z., y le dió el nombre de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915). De acuerdo con el trabajo de Rogoff (1966), en 1902 se había aislado en Japón un organismo similar al de Berliner, en gusanos de seda moribundos; este bacilo fué llamado *B. sotto*. Posteriormente se observó que sólo los cultivos viejos y esporulados de *B. sotto* causaban la enfermedad en gusanos de seda por ingestión, mientras que los cultivos en forma vegetativa eran inactivos. Otro hecho curioso fué la extrema rapidez con que aparecían los síntomas de la enfermedad ya que a menudo las larvas empezaban a paralizarse después de una hora de la ingestión de cultivos esporulados de *B. sotto*, por lo que sugirió que estos síntomas representaban la expresión de la acción de una toxina.

En su descubrimiento inicial, Berliner observó que las células esporuladas de los cultivos de *B. thuringiensis* contenían no sólo la espora, sino también una inclusión irregular romboide que él llamó "Restkörper".

Estas observaciones, fueron olvidadas hasta que Steinhaus (1951) realizó unas experiencias en campo, para el control del *Colias philocide* BOISD, plaga de la alfalfa, mediante esporas de *B. thuringiensis*. Por otro lado, un investigador canadiense, Hanray (1953) resucitó la idea del "Restkörper" de Berliner, observando que las esporas en *B. thuringiensis*, estaban invariablemente acompañadas de unos cuerpos romboidales. Sugirió que estas inclusiones cristalinas podían estar asociadas con la patogeneidad de dichas bacterias para los insectos, lo cual fué confirmado por Angus (1954). Este último autor, después de una serie de estudios, llegó a la conclusión de que el principio tóxico asociado con las inclusiones cristalinas de los bacilos no era una

exotoxina típica sino que requería su solubilización para ser activa, y que ésto se podía lograr por tratamiento de los cristales con alcalis diluidos o jugos intestinales de los insectos.

Hannay y Fitz-James (1955) demostraron que el cristal era de naturaleza proteica. Posteriormente el cristal ha sido estudiado perfectamente y producido en grandes cantidades para el control de las plagas de *Lepidópteros*.

Algunos años después, McConnell y Richards (1959) detectaron en los cultivos de *B. thuringiensis* una sustancia termolabile soluble en agua y dializable, tóxica para las larvas de *Galleria mellonella* L. por inyección; esta toxina era producida por la bacteria durante la fase activa de crecimiento, antes de la formación de esporas e inclusiones parasporales.

#### Taxonomía de *B. thuringiensis*.

Los primeros intentos para clasificar las distintas especies de bacilos cristalíferos fueron realizados por Heimpel y Angus (1958), Toumanoff y Le Coroller (1959) y Krieg (1961). Todas estas clasificaciones estaban basadas en reacciones bioquímicas, las cuales no correspondían a la clasificación que posteriormente establecieron Norris y Burges (1965).

Sin embargo, De Barjac y Bonnefoi (1962) establecen nuevos criterios taxonómicos basados en reacciones bioquímicas y serológicas. Dichos autores demostraron que el grupo *B. thuringiensis* tiene un antígeno flagelar específico y que la reacción de aglutinación por este antígeno conducía a diferentes grupos serológicos. La conclusión de este trabajo es que existe una correspondencia entre las pruebas bioquímicas y serológicas. Actualmente el grupo *B. thuringiensis* ha sido dividido en doce serotipos diferentes, algunos de los cuales han sido divididos en subgrupos, basados en la existencia de un factor antigénico

común y otro diferente (Carlberg, 1973).

Otro criterio taxonómico fué introducido anteriormente por Norris (1964). Este autor estudió los tipos de esterasa de bacterias formadoras de cristales obtenidas de diversas fuentes y encontró una estrecha correlación entre la clasificación serológica con la ventaja de que el análisis de esterasa podía ser realizado en 20 horas, mientras que la identificación bioquímica requería aproximadamente dos semanas y la serológica algunos días.

De acuerdo con De Barjac y Bonnefoi (1968) su clave para la clasificación de las especies de *B. thuringiensis* podría ser modificada en el futuro con nuevos métodos como el análisis de la composición de bases de ADN e hibridación de ADN que podrían revelar interrelaciones entre las variedades de *B. thuringiensis* y posiblemente reducirían el número de ellas.

Independientemente de estos aspectos sobre taxonomía, hay otras circunstancias sobre la clasificación de *Bacillus thuringiensis* que merecen ser citadas brevemente. Existen referencias bibliográficas contradictorias en el sentido de considerar o no a *B. thuringiensis* como una especie distinta de *B. cereus* (Carlberg, 1973). El Manual de Bergey (Breed et al., 1957) considera a *B. thuringiensis* con categoría de especie y Ramos-Cormenzana (1974) en su trabajo sobre taxonomía bacteriana, basado en los criterios taxonómicos que utilizará la 8ª edición del Manual de Bergey, próxima a aparecer, considera a *B. thuringiensis* como subespecie de *B. cereus*. Quizás la citada 8ª edición del Manual de Bergey se decida definitivamente sobre estas cuestiones.

### Materiales tóxicos producidos por bacilos cristalíferos.

Las toxinas producidas por *B. thuringiensis* han sido ampliamente estudiadas y descritas en los últimos años. Se han encontrado cuatro grupos de toxinas:  $\alpha$ -exotoxina termolabil (Toumanoff, 1953; Heimpel, 1961; Krieg, 1971) la  $\gamma$ -exotoxina termolabil (Smirnoff y Berlínquet, 1966) y aparte las ya citadas  $\delta$ -endotoxina ó cristal-proteína y la  $\beta$ -exotoxina termostable. Recientemente ha sido descrita la producción de hemolisinas por *B. thuringiensis* (Pendleton et al., 1973).

De estos productos tóxicos sólo han sido estudiados con detalle y probado su toxicidad experimentalmente la  $\delta$ -endotoxina y la  $\beta$ -exotoxina por lo cual se les va a dedicar una especial atención en las páginas siguientes. Sobre estas dos toxinas se han realizado exhaustivas revisiones bibliográficas (Rogoff, 1966; Heimpel, 1967; Norris, 1971; Cooksey, 1971; Bond et al., 1971); en ellas se describe la biosíntesis, características fisicoquímicas, bioquímica y modo de acción de  $\beta$ -exotoxina y  $\delta$ -endotoxina. A estas obras se remite al lector interesado en profundizar sobre el tema que, seguidamente, va a ser resumido en sus aspectos más destacados.

### Cristal-Proteína o $\delta$ -endotoxina.

Los primeros estudios al microscopio electrónico llevados a cabo por Hannay y Fitz-James (1955) sobre la inclusión proteínica de *B. thuringiensis* pusieron de manifiesto que era un cristal bipiramidal regular con la superficie surcada por estrias paralelas a la base plana; según Holmes y Monro (1965), que usaron métodos de difracción de rayos X, demostraron que el cristal, está formado por unidades tetragonales cada una de las cuales contiene ocho subunidades asimétricas.

Los cristales son de naturaleza proteica, según Hannay y Fitz-James (1955) no contienen ácidos nucleicos y de acuerdo con Holmes y

Monro (1965), tienen un 0,5% de hidratos de carbono. La constitución elemental ha sido establecida recientemente por Faust et al. (1973), mediante análisis espectrográfico. Los cristales se forman dentro de la célula vegetativa en una determinada fase del proceso de esporulación. Monro, 1965, ha demostrado, usando isótopos, que los cristales se forman a partir de aminoácidos derivados de la ruptura de las proteínas de la célula vegetativa, y que sus antígenos son diferentes de los de la célula vegetativa, apareciendo simultáneamente con el cristal.

El sincronismo en la síntesis del cristal y de la espora puede ser alterado por las condiciones del cultivo. Así Smirnof (1963b) demostró que el cultivo incubado a baja temperatura inhibe la esporulación sin afectar a la formación del cristal; también la adición de urea y extractos foliares de varias especies de plantas al medio de cultivo, inhibe la síntesis del cristal (Smirnof, 1963c, 1965). Los rayos ultravioleta, inactivan las esporas de *B. thuringiensis* (Cantwell y Franklin, 1966), pero la toxicidad de los cristales no se altera después de 120 minutos de exposición a dichas radiaciones (Cantwell, 1967). En las condiciones normales, la formación del cristal es constante ya que algunas especies han sido cultivadas durante 50 años en medios artificiales y no han perdido la capacidad de formación del cristal.

Los cristales son insolubles en agua, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y disolventes orgánicos usuales, sin embargo se disuelven en soluciones alcalinas y en el jugo intestinal (alcalino) de las larvas de *Lepidópteros* susceptibles (Hannay, 1953, Angus 1956 a, b).

Muchas larvas de *Lepidópteros* son susceptibles a algunas especies de *B. thuringiensis*, pero entre los serotipos e incluso dentro del mismo serotipo, hay una variación considerable de la toxicidad para las especies huéspedes. No hay una relación constante entre las es

pecies bacterianas y la relación sistemática de insectos (Carlberg - 1973), por ello para el uso práctico de *B. thuringiensis* como insecticida microbiano, es necesario definir su espectro específico ó la susceptibilidad de los insectos huéspedes.

