

INSECTICIDA BIOLÓGICO CONTRA EL "BICHO DEL CESTO" COMUN

Por: SOLANES, R., A. R. MALLEA, G. S. MÁCOLA,
J. G. GARCÍA S., L. A. BAHAMONDES,
J. H. SUÁREZ y D. ARANDA ¹

SUMMARY

During the years 1971-74 a method of biological control of the common "bicho del cesto" (*Oiketicus moyanoi* MALLEA et al.) has been tested. This method consisted in the application—in field and laboratory conditions—of crystal producing entomogenous bacteria of the genus *Bacillus*. In the test used *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, *B. thuringiensis* var. *alesti* and *B. entomocidus* var. *subtoxicus*.

The cepages were cultivated in our laboratories and applied by spraying. The results obtained enable us to value the excellent possibilities for the control of this plague, avoiding the application of chemical insecticides and the problems involved.

INTRODUCCION

En los modernos planes de control se están estudiando las posibilidades de aplicación de métodos, que eviten en lo posible el empleo de plaguicidas químicos de amplio espectro, los cuales a la vez que controlan temporariamente una plaga, eliminan los enemigos naturales de la misma y otros insectos beneficiosos.

Los esfuerzos tienden en la actualidad a utilizar aquellos elementos que la naturaleza pone a nuestra disposición, entre los cuales debemos destacar el empleo de enemigos naturales y controles biológicos específicos.

Dentro del amplio panorama que ofrecen estos últimos, el empleo de una bacteria, el *Bacillus thuringiensis*, está cobrando cada día ma-

¹ Ing. Agr. Investigador de la Cátedra de Microbiología; Ing. Agr. Profesor Titular, Ing. Agr. Profesor Adjunto, Ing. Agr. Jefe de Trabajos Prácticos, Agrón. Aux. Inv., Enól. Aux. Inv. de la Cátedra de Zoología y Alumno de la Cátedra de Microbiología respectivamente, en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

por incremento en los planes para reducir poblaciones de ciertos insectos.

El *Bacillus thuringiensis* y especies relacionadas, son bacterias esporuladas aerobias, Gram positivas y tienen la particularidad que las diferencia de otras especies de su género, de formar una inclusión cristalina en forma de diamante. Esta inclusión es una proteína con aproximadamente 17% de nitrógeno y sin fósforo (2) y aparece dentro de la célula en el momento de la esporación.

Este cristal resulta sumamente tóxico para gran número de larvas de Lepidópteros y algunos Dípteros, ha sido utilizado desde hace 4 ó 5 décadas para el control de insectos. Al principio se lo cultivó y empleó en pequeños ensayos, los óptimos resultados obtenidos en diferentes partes del mundo, movió a la industria de la fermentación a elaborar productos en base a esporos y cristales de estas bacterias; los que se encuentran en el mercado internacional bajo diferentes marcas y formulaciones.

Los preparados son absolutamente inofensivos para el hombre, condición que se hace extensiva a todos los vertebrados y las plantas (8).

La tremenda actividad patogénica para las larvas de algunos insectos, se desarrolla gracias a la habilidad del *Bacillus thuringiensis* y sus especies relacionadas, de formar por lo menos 5 sustancias tóxicas (4).

La proteína que constituye el cristal es insoluble en agua neutra o ligeramente ácida, pero es soluble en álcalis diluidos; como el contenido intestinal de las larvas sensibles es ligeramente alcalino, los cristales se disuelven cuando llegan al intestino y la proteína disuelta ataca las sustancias que cementan y mantienen unidas las células de la pared intestinal. Como consecuencia los líquidos contenidos en éste, pueden difundir libremente a la sangre del insecto, que se hace muy alcalina; esto provoca la parálisis general de la larva y su muerte. Si la larva ingiere un espora, éste germina en el interior del intestino, la célula germinativa resultante se multiplica rápidamente, produce cristales, repitiéndose el efecto anteriormente descrito (4).

MÉTODOS Y EXPERIENCIAS

Para observar el efecto de estas bacterias sobre el "bicho del cesto" común, *Oiketicus moyanoi* Mallea et. al. (6) se realizó en 1971 un ensayo a campo. Se emplearon tres cepas: *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *alesti* y *Bacillus entomocidus* var. *subtoxicus*.

Las cepas fueron propagadas en nuestros laboratorios en un fermentador New Brunswick, en vasos conteniendo 10 litros, de medio de caldo nutritivo, con agitación de 2.500 rp/min. y 5 litros de aire

por minuto; el pH fue mantenido a 6,8. Para iniciar el cultivo se utilizó un inóculo de 250 ml. de cada una de las cepas, multiplicadas en el mismo medio por 24 hs. en un agitador rotatorio termostatzado.

El cultivo se prolongó hasta la máxima esporulación, luego de 72 horas.

La masa de células, esporos y cristales fue separada del líquido empleando una supercentrífuga continua Sharples a 40.000 rp/min.; la pasta obtenida fue secada al vacío y molida. El polvo fue mezclado con bentonita en relación 1:10 en peso.

Los tres productos preparados, que contenían diferente concentración de esporos, fueron convenientemente diluidos en el momento de su aplicación para obtener 1×10^7 esporos por ml. Esta dosis fue elegida arbitrariamente a modo tentativo por no disponer de suficiente producto para realizar un ensayo comparativo a diferentes concentraciones.

El tratamiento se efectuó sobre 6 plantas de olmo bola con un pulverizador a mochila-motor, cuando las larvas se encontraban entre el 2º y 3º estadio.

La recolección de cestos se efectuó 30 días más tarde, tomando el total de cestos de cada árbol.

Los recuentos mostraron los siguientes resultados:

Tratamiento	Planta	Nº Larvas	% Mortalidad
B. <i>thuringiensis</i>	Nº 1	136	84
var. <i>thuringiensis</i>	Nº 2	140	88
B. <i>thuringiensis</i>	Nº 1	92	100
var. <i>alesti</i>	Nº 2	408	100
B. <i>entomocidus</i>	Nº 1	226	87
var. <i>subtoxicus</i>	Nº 2	179	83

Al abrir los cestos se encontraron las larvas secas o en proceso de deshidratación avanzado; la seda que recubre interiormente el habitáculo se encontraba manchada en la parte inferior como consecuencia de diarrea.

Para comprobar el ataque bacteriano se tomaron 10 larvas de cada lote, fueron desinfectadas individualmente con solución clorhídrica de bicloruro de mercurio al 1% durante 3 minutos, lavadas 3 veces con agua destilada estéril para eliminar desinfectante y finalmente se colocó la larva en 1 ml. de agua destilada estéril y se la desintegró con ayuda de varilla de vidrio esterilizada. Cada una de las suspensiones fueron estriadas en caja de *Petri* conteniendo agar caldo nutritivo e incubadas a 30°C. por 48 hs.

Se constató en todas las muestras que el mayor porcentaje de las colonias que aparecieron eran de bacterias productoras de cristales. Estos se pusieron de manifiesto picando una pequeña porción de la colonia, haciendo una dilución y frotis, coloreándolo luego con Admidoschwartz siguiendo la técnica de SMIRNOFF (7) y observándolos con objetivo de inmersión.

Se aislaron al estado puro cada una de las cepas empleadas.

En 1972 se realizó otro ensayo similar pero abarcando mayor número de plantas; una lluvia prolongada lavó el producto que había sido aplicado pocas horas antes, haciendo fracasar la experiencia, por no contar con mayor cantidad para volver a tratar.

En 1973 se llevó a cabo otro ensayo empleando solamente dos cultivos de *B. thuringiensis* var *alesti*; el original, que había dado el mayor porcentaje de mortalidad en 1971 y la misma cepa reaislada a partir de larvas.

Los cultivos, la preparación del producto y las diluciones se realizaron en idénticas condiciones que las señaladas anteriormente.

La experiencia se hizo en el Departamento de Guaymallén, el tratamiento se efectuó cuando las larvas se encontraban entre el 3º y 4º estadio.

La pulverización se realizó en una trinchera de álamos con una distancia entre plantas de 1 m. Se trataron 7 plantas, dejando 7 sin tratar entre cada una de las repeticiones.

El ensayo I se efectuó con *B. thuringiensis* var *alesti* reaislado y la cantidad de producto sólo permitió pulverizar un lote de 7 plantas.

Del ensayo II se hicieron 4 repeticiones de 7 plantas cada una.

El testigo sin tratar se tomó a 20 m. de la última planta pulverizada. Para efectuar la pulverización se empleó una máquina de 300 litros trabajando entre 300 y 450 libras.