El modo de acción del cristal-proteína ha sido muy bien estudiado. Heimpel y Angus (1959) observaron por rayos X, la marcha seguida por una mezcla de  $SO_4Ba$  y cristales de *B. thuringiensis* que habían sido administrados por ingestión a larvas de *Lepidópteros* susceptibles. El primer síntoma de acción de la  $\delta$ -endotoxina es el cese en la alimentación de las larvas de *Lepidópteros*; posteriormente ocurre una parálisis intestinal y las larvas mueren entre los 2 y 4 días, sin parálisis externa aparente, siendo el hambre y la septicemia los causantes de la muerte. Angus (1968) mostró que el efecto de la toxina del cristal es semejante a la valinomicina, un antibiótico que afecta la permeabilidad de las finas membranas lipídicas. Posteriormente (Lüthy, 1973) propone la autodigestión del epitelio intestinal de las larvas como posible explicación del mecanismo de acción de la endotoxina. - Sin embargo, la sintomatología y mecanismo de acción del cristal de *B. thuringiensis* sigue en litigio en algunos de sus puntos de actuación (Smirnoff, 1974).

Heimpel y Angus (1958) demostraron que el cristal-proteína tenía que estar disuelto para ejercer su acción y de hecho, la mayor - parte de los huéspedes susceptibles tienen un elevado pH en el intestino; esto les llevó a pensar que el cristal sería una protoxina, siendo la verdadera fracción tóxica una subunidad de la proteína total. - En efecto, ha sido demostrado que la disolución inicial del cristal, - para dar lugar a la protoxina, es llevada a cabo por componentes no - enzimáticos del jugo intestinal; posteriormente, los enzimas proteolíticos dan lugar a la verdadera toxina, una fracción peptídica con un peso molecular entre 500 y 10000 (Fast y Angus, 1970).

Las características definitivas del proceso de disolución han

sido establecidas recientemente por Fast y Videnova (1974), pero previamente Pendleton (1973) había caracterizado de una manera concluyente la protoxina y una toxina activada de *B. thuringiensis* var. *entomocidus*.

### $\beta$ -exotoxina.

Los trabajos realizados por varios investigadores con el fin de estudiar el modo de acción del cristal-proteína de *B. thuringiensis*, condujeron al descubrimiento de otros materiales tóxicos en cultivos líquidos que fueron llamados exotoxinas solubles en agua.

La  $\beta$ -exotoxina, es uno de dichos materiales, que se caracteriza por su termostabilidad. La producción de la  $\beta$ -exotoxina es independiente de la formación de la espora y del cristal porque ciertos mutantes de serotipos no cristalíferos ni esporulados, producen igualmente dicha sustancia.

La actividad de la  $\beta$ -exotoxina, no es afectada por la temperatura del autoclave (120°C, 15mn) lo cual no sucede con la proteína-cristal; además los huéspedes susceptibles no son los mismos ni los síntomas producidos.

La purificación de la  $\beta$ -exotoxina fué realizada en primer lugar por De Barjac y Dedonder (1965) que aislaron un nucleótido, el cual por hidrólisis liberaba adenina, ribosa y restos de fosfato.

El método de purificación seguido por estos investigadores consta de tres partes:

1. Precipitación con sales de mercurio.
2. Absorción con carbón vegetal y separación por cromatografía usando como eluyente solución de etanol al 50 % (De Barjac y Dedonder, 1965). y solución de etanol amoniacal (De Barjac y Dedonder, 1968). Otros investigadores han seguido el mismo proceso -

(Carlberg, 1973), variando las sales usadas en la precipitación y el eluyente en la cromatografía.

Benz (1966) describe un proceso de purificación distinto: Se para por centrifugación, las células del cultivo y el sobrenadante lo concentra a la décima parte de su volumen. Por adición del alcohol a una concentración final del 90% precipita la fracción tóxica, disuelve el precipitado en agua y lo purifica por cromatografía o columnas de fraccionamiento.

Empleando distintos métodos de purificación y variedades distintas de *B. thuringiensis*, las propiedades físicas y químicas de las toxinas aisladas, son coincidentes (Bond et al., 1971). El espectro de absorción al ultravioleta de la  $\beta$ -exotoxina presenta un máximo de absorción a 258-260 nm y un mínimo a 230-240 nm (De Barjac y Dedonder, 1965; Benz, 1966). El peso molecular está comprendido entre 707 y 795 según los estudios de De Barjac y Dedonder (1968).

Sebesta et al. (1967) demostraron que la toxina puede ser hidrolizada con ácidos pero es resistente a los alcalis, lo cual está de acuerdo con su naturaleza de nucleotido.

La determinación de la producción cuantitativa de dicha sustancia ha sido realizada mediante bioensayos utilizando gran número de huéspedes susceptibles (Carlberg, 1973).

El modo de acción de la  $\beta$ -exotoxina ha sido ampliamente estudiado por numerosos autores (ver revisión de Burges y Hussey, 1971) - los cuales han demostrado que la  $\beta$ -exotoxina inhibe la síntesis de ARN-polimerasa, dependiente de ADN en los organismos susceptibles. Sin embargo, posteriormente Kim et al. (1972) demostraron que la  $\beta$ -exotoxina también inhibía la síntesis de ADN en larvas de insectos "in vivo"; aunque utilizando líneas celulares "in vitro" no se apreciaba inhibición de la síntesis de ADN.



En un estudio preliminar sobre la toxicidad de  $\beta$ -exotoxina para las células de animales superiores, Thelestam (1972) utilizó fibroblastos de pulmón de embrión humano. Encontró que la exotoxina, purificada por extracción con etanol, carecía de efecto citotóxico, pero empleando el medio de crecimiento libre de células de *B. thuringiensis* serotipo 1 (tipo Berliner de De Barjac y Bonnefoi, 1962), se inhibía la síntesis de ADN. Ello conduce a pensar que la exotoxina purificada no representa toda la sustancia termostable del medio de cultivo.

En virtud de los posibles efectos citotóxicos para animales superiores, Carlberg (1973) investiga tal circunstancia, en los distintos tipos de *B. thuringiensis*, frente *Sarcina flava*, larvas de mosca doméstica, ratón y células humanas, así como pruebas alérgicas en cobaya.

Las conclusiones generales a las que llega dicho autor son las siguientes: sólo algunos tipos de *B. thuringiensis* producen  $\beta$ -exotoxina. Tanto las larvas de mosca doméstica como *Sarcina flava* son sensibles a la acción de la toxina termostable. Los ensayos de toxicidad y alergia de *B. thuringiensis* indican, que las preparaciones comerciales de serotipos productores de exotoxina pueden ser utilizados sin que produzcan síntomas de alergia dérmica ni toxicidad en animales de sangre caliente.

Sin embargo, el medio de cultivo de los tipos de *B. thuringiensis* fuertes productores de exotoxina inhibía la síntesis de ADN en células humanas. Aunque la concentración que emplea Carlberg (1973) está muy por encima de la utilizada en la práctica, es necesario considerar, dice el autor, la posibilidad de ciertos efectos mutagénicos. La exotoxina purificada no demostró acción sobre la síntesis de ADN en células humanas.

No obstante, el mecanismo de acción exacto de la toxina termos

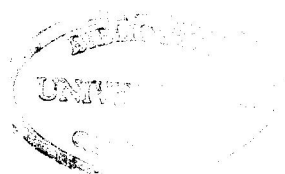


table sobre larvas de insectos no está definitivamente dilucidado -  
(Carlberg, 1973).

La aplicación práctica del *B. thuringiensis* ha sido exhaustivamente tratada en varias revisiones como las de Angus (1965), Rogoff (1966), Heimpel (1967) y Burges y Hussey (1971). En dichos trabajos se cita que han sido empleadas diversas preparaciones comerciales contra plagas producidas por gran número de insectos. Sin embargo, una importante plaga de la región mediterránea no ha sido investigada en ninguno de los trabajos antes mencionados y a ellas se dirige el presente estudio. Este estudio se refiere a una plaga del olivo cuyo agente causal es el *Prays oleae* BERN., lepidóptero conocido como "la polilla del olivo". De la aplicación del *B. thuringiensis* como insecticida microbiano contra esta plaga, sólo tenemos conocimiento de los trabajos de Yamvrias en Grecia, que se citan posteriormente, pues previamente se van a describir las características y ciclo evolutivo de *Prays oleae* BERN., lo cual será de gran utilidad para conocer los puntos propicios para su control mediante bacterias cristalíferas.

#### Características de *Prays oleae* BERN. como plaga del olivar.

*Prays oleae* BERN. (Lepidóptero Hyponomeutidae) constituye una de las plagas más importantes del olivo, cuyo interés económico es de gran trascendencia. Actualmente el insecto está extendido por toda el área del cultivo del olivo en la cuenca mediterránea, habiéndose señalado igualmente como nocivo en Crimea, Egipto e incluso en el Norte del Irán.

El insecto, aunque monófago, sobre especies de Oleáceas (es decir de los géneros *Olea*, *Jazmínium*, *Ligustrum* y *Phillyrea*) se puede

encontrar también sobre especies del género *Anemone* (Ranunculáceas) - Balachowsky (1966).

La biología de *Prays oleae* BERN. ha sido objeto de numerosos e importantes trabajos en la Cuenca Mediterránea, sobre todo en Italia, Grecia, Africa del Norte y España, donde los daños causados por este insecto son considerables y en muchos casos mayores que los de la mosca del olivo (*Dacus oleae* GMEL.). Entre las contribuciones más destacadas se pueden citar las de Silvestri (1908, 1942) y Melis (1945, 1946, 1948 y 1949) en Italia, Ruiz Castro (1948) y posteriormente Ramos (1974) en España, Pelekasis (1962) en Grecia y Sacantanis y Arambourg (1964) en Africa del Norte (Tunez y Marruecos), Mechelany (1971) en el Líbano.

Sus daños a la producción oleícola son particularmente acusados en estos momentos en los países del Oriente Próximo y Medio (Líbano, Siria, Turquía) en Grecia y Norte de Africa (Tunez, Argelia, Marruecos) en Francia Meridional, Italia y en España.

#### Morfología.

Huevo.- De contorno algo ovalado, con un diámetro máximo de 0,5 mm. Color blanquecino recién depuesto, con el corion finamente reticulado. De color amarillento cuando está en incubación (pudiendo verse a veces el embrión) y rojizo oscuro debido a la presencia de excrementos de la larva neonata, cuando ha eclosionado.

Larva.- La larva adulta tiene el cuerpo subcilíndrico de color avellana; la parte posterior de la cabeza de color negro; la parte submediana del pronoto con dos manchas negras más o menos extendidas; las partes sublaterales del dorso con dos franjas oliváceas o verdes

oscuras y dos franjas laterales de color pajizo o avellana pálido.

En la larva filófaga las dos manchas del pronoto ocupan casi toda la porción dorsal. Las larvas antófagas (ver ciclo evolutivo) - presentan un color algo menos intenso que las filófagas, la cabeza - amarillenta cuando han mudado, y las dos manchas negras del pronoto - poco extendidas. Algunos ejemplares se presentan de color avellana ca si uniforme con las franjas verdosas del dorso muy pálidas.

Cabeza y cuerpo con sedas cortas y largas, delgadas, alternan do entre ellas. Antenas muy cortas, de tres artejos, ojos laterales y compuestos cada uno de ellos por seis ocelos poco distantes entre sí. Mandíbulas robustas. Patas torácicas cortas y con pocas sedas; uña - terminal bastante larga y robusta. Falsas patas abdominales (en los - segmentos 3<sup>o</sup> al 6<sup>o</sup>) cortísimas y con una serie casi concéntrica de - uñitas.

Longitud de la larva a término de su desarrollo, 7-8 mm. y an chura 1,5 mm.

Crisálida.- Longitud de 5,5 - 6 mm, color marrón con algunas sedas sobre el 10<sup>o</sup> urito y segmento anal. Cubierta o no por un capu- llo sedoso, bastante transparente, de color blanco y unido al soporte por sus dos extremidades.

Con bastante exactitud se ha podido determinar en el laborato rio el sexo del futuro adulto, mediante observaciones al binocular de las crisálidas.

Adulto.- Microlepidóptero de doce a catorce mm de envergadura alar y longitud con alas plegadas de 6 a 6,5 mm.

Las alas anteriores son grises plateadas, con algunas escamas más oscuras y una franja de sedas finas y largas en sus bordes apicales.

Las alas posteriores son uniformemente de color gris plateado

con sus bordes posteriores provistos de una franja de sedas que van disminuyendo en longitud desde la base al ápice.

El cuerpo es de color gris; se puede hacer fácilmente la diferenciación sexual con ejemplares vivos, mediante observaciones de la extremidad abdominal (genitalia).

### Ciclo evolutivo y daños.

El ciclo evolutivo de *Prays oleae* BERN. comprende tres generaciones anuales en la Cuenca Mediterránea y cada una de ellas evoluciona sobre un órgano distinto del olivo.

En la zona de Granada los adultos de las tres generaciones, emergen en Abril-Mayo, Junio-Julio y Septiembre-Octubre respectivamente (Ramos y Azcón, 1972). Las larvas de la generación *antófaga* atacan a los botones florales y flores abiertas (de Mayo a Junio). Las larvas de la generación *carpófaga* evolucionan en el interior de los frutos desde su formación (Junio-Julio) y durante el curso de su evolución (hasta Octubre-Noviembre). La generación *filófaga* cuyas larvas se alimentan del parénquima foliar, presenta un desarrollo más lento, sobre todo en sus primeros estadios larvarios (Octubre -Noviembre a Abril -Mayo).

Sin embargo, esta regla no es de rigor absoluto pues puede variar en ciertos casos con las condiciones climáticas o fenológicas, pudiéndose retardar o acelerar una u otra generación. Si las larvas antófagas o carpófagas no tienen a su disposición botones florales o frutos, se desarrollan en las hojas, de manera idéntica a las larvas filófagas. Los daños de la generación filófaga no suelen ser muy graves; la generación antófaga produce daños mayores, pudiendo alcanzar a veces del 90 al 95% de los brotes florales (Arambourg, 1964). Sacan

tanis (1955) estima que una sola larva de *Prays oleae*, puede devorar sucesivamente los órganos reproductores de 20 botones florales. Los daños originados por la generación carpófaga siempre son los más importantes; aunque se suele atribuir a menudo la caída precoz del fruto a causas fisiológicas, de hecho en la mayor parte de los casos, este fenómeno es debido a la entrada en el fruto de la larva carpófaga neonata. Posteriormente a su penetración en el fruto joven (Junio-Julio) la larva se sitúa entre la almendra todavía líquida y el hueso; durante su alimentación llega a seccionar los conductos fibroso-vasculares que unen el pedúnculo al hueso y entonces al cesar la alimentación de la aceituna, ésta cae al suelo. Esta primera caída del fruto, a veces masiva, tiene lugar poco después de la fructificación, cuando el fruto ha alcanzado el tamaño de un grano de pimienta aproximadamente. A medida que la almendra se solidifica y endurece, la larva se instala allí (Agosto), la caída disminuye entonces de intensidad hasta llegar a ser prácticamente nula en dicho mes. Así permanece hasta que la larva alcanza su desarrollo completo y abandona el fruto para transformarse en crisálida; en este momento se verifica una segunda caída importante durante los meses de Septiembre-Octubre.

Los adultos aparecen al poco tiempo y los acoplamientos tienen lugar durante la noche o en la madrugada; las puestas comienzan a los pocos días después del acoplamiento, si las condiciones de temperatura son favorables.

Las hembras carpófagas deponen los huevos sobre las hojas y la incubación dura desde 20 a 60 días (según la fecha de oviposición); después de su eclosión la larva penetra directamente en la hoja por un orificio que perfora bajo el corion y excava una galería en el parénquima foliar, cuya forma y dimensiones son características de cada uno de los cuatro primeros estadios larvarios:

1er. estadio larvario: la galería es filiforme, en forma de -

letra S, de 20 a 25 mm de longitud y 0,2 mm de anchura.

2º estadio larvario: origina una galería pequeña circular en forma de letra O ó C, de aproximadamente 3 mm de diámetro.

3er. estadio larvario: la galería es redondeada, más o menos regular de unos 3 mm de diámetro.

4º estadio larvario: galería de contorno rectangular u oval irregular de 6 ó 7 mm de longitud y 3-4 mm de anchura, con rotura de la epidermis del envés de la hoja.

Al final de cada estadio, la larva sale de la galería por un orificio situado sobre el envés de la hoja y penetra en otra hoja por un orificio situado en la misma cara; por este orificio de entrada ella expulsa sus excrementos, los cuales se aglutinan con algunos hilos de seda. Cuando ha alcanzado el 5º estadio, empieza a devorar el envés de las hojas o se coloca sobre las yemas y brotes apicales, los cuales devora y después empieza a tejer el capullo, crisalidando entre las hojas o en la corteza del tronco y ramas gruesas del árbol.

Las larvas de la generación filófaga, representan la forma invernante del patógeno; su evolución es lenta pues la crisalidación comienza en general a finales de marzo o durante abril.

Una vez establecidas las características biológicas de *Prays oleae*, diremos que así como la lucha para controlar dicha plaga ha desplegado el uso de un exhaustivo número de productos químicos y otros métodos clásicos ensayados habitualmente contra insectos fitopatógenos, los métodos microbiológicos apenas han sido empleados.

Sólo tenemos referencias bibliográficas de los trabajos de Yamvrias (1964, 1967, 1972) en los que dicho autor estudia las posibilidades de aplicación de preparados comerciales a base de *B. thurín*--

*giensis* para el control de *Prays oleae* y sus efectos nocivos en el olivar.

Los estudios realizados por el mencionado investigador griego, pueden ser resumidos de la siguiente manera: Yamvrias utilizó para el tratamiento, preparaciones comerciales del tipo Thuricide 90 TS, Diipel, Bactospeine y Biotrol. Los ensayos los realizó en la generación antófaga, pues dadas las características de esta generación del insecto, es la más propicia para el tratamiento. La aplicación la efectuó cuando los olivos estaban en plena floración (40-45% de flor abierta) y utilizando estos productos a dosis adecuadas y previamente estudiadas por el autor, obtuvo unos resultados del orden del 74% de mortalidad a los ocho días después del tratamiento.

Como puede apreciarse el empleo de *B. thuringiensis* frente a *Prays oleae* se encuentra en una primera fase de estudio, por ello decidimos realizar la presente investigación cuyo OBJETO fué propuesto anteriormente. Nunca había sido descrito el aislamiento de *B. thuringiensis* en larvas muertas de *Prays oleae*. Aparte de la importancia teórica del hecho, está la importancia práctica de aplicar *B. thuringiensis*, aislado en el mismo biotopo en que va a ser usado como *insecticida microbiano*, con las implicaciones ecológicas que ello supondría. Para ello, se propone un Plan de trabajo mediante el cual se espera lograr un importante paso en estos estudios, los primeros que se realizan en España sobre el empleo de bacilos cristalíferos entomopatógenos como *insecticidas microbianos*, frente a *Prays oleae*.



### Adendum a la Introducción

Cuando se imprimía esta Memoria Doctoral, se ha recibido una separata de un trabajo científico de Santiago-Alvarez, Arroyo Varela y Alfaro García (1974) (Rev.Soc. Hisp. Lu. Am. Lep. "SHILAP", 5, 74-82) sobre aislamiento en España de *B. thuringiensis* en larvas enfermas de los Lepidópteros: *Plusia chalcites* (Esp.) *Ephestia kuehnella* Zell. y *Euproctis chrysorrhoea* L.

El espíritu de tal trabajo es similar al que animó el estudio que presentamos: Aislamiento de *B. thuringiensis* autóctonos.

Aprovechamos este Adendum a la Introducción para citar a tres investigadores españoles que estudian las posibilidades del control de plagas mediante el uso de preparados comerciales de *B. thuringiensis*.

Martínez Mata y Ruano (1961). An. Inst. Farm.Esp. 9-10, 35-48.

Ruperez (1973). IV Congreso Nacional de Microbiología. Granada. Sec. 8, nº 7.

No obstante, ninguno de los trabajos citados versa sobre el control de *Prays oleae*.

MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL Y METODOS

### 1. AISLAMIENTO DE BACILLUS EN LARVAS MUERTAS DE *PRAYS OLEAE*.

#### 1.1. Toma de muestras y obtención de triturados de larvas muertas.

El material de partida consistió en larvas muertas de distintas edades, de las tres generaciones anuales de *Prays oleae*, filófaga, antófaga y carpófaga.

La toma de muestras se llevó a cabo en las zonas que se exponen en la Tabla I.

Las épocas de muestreo, se resumen en el gráfico I, en el que también se incluyen los datos climáticos de temperaturas máxima y mínima ( $T^a$ , °C), humedad relativa (H.R.) y pluviosidad (Pluv.) a lo lar

Tabla I

LOCALIDADES EN QUE SE EFECTUARON LOS MUESTREOS Y NUMERO DE LARVAS -  
MUERTAS ESTUDIADAS.

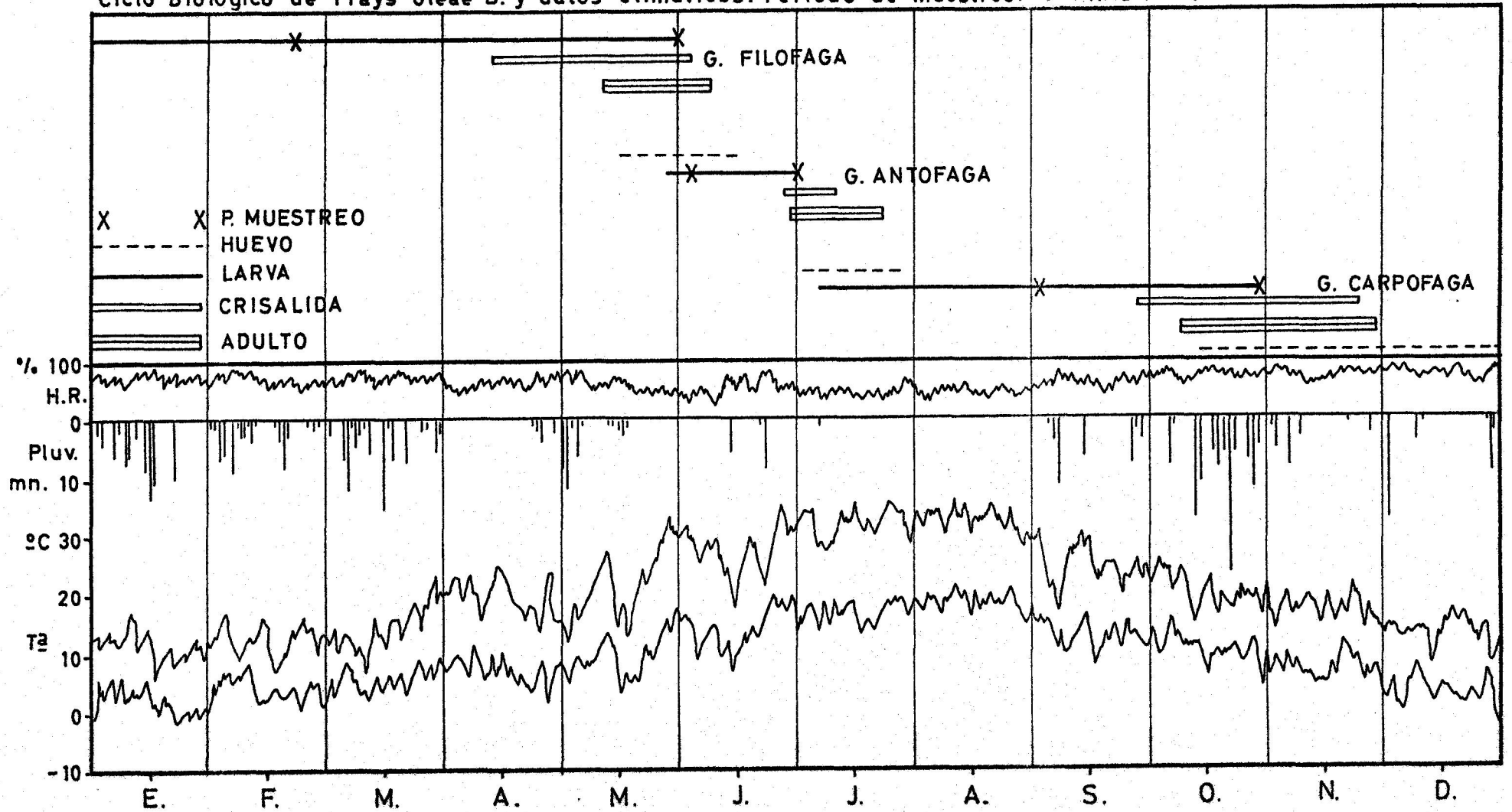
LOCALIDADES	Nº de larvas muertas por generación						Total
	1972			1973			
	F	A	C	F	A	C	
Albolote (Granada)	140	100	22	190	65	15	532
Alfacar ( " )	130	95	-	60	20	-	305
Deifontes( " )	85	60	10	50	30	10	245
Iznalloz ( " )	60	20	8	20	25	6	139
Huetor Vega( " )	35	12	-	30	10	-	87
Bailén (Jaén)	20	-	-	-	-	-	20
Arjona ( " )	35	12	10	-	-	-	57
Villanueva de la Reina (Jaén)	17	-	-	15	-	-	32
Martín de la Jara (Sevilla)	15	-	-	-	-	-	15
Antequera (Málaga)	120	50	25	65	36	-	296
Total	657	349	75	430	186	31	1728

F = Generación Filófaga.

A = " Antófaga.

C = " Carpófaga.

Ciclo Biológico de Prays oleae B. y datos climáticos. Periodo de muestreo: GRANADA 1972



go del año.

Todas las muestras tomadas se trasladaron al laboratorio, en bolsas de plástico adecuadas, conservándose en frigorífico a 4-5°C - las que no fueron utilizadas inmediatamente.

En el caso de la generación filófaga, el muestreo en el campo se realizó buscando las hojas que denotaban la posible existencia de larvas en su interior y la presencia o no de excrementos alrededor del orificio de entrada en la galería, lo cual hacía suponer la mayor o - menor actividad e incluso la muerte de la larva. Para la extracción - de las larvas se fué abriendo la galería con extremo cuidado de no to - car la larva, extrayéndolas y conservándolas en placas de Petri esté - riles.

Como es sabido, en la generación antófaga las larvas, desde la eclosión del huevo y durante los primeros estadios, permanecen den - tro del botón floral, lo cual se manifiesta al exterior por un cambio de color blanco a amarillento o rojizo, pero no se suelen observar - los excrementos que demuestran la actividad alimenticia de la larva; en este caso, el muestreo se hizo sistemáticamente de los botones flo - rales que presentaban el característico aspecto de ataque. En el labo - ratorio se procedió a buscar las larvas muertas, con ayuda del binocu - lar, y abriendo el botón floral con aguja enmangada. En los últimos - estadios de la vida de las larvas antófagas, estas salen al exterior de los botones florales y completan las últimas etapas del ciclo deambu - lando de un botón a otro y tejiendo hilos alrededor de las inflorescen -

cias; en este caso, el muestreo se realizó eligiendo aquellas inflorescencias en las que se observaban larvas muertas junto a los botones.

En el caso de larvas de la generación carpófaga, una vez eclosionado el huevo, penetran en el interior del fruto, donde empiezan a excavar la galería y al llegar a la almendra, esperan hasta que ésta se empieza a endurecer y entonces penetran en ella, permaneciendo allí hasta completar casi totalmente su ciclo, ya que sólo al llegar a 5ª edad excavan la galería de salida para crisalidar rápidamente en el exterior y convertirse en adulto. Externamente, el fruto no presenta ningún aspecto característico que denote el ataque por las larvas de *Prays oleae* por lo que el muestreo en este caso, fué al azar y en el laboratorio se fueron seleccionando por observación en los frutos del orificio de entrada de la larva al eclosionar del huevo, el cual generalmente está situado alrededor del pedúnculo. Los frutos seleccionados, se fueron cortando en capas muy finas desde el pedúnculo, con un estilete a fin de ir siguiendo la galería practicada por la larva; una vez llegado a la almendra, se separa ésta y se va abriendo con el estilete y con extrema precaución, ya que la larva cuando llega a la almendra ocupa casi todo su interior. Así se fueron seleccionando larvas muertas de esta generación.

Una vez obtenidas las larvas muertas, en el laboratorio fueron recogidas en placas de Petri estériles y se procedió a obtener un homogeneizado total de ellas; para lo cual se machacaron, en grupos de 10

de idéntica procedencia, en un mortero de vidrio con unos 5 ml de caldo común y una pequeña cantidad de arena estéril para ayudar a la trituración.

Todo el material se sometió previamente a la acción de los rayos ultravioleta durante 15 minutos, y la trituración se realizó después en campana de rayos ultravioleta que, aunque desconectada lógicamente de la red eléctrica, conservaba un ambiente estéril.

### 1.2. Aislamiento selectivo de *Bacillus*. Técnica y medios de cultivo utilizados.

Una vez obtenida la suspensión de larvas muertas, se calentó a 75°C durante 30 minutos, con objeto de seleccionar bacilos esporulados pertenecientes al género *Bacillus*. (Ver DISCUSION).

Esta suspensión se sembró en placa con agar común, cultivándose durante 48 horas a 28°C.

De las colonias con diferencias morfológicas distinguibles, - se realizó una tinción de esporas para confirmar la presencia de *Bacillus*.

Para la observación de las esporas, se empleó el método de tinción propuesto por Shaeffer-Fulton (1933).

El procedimiento seguido fué:

- 1) Se cubre la extensión con solución acuosa al 5% de verde malaquita y se calienta durante un minuto a emisión de vapores.



- 2) Se lava con agua corriente.
- 3) Se contrasta con solución acuosa de safranina al 0,5% durante - 30 segundos.
- 4) Por último, se lava, seca y observa.

Los cuerpos bacterianos se tiñen de rojo y las esporas de color verde.

## 2. IDENTIFICACION DE BACTERIAS ESPORULADAS AISLADAS Y SELECCION DE RAZAS CRISTALIFERAS.

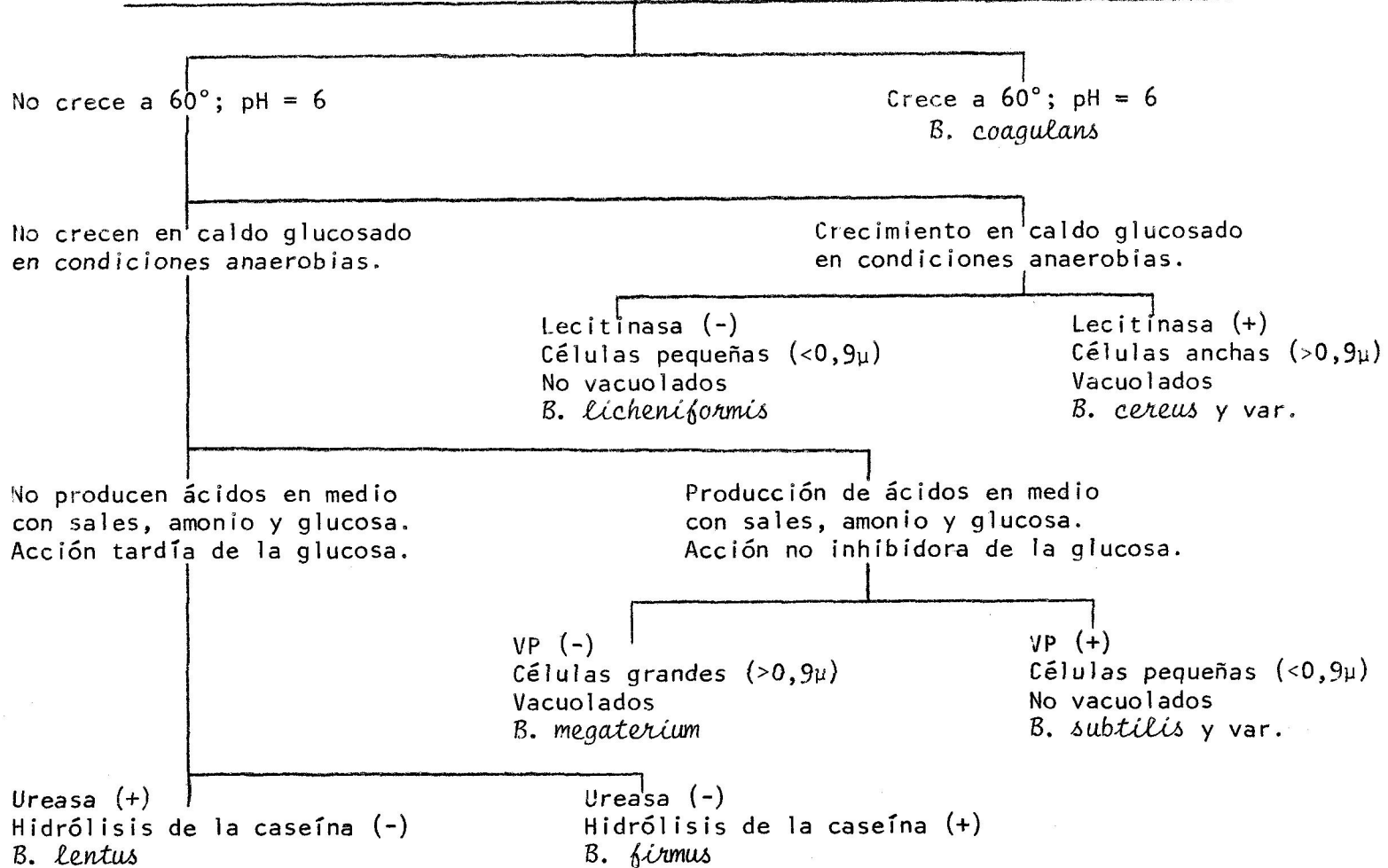
### 2.1. Pruebas bioquímicas de identificación hasta nivel de grupo *B. cereus*.

Para la identificación de los microorganismos aislados, se siguió el método de Wolf y Barker (Gibbs y Shapton, 1968) que los clasifica en tres grupos dentro del género *Bacillus*, según el tipo de esporas (oval o esférica) y según el esporangio aparezca o no hinchado.

En el Grupo I se encuadra *B. cereus* y variedades, al que pertenecen los bacilos cristalíferos, objeto principal del presente trabajo. El hecho de considerar, o no, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, se discute en el capítulo correspondiente. En el Cuadro I se expone la clave sistemática de identificación hasta llegar a *B. cereus*.

Cuadro I

ESPORAS OVALES O CILINDRICAS Y ESPORANGIO NO HINCHADO. PARED DELGADA: GRUPO I.



Las técnicas empleadas fueron las siguientes:

2.1.1. Crecimiento a 60°C a pH = 6:

Se utilizó como medio de cultivo, caldo común y se incubó a 60°C durante 48 horas.

2.1.2. Crecimiento en caldo glucosado y condiciones anaerobias:

Se incubó en campana de Brewer a 28°C durante 48 horas.

2.1.3. Producción de lecitinasa:

Se observó, empleando como medio de cultivo agar común y emulsión de yema de huevo.

Para la preparación de la emulsión de la yema de huevo, se siguió la técnica descrita por Harrigan y McCance (1966), operándose de la siguiente manera: En primer lugar, se añade asépticamente una yema de huevo a una solución acuosa de cloruro sódico al 1% (250 ml de solución). Para extraer una yema de huevo asépticamente, se lava éste externamente con detergente y alcohol y posteriormente se le practica un orificio pequeño en uno de sus extremos, por el que se extrae la clara. Después de agrandado el orificio, se vierte la yema en el matraz que contiene la solución estéril de cloruro sódico en agua. Todas estas operaciones se realizan en el halo del mechero lo que permite que la esterilidad lograda por esta técnica sea notoria. La emulsión se deja toda la noche en el frigorífico para que sedimenten los tejidos epiteliales de la yema; y para su empleo, se mezclan 10 ml de sobrenadante por cada 90 ml de medio fundido y enfriado a 50°C.

Con estas pruebas se llega al grupo *B. cereus* y var. Sin embargo, como han sido descritos tipos de *B. thuringiensis* no productores de lecitinasa, con todos los bacilos esporulados en identificación - productores o no de lecitinasa, se realizó también una tinción específica, que se describe a continuación, para observar la presencia de - cuerpos parasporales.

## 2.2. Tinción específica de cuerpos parasporales.

Se realizó siguiendo el método de Smirnoff (1962), que utiliza los siguientes reactivos:

Reactivo A: Negro de amido 10 B, 1.5 mg disueltos en 50 partes de metanol, 40 partes de agua destilada y 10 partes de ácido acético.

Reactivo B: Solución acuosa de fuschina al 30%.

Método.- Se hace la extensión sobre un porta y se fija al calor; se cubre la extensión con reactivo A: durante 70 segundos. Después se lava con agua y se cubre con reactivo B, durante 20 segundos. Finalmente se lava y seca sobre papel de filtro.

Esta tinción permite diferenciar esporas, cristales y formas vegetativas de los bacilos. Los cristales se observan de color azul - oscuro casi negro, con su típica forma romboidal, las esporas de color rosa claro y las formas vegetativas de color rosa más fuerte.

### 3. DETERMINACION MEDIANTE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LOS TIPOS DE BACILOS CRISTALIFEROS (*B. thuringiensis*) IDENTIFICADOS.

Para la clasificación bioquímica de los distintos tipos de *B. thuringiensis*, se ha seguido el criterio taxonómico de De Barjac y Bonnefoi (1962). De acuerdo con los citados autores, se han realizado unas pruebas bioquímicas que son comunes a todos los tipos y otras diferenciales que permiten clasificarlos en seis grupos.

Morfológicamente son bacilos Gram positivos, aislados o en cadenas, móviles por flagelos peritricos; forman una endospora oval, subterminal, al mismo tiempo que una inclusión proteica conocida por el nombre de cristal-proteína o cuerpo parasporal.

Las esporas y los cristales son liberados en el medio por lisis de la célula vegetativa y aparecen entonces separados unos de otros, salvo en el caso de la variedad *finitimus* de *B. thuringiensis*, donde la espora y el cristal permanecen unidos.

Las formas vegetativas jóvenes (de un cultivo de 24 horas) miden de 3 a 6  $\mu$  de longitud y de 0,8 a 1,3  $\mu$  de ancho. Las esporas, de 0,8 a 0,9  $\mu$  por 1,6 a 2  $\mu$ ; los cristales, de 0,4 a 0,8  $\mu$  por 1 a 1,4  $\mu$ . Las colonias de 24 horas sobre agar común, tienen aspecto rugoso y son planas, de contorno más o menos regular, opacas y blanquecinas.

Las características bioquímicas comunes a los distintos tipos de *B. thuringiensis*, son las siguientes:

#### 3.1. Producción de Indol:

Se llevó a cabo la observación, sobre cultivos de 4 a 6 días

en agua de peptona, mediante la adición a los mismos de reactivo de Kovacs.

3.2. Prueba del Rojo de metilo:

Se realizó sobre cultivos de 4 a 5 días, en el medio RM-VP (Oxoid). Como indicador se utilizó una solución al 0,04% de rojo de metilo.

3.3. Producción de ureasa:

La hidrólisis de la urea se ensayó sobre el cultivo de 4 a 5 días en el medio a base de urea-agar de Christensen (Harrigan y McCance, 1969) con rojo fenol como indicador.

3.4. Utilización de citrato como única fuente de carbono:

Se ensayó sobre un cultivo de 2 a 7 días empleando el medio de Kosser (Oxoid).

3.5. Fermentación de azúcares:

La capacidad fermentativa sobre diversos azúcares fue puesta de manifiesto sobre cultivos de 1 a 10 días en un medio especial (De Barjac y Bonnefoi, 1962), cuya composición es la siguiente:

$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ . . . . .	1 g
ClK . . . . .	0,2 g
$\text{SO}_4\text{Mg}$ . . . . .	0,2 g
Extracto de levadura . . . . .	0,2 g
Agar . . . . .	15 g
Agua destilada . . . . .	1.000 ml
Púrpura de bromocresol . . . . .	0,0025 %

Los azúcares ensayados fueron los siguientes:

Glucosa,  
Maltosa y  
Lactosa.

Estos azúcares se esterilizaron por filtración y se añadieron extemporáneamente al medio, de modo que la concentración final fuese del 0,5%.

Para la clasificación de los distintos tipos de *B. thuringiensis*, se realizaron las pruebas bioquímicas diferenciales que se indican en el Cuadro II.

Las técnicas seguidas fueron las siguientes:

### 3.6. Producción de acetil-metil-carbinol:

Se ensayó sobre cultivos de 2 a 7 días en el medio RM-VP (Oxoid).

Para poner de manifiesto la presencia de acetil-metil-carbinol, se adicionó a los cultivos 1 ml de solución de KOH al 16% en agua destilada y 1 ml de  $\alpha$ -naftol al 6% en etanol.

### 3.7. Producción de lecitinasa:

Se realizó según la técnica descrita anteriormente de Harrigan y Mc Cance (1966).

### 3.8. Fermentación de salicina:

Se utilizó el medio especial citado para la fermentación de azúcares (De Barjac y Bonnefoi, 1962).

Cuadro II. - DETERMINACION BIOQUIMICA DE LOS TIPOS DE *B. thuringiensis*.

Acetil - Metil - Carbino +	Lecitinas +	Salicina +	Pigmento - Sacarosa +	Almidón + cristal separado Almidón - cristal unido	Grupo I Tipo berliner Grupo II Tipo finitimus
		Salicina -	Pigmento + Sacarosa +	Almidón + Sacarosa - Pigmento + Almidón + Sacarosa + Pigmento - Almidón + Sacarosa - Pigmento -	Grupo III Tipo alesti Grupo IV Tipo sotto Tipo dendrolimus
	Lecitinas -	Salicina +	Almidón + Pigmento - Sacarosa -	Grupo V	Tipo galleriae
Acetil-Metil-Carbino -	Lecitinas -	Salicina -	Pigmento - Sacarosa +	Grupo VI Velo + Velo -	Tipo subtoxicus Tipo entomocidus



### 3.9. Producción de pigmento:

Se realizó sobre cultivo de patata según la técnica habitual.

### 3.10. Fermentación de la sacarosa:

Se empleó el mismo medio especial citado (De Barjac y Bonnefoi, 1962).

### 3.11. Hidrolisis del almidón:

El ensayo se hizo sobre cultivos de 10 días en medio de agar común con adición de 1% de almidón. El medio se repartió en placas (10 ml por placa) y la siembra se realizó en sectores de las placas, tocando la superficie del medio con el hilo de platino. La lectura se realizó inundando las placas de lugol, que forman una coloración azul-violácea característica, en las zonas donde el almidón no ha sido hidrolizado.

### 3.12. Producción de velo:

Se comprobó por observación periódica de los diferentes cultivos en medio líquido.

Los citados autores, De Barjac y Bonnefoi (1962) que han realizado también el estudio serológico de los diferentes tipos de *B. thuringiensis*, basado en la aglutinación flagelar, indican que tal técnica antigénica, confirma la validez de las pruebas bioquímicas para la clasificación, por lo que se ha creído suficiente la clasificación bioquímica.

#### 4. ESTUDIO SOBRE PRODUCCION DE $\beta$ -EXOTOXINA POR LAS RAZAS DE *B. thuringiensis* AISLADAS.

##### 4.1. Utilización de un microorganismo sensible a la $\beta$ -exotoxina.

Para el estudio de la producción de  $\beta$ -exotoxina por los distintos tipos de *B. thuringiensis*, Rosemberg et al. (1971) y Carlberg -- (1973), han realizado pruebas de toxicidad frente a larvas de mosca común (*Musca domestica*), frente a diversos animales de laboratorio y también un bioensayo frente a diversos microorganismos, algunos de ellos demostraron ser sensibles a la  $\beta$ -exotoxina.

Dichos autores, supusieron que los microorganismos serían sensibles a la  $\beta$ -exotoxina porque el mecanismo de acción de esta sustancia consiste en inhibir la síntesis de ARN-polimerasa, dependiente de ADN que antes habían apuntado Sebesta y Horska (1968) y Burges y Hussey (1971).

Rosemberg et al. (1971) realizaron el bioensayo con varios microorganismos, y obtuvieron una mayor sensibilidad a la  $\beta$ -exotoxina, usando *Sarcina flava*, (de acuerdo con Ramos-Cormenzana, 1974, las bacterias del género *Sarcina*, si son aerobios, deben incluirse en el género *Micrococcus*. No obstante, por ser una cepa enviada como "*Sarcina flava*" por el Dr. Carlberg, se continúa usando esta última denominación para evitar confusiones y contradicciones con la bibliografía), por lo que Carlberg en su trabajo posterior (1973), utiliza únicamente este microorganismo para la prueba. La técnica fue desarrollada por Rosem-

berg et al. (1971) con  $\beta$ -exotoxina impura, extraída de cultivos de *B. thuringiensis* y con  $\beta$ -exotoxina purificada por precipitación fraccionada por etanol, de acuerdo con el método de Benz (1966) obteniendo, en ambos casos, análogos resultados frente a "*Sarcina flava*".

4.1.1. Obtención de cultivos de *B. thuringiensis* para la investigación de  $\beta$ -exotoxina.

En el presente trabajo se ha seguido el método descrito por los autores antes mencionados y se ha utilizado el medio de Conner y Hansen (1967 a, b) para la producción de  $\beta$ -exotoxina por los distintos tipos de *B. thuringiensis*, aislados de larvas muertas de *Prays oleae*; sin embargo, se ha sustituido el citrato por glucosa, ya que se observa en este caso, un mayor número de células en el cultivo (Carlberg, 1973).

La composición del medio es la siguiente:

$PO_4HK_2$ .....	0,5 g	$Cl_2Ca \cdot 7H_2O$ .....	0,005 g
$PO_4H_2K$ .....	0,5 g	$PO_4H(NH_4)Na \cdot H_2O$ .....	0,15 g
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$ ..	0,005 g	Glucosa .....	1 g
$SO_4Mn \cdot H_2O$ ...	0,003 g	"Vitamin free Casamino	
$SO_4Fe \cdot 7H_2O$ ..	0,001 g	acids" .....	1 g
		Agua destilada .....	100 ml

pH = 7

El medio fué esterilizado al autoclave a 120°C durante 20 minutos y la solución de glucosa, por filtración (Millipore) añadiéndola

después asépticamente al medio.

El medio así preparado, se repartió en matraces Erlenmeyer de 250 ml a razón de 100 ml por matraz. Los matraces se inocularon con cultivos de 24 horas de los diferentes tipos de *B. thuringiensis* y se incubaron a 28°C en agitación. El tiempo de incubación para obtener la máxima producción de  $\beta$ -exotoxina, se encontró a las 24 horas, ya que la producción de dicha exotoxina es independiente de la esporulación y en este tiempo, la cantidad de glucosa añadida al medio, impide que se desencadene el mencionado proceso.

Después de 24 horas de incubación, se centrifugaron los cultivos a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos y el sobrenadante se concentró en rotavapor a 40°C, a la décima parte de su volumen.

Los concentrados se esterilizaron al autoclave a 117°C, durante 20 minutos.

#### 4.1.2. Bioensayo propiamente dicho:

Para la realización del bioensayo, se utilizó "*Sarcina flava*" como microorganismo sensible (Rosemberg et al., 1971) en cultivos de 24 horas en agar común a 28°C. En las pruebas se emplearon placas de Petri especiales para seguir la técnica de los pocillos.

El medio empleado para obtener masa de "*Sarcina*" fué el descrito en el trabajo de Rosemberg et al. (1971) que tiene la siguiente composición:



Peptona .....	6 g
Casitone .....	4 g
Extracto de levadura .....	3 g
"    " carne .....	1,5 g
Glucosa .....	1 g
Agar .....	15 g
Agua destilada .....	1000 ml

pH = 6,5

4.1.2.1. Elección de las condiciones óptimas para el desarrollo del bioensayo.

En primer lugar, se repartieron 10 ml de medio por placa y una vez sólidos, se cubrieron con otros 5 ml de medio enfriados a 45°C e inoculados con 0,2 ml de una suspensión del cultivo de 24 horas de "*Sarcina flava*".

Se siguió la técnica de los pocillos colocando cuatro en cada placa. Con pipeta Pasteur estéril se llenaron los pocillos con el concentrado de medio donde había cultivado *B. thuringiensis*. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas, al cabo de las cuales el crecimiento de "*Sarcina flava*" es suficiente y permite obtener halos de inhibición de mayor diámetro que si se incubaba durante 48 horas. Por lo tanto, se eligieron como condiciones óptimas para esta prueba las siguientes: 24 horas de incubación a 28°C para la producción de  $\beta$ -exotoxina por las razas de *B. thuringiensis* en el medio de Conner y Hansen

(1967) y 24 horas para el crecimiento de "*Sarcina flava*" en el medio antes descrito (Rosemberg et al., 1971).

Estas pruebas se realizaron con todos los microorganismos -- aislados e identificados en el presente trabajo y caracterizados como *B. thuringiensis*, procurando en todos los casos una normalización máxima de la técnica, a fin de obtener resultados comparativos de la actividad de los mismos. No obstante, y con el objeto de evitar alguna variación, se repitieron las pruebas utilizando placas de Kluener cuyas dimensiones son 30,5 x 11,5 x 2 cm de profundidad. Se emplearon para estas placas 70 ml del medio de crecimiento de "*Sarcina*", como soporte y 30 ml para la capa superior inoculados con 1 ml de la suspensión del cultivo de 24 horas de "*Sarcina flava*". Así se estudió conjuntamente la producción de  $\beta$ -exotoxina por las diferentes razas de *B. thuringiensis* aisladas.

#### 4.1.3. Selección de las razas cristalíferas más activas.

Con esta técnica se seleccionaron aquellos microorganismos productores de cristales más activos en cuanto a producción de  $\beta$ -exotoxina, midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de "*Sarcina flava*".

Estas experiencias, se realizaron con los bacilos cristalíferos, como se ha indicado, y además con otras especies de *Bacillus* no cristalíferos, aislados también en larvas muertas de *Prays oleae*.

La técnica empleada para el estudio de la producción de la -

$\beta$ -exotoxina en cultivos de *Bacillus* no cristalíferos, ha sido la misma descrita para las especies de bacilos cristalíferos y los resultados igualmente expresados en mm de halo de inhibición del crecimiento de "*Sarcina flava*".

Igualmente, se han ensayado durante esta prueba otras especies del género *Bacillus*, pertenecientes a la colección de microorganismos de la Estación Experimental del Zaidín y no relacionados en absoluto con *Prays oleae*, con objeto de utilizar unos auténticos controles del proceso. Como testigo positivo en todos los casos, se ha utilizado una raza de *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*, obtenida a partir de un producto comercial (Thuricide).

#### 4.2. Estudio de la sensibilidad de otros microorganismos diferentes de "*Sarcina flava*", a la $\beta$ -exotoxina, empleando las razas cristalíferas más activas.

Una vez seleccionadas las razas cristalíferas más activas frente a "*Sarcina flava*", se ha realizado el bioensayo con las mismas técnicas descritas, pero probando la sensibilidad de otros microorganismos distintos de "*S. flava*". Se ha realizado la prueba con un bacilo Gram positivo: *Bacillus* sp.; un bacilo Gram negativo: *Pseudomonas reptilivora* y un coco Gram positivo: *Staphylococcus aureus*.

5. PRUEBAS DE TOXICIDAD EN INSECTARIO SOBRE LARVAS DE *Prays oleae* DE LOS BACILOS CRISTALIFEROS TIPADOS.

5.1. Obtención de cultivos de *B. thuringiensis* (aislados especialmente para esta Tesis).

5.1.1. Obtención de cultivos de *B. thuringiensis*, con máxima cosecha de esporas y cuerpos parasporales.

Para la obtención de máxima cosecha de esporas y cristales, a partir de los cultivos de *B. thuringiensis* se ha seguido el método - descrito por Dubois (1968) con algunas modificaciones.

La técnica seguida fué la siguiente:

Los distintos tipos de *B. thuringiensis* de la colección, se sembraron en agar común inclinado y se incubaron a 28°C durante 20 horas con objeto de obtener masa, la cual servirá de inóculo para el medio de crecimiento.

El medio de crecimiento tiene la siguiente composición (Dubois, 1968).

Peptona .....	17 g
"Phytone" .....	3 g
ClNa .....	5 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	2,5 g
Glucosa .....	2,5 g
H <sub>2</sub> O .....	1.000 ml

pH = 7,3



En este trabajo se ha usado extracto de levadura en sustitución de "Phytone".

Este medio se repartió en tubos de centrífuga de 10 cm de longitud y 4 cm de diámetro, a razón de 10 ml de medio por tubo, por lo que la aireación era adecuada, y se esterilizaron a 117°C durante 20 min. Se preparó un tubo por cada bacteria a ensayar y se inoculó con un asa de platino del cultivo de 20 horas en agar común, de los distintos tipos de *B. thuringiensis*.

Los tubos así inoculados, se incubaron a 28°C durante 20 horas, y una vez crecidos, se enfriaron en frigorífico (una 1/2 hora en congelador) y se centrifugaron a 4.000 r.p.m. durante 20 min.

Los sobrenadantes fueron eliminados y las células se suspendieron en agua destilada estéril (10 ml por tubo).

Esta suspensión sirvió de inóculo para sembrar el medio de esporulación cuya composición es la siguiente (Dubois, 1968).

$SO_4Fe.7H_2O$ .....	0,000075 g
$SO_4Cu.5H_2O$ .....	0,00075 g
$SO_4Zn.7H_2O$ .....	0,00075 g
$SO_4Mn.7H_2O$ .....	0,005 g
$SO_4Mg$ .....	0,003 g
$Cl_2Ca.2H_2O$ .....	0,0018 g
$SO_4(NH_4)_2$ .....	0,3 g
Glucosa .....	0,2 g
Extracto de levadura .....	0,2 g

Agua destilada ..... 100 ml

pH = 8,05

El  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , fué esterilizado al autoclave por separado y -  
añadido extemporáneamente al medio.

El pH fué ajustado con  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,1M.

Por cada bacteria se preparó un matraz de 250 ml conteniendo  
90 ml de medio de esporulación; se inocularon con 10 ml de la suspen-  
sión de bacterias y se incubaron en agitación, a 28°C durante 40 ho--  
ras.

#### 5.1.2. Obtención de cultivos con máxima cosecha de células - vegetativas.

Para la obtención de cultivos con máxima cosecha de cé-  
lulas vegetativas, de los distintos tipos de *B. thuringiensis*, se ha  
seguido el método de Rosemberg et al. (1971), anteriormente descrito,  
que utiliza el medio de Conner y Hansen (1967 a,b) pero sustituyendo  
el citrato por la glucosa (Carlberg, 1973).

El medio se repartió en matraces Erlenmeyer de 250 ml a razón  
de 100 ml por matraz; estos matraces fueron inoculados con cultivos -  
de 24 horas de los distintos tipos de *B. thuringiensis* a ensayar y se  
incubaron en agitación a 28°C durante 24 horas. En este tiempo de in-  
cubación, la cantidad de glucosa añadida al medio impide que se desen-  
cadene la esporulación.

## 5.2. Descripción de la técnica seguida para la preparación de las larvas y acondicionamiento del insectario.

Se han utilizado para este ensayo, larvas de la generación anatófaga de *Prays oleae* porque en esta generación, aunque la larva al eclosionar del huevo, penetra dentro del botón floral, todavía cerrado, al llegar a la segunda edad comienza a salir al exterior, pasando de un botón a otro y empieza a tejer los hilos alrededor de la inflorescencia, siendo entonces el momento idóneo para hacer el tratamiento pues la larva está devorando continuamente los botones florales. - Esto ocurre cuando hay aproximadamente un 50-60% de flor abierta, según datos de Yamvrias (1972).

El ensayo se realizó con larvas de hasta mediados de la quinta edad, pues a partir de entonces, comienza a disminuir la velocidad de alimentación, de crecimiento y movilidad de las larvas, las cuales buscan un soporte adecuado y empiezan a tejer hilos a su alrededor para comenzar la ninfosis.

La prueba consistió en separar el material obtenido en el campo, en lotes de cinco larvas de la misma edad y colocarlas con la misma cantidad de inflorescencias en frascos de vidrio transparentes, de poca altura y boca ancha; los frascos se taparon con una gasa de malla fina que se sujetó con goma elástica alrededor de la boca del frasco. Esta técnica impide que se puedan escapar las larvas y permite al mismo tiempo la aireación adecuada.

Los frascos se mantuvieron en un insectario de modo que las condiciones fueran las más semejantes al habitat natural; el insectario consta de un armazón metálico con unos estantes y completamente abierto. Con el objeto de evitar la acción de la luz solar directa sobre las larvas, se complementa con un sistema de persianas, circunstancia muy importante si se tiene en cuenta que, en el olivo, las larvas siempre tienden a situarse al abrigo de los rayos del sol directos.

Con cultivos de bacilos cristalíferos aislados, con máxima cosecha de esporas y cristales ó de células vegetativas, se han hecho suspensiones a distintas diluciones con los cuales se pulverizaron las inflorescencias que sirven de alimento a las larvas.

Se utilizaron para el tratamiento lotes de cinco larvas y los testigos correspondientes, realizando varias repeticiones para cada bacilo cristalífero en las dos formas antes descritas y para cada dilución.

Las lecturas parciales, se realizaron a las 48 horas después del tratamiento y periódicamente cada 48 horas. La lectura final, cuando ya habían emergido los adultos, contando el número de ellos por cada frasco.

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1. AISLAMIENTO DE *Bacillus* EN LARVAS MUERTAS DE *Prays oleae*.

Durante el desarrollo de la presente investigación, se han realizado múltiples aislamientos de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*, en 1728 larvas muertas de las tres generaciones anuales de *Prays oleae*, con el fin de buscar bacilos cristalíferos del grupo *B. thuringiensis*.

Entre las larvas estudiadas las había de las cinco edades y generaciones. Un 60%, aproximadamente, pertenecían a la generación filófaga, un 30% a la antófaga y un 10% a la carpófaga.

A partir de los homogeneizados de dichas larvas muertas, se consiguieron aislar un total de 680 microorganismos pertenecientes al género

ro *Bacillus*, que se encuadraron según el esquema de clasificación de Wolf y Barker (Gibbs y Shapton, 1968) en tres grupos, según se resume en la Tabla II, de acuerdo con la generación de procedencia.

Tabla II

GRUPO AL QUE PERTENECEN LOS *Bacillus* AISLADOS DE ACUERDO CON LA FORMA DE ESPORA Y ESPORANGIO.

<u>Nº de <i>Bacillus</i> aislados según generación procedencia</u>				
<u>Grupo</u>	<u>Filófaga</u>	<u>Antófaga</u>	<u>Carpófaga</u>	<u>Total</u>
I	289	123	56	468
II	112	65	19	196
III	10	6	-	16
Total	411	194	75	680

## 2. IDENTIFICACION DE *Bacillus* DEL GRUPO I AISLADOS Y SELECCION DE RAZAS CRISTALIFERAS.

Los bacilos esporulados del Grupo I, se sometieron a las pruebas de identificación, según el esquema de Wolf y Barker (Gibbs y Shapton, 1968). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III, de la que se deduce que 51 bacilos pertenecían al grupo *B. cereus* y variantes.

De dichas bacterias, se ha demostrado en 25 la presencia de cuerpos parasporales según el método de tinción de Smirnoff (1962). Estos *Bacillus* se numeran con sigla T y subíndices 1 al 25.

En Tabla IV se indica la generación de *Prays oleae* de cuyas larvas muertas se aislaron los 51 bacilos identificados como *B. cereus* y variantes y los 25 de ellos encuadrados como *B. thuringiensis*.

En fotografía nº 1 se expone un modelo de tinción de cuerpos parasporales.



Tabla III

IDENTIFICACION DE *Bacillus* sp. AISLADOS DE LARVAS MUERTAS DE *Prays* -  
*oleae*.

---

<u>Prueba de Identificación (**)</u>	<u>Nº de aislados positivos (*)</u>
Bacilos del grupo I	468
No crecen a 60°C pH = 6	210
Crece en caldo glucosado en condiciones anaerobias	130
Lecitinasa (+) con células anchas (0,9 $\mu$ ) y vacuoladas	51 ( <i>B. cereus</i> y grupo)
Tinción de cuerpos parasporales	25 ( <i>B. thuringiensis</i> )

---

(\*) Número de aislados que satisfacen positivamente la prueba correspondiente.

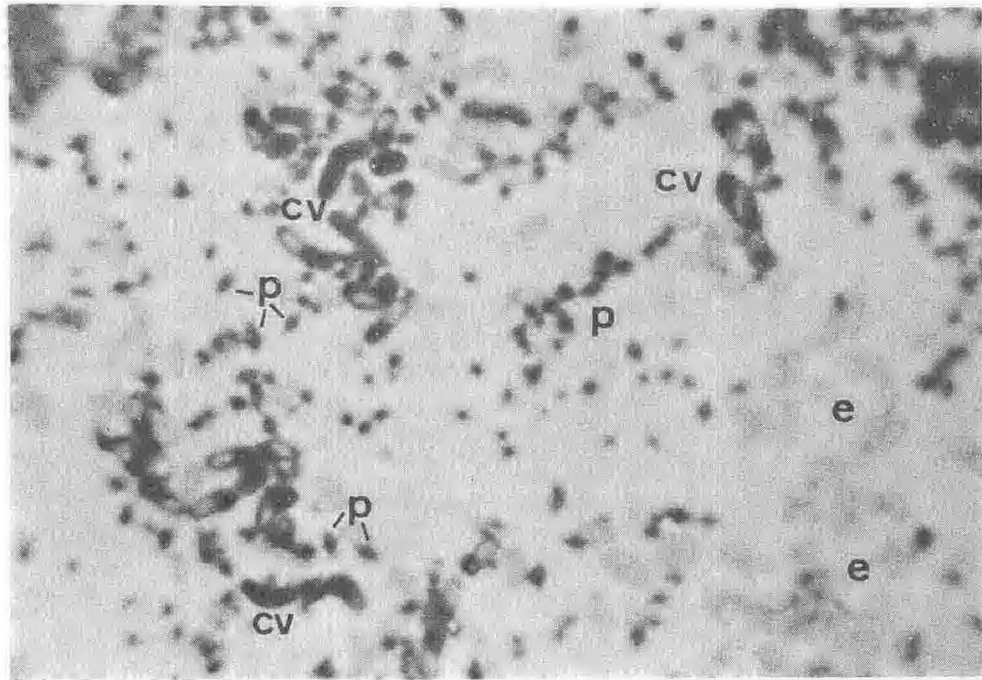
(\*\*) Cada prueba de identificación fué realizada solamente con los *Bacillus* que habían satisfecho la prueba anterior, salvo la tinción de cuerpos parasporales que se realizó con los 468 bacilos del grupo I.

Tabla IV

GENERACION DE *Prays oleae* A LA QUE PERTENECIAN LAS LARVAS MUERTAS DE LAS QUE SE AISLARON LAS RAZAS DE *B. cereus* EN ESTUDIO.

<u>Microorganismos</u>	<u>Generación de procedencia</u>		
	<u>Filófaga</u>	<u>Antófaga</u>	<u>Carpófaga</u>
(51) <i>B. cereus</i> y grupo	26	18	7
(25) <i>B. thuringiensis</i> y var.	12	11	2

Entre paréntesis se indica el número de *Bacillus* identificados como *B. cereus* y variedades; dentro de ellas, los caracterizados como *B. thuringiensis*, según datos de Tabla III.



Fotografía nº 1: Tinción de cuerpos parasporales.

CV - Células vegetativas.

e - Esporas

p - Cuerpos parasporales (cristales)

### 3. DETERMINACION DE LOS TIPOS DE *Bacillus* CRISTALIFEROS (*B. thuringiensis*) IDENTIFICADOS.

En las Tablas VI y VII se exponen los resultados de las pruebas de identificación indicadas en la cabecera de las mismas por los números naturales del 1 al 10. Tales números representan las pruebas que se esquematizan en la Tabla V.

En la Tabla VII se consignan los tipos de *B. thuringiensis* en los que se incluyen los *Bacillus* cristalíferos aislados.

En la Tabla VI se recogen los resultados de identificación de las llamadas "pruebas comunes" según el esquema de clasificación de De Barjac y Bonnefoi (1962), mientras que en la Tabla VII se anotan los resultados de las pruebas específicas, de acuerdo con los mencionados autores.

Se someten a identificación los 25 *Bacillus* cristalíferos aislados así como una raza de *B. thuringiensis* procedente de un preparado comercial: "Thuricide".