A los 30 días los cestos fueron sacados de la planta central de lote; recolectando todos los cestos de esa planta y cestos de diferentes ramas de las otras plantas a distintas alturas del árbol.

Los resultados fueron los siguientes:

Ensayo	Repeticiones	Nº de Cestos	% de Larvas Muertas
I	1º	250	97,6
	1º	180	97,2
II	2º	96	98,9
	3º	273	98,9
	4º	211	97,1
Testigo sin tratar		197	1,2

Los insectos muertos presentaban los mismos signos que los observados en la experiencia de 1971, es decir desecamiento de la larva y cestos manchados.

El bajo porcentaje de mortalidad observado en el testigo es debido a que, en la etapa de crecimiento de la larva en que se efectuó el tratamiento, éstas son ya muy resistentes y prácticamente todos los individuos llegan al estado adulto. En el momento de la recolección mostraban una diferencia apreciable de tamaño con respecto a las larvas tratadas que habían muerto a los pocos días de la pulverización.

Con respecto a las plantas existía también una sensible diferencia, mostrándose, las que habían recibido tratamiento, mucho menos defoliadas que la testigo y el resto de la trinchera.

Con el insecto en su estado larval totalmente desarrollado, se realizó un ensayo en condiciones de laboratorio, tendiente a verificar la acción del patógeno sobre las larvas en esta etapa y tratar de seguir sus síntomas. Para ello se prepararon 6 jaulas, colocando en el fondo de cada una 20 larvas provenientes del olmo. Todos los insectos eran del mismo tamaño y vigorosos; en cada una de las jaulas se colocaron ramas provenientes del mismo árbol sumergidas en un recipiente con agua para evitar el rápido marchitamiento. Los insectos podían ascender por la tela metálica y tener acceso a ramas y hojas, observándose que dentro de las 24 hs. estaban todos comiendo.

Seguidamente se procedió a cambiarles el alimento, los insectos fueron separados cuidadosamente y colocados nuevamente en el fondo de las jaulas; en tres de ellas se colocaron ramas previamente pulverizadas con una suspensión del cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*, sin bentonita. En las otras tres, se colocaron ramas pulverizadas con agua destilada.

Una día después, se observaron las larvas y se constató que en muchas de las tratadas con la suspensión bacteriana, aparecía junto con los excrementos, una gota oscura. Se hizo un frotis con este líquido y se lo coloreó, para detectar cristales, según la técnica de SMIRNOFF y se observó con objetivo de inmersión. Se constató la presencia de gran cantidad de cristales, esporas, células vegetativas y gotitas de grasa, lo que demuestra la rápida multiplicación de la bacteria en el tracto digestivo del insecto (Lám. I, foto 1).

Se desprendieron cuidadosamente todas las larvas, ubicándolas nuevamente en el fondo de las jaulas, con ramas frescas sin tratar a ambos lotes. Mientras la mayoría de las larvas no tratadas se movilizaban hacia la comida, las que habían ingerido la toxina permanecían inmóviles.

Se habrieron 5 cestos de cada una de las jaulas de uno y otro grupo; los insectos no tratados se encontraban en perfectas condiciones

y mostraban los movimientos violentos característicos de las larvas desprovistas de su habitáculo, siendo necesario eterizarlas para poder fotografiarlas. Las enfermas presentan un color más oscuro, algo arrugadas y con dificultades en la locomoción, a su vez la seda del cesto aparece manchada por la diarrea (Lámina I, foto 2).

Abrir las larvas y separar el intestino, perfectamente factible en los insectos sanos, resulta imposible en larvas enfermas; éste se encuentra disgregado por sectores, pudiéndose sacar solamente porciones muy pequeñas del mismo.

A las 72 hs., existía ya una gran diferencia entre las larvas de ambos grupos (Lám. I, foto 3), estando las enfermas muy arrugadas, oscuras y con la cavidad abdominal llena de líquido espeso, no pudiéndose encontrar vestigios del intestino.

Del líquido abdominal, fue posible reaislar la bacteria entomógena empleada.

COMENTARIOS

Por ser muy escaso el producto por nosotros preparado, no hemos podido realizar un ensayo estadístico con el mismo; en el año 1974 se ha programado una experiencia de nuestra formulación, comparada con productos comerciales en base a *Bacillus thuringiensis* var. *thurin-giensis*, para constatar si a igualdad de dosis, existe equivalencia de efectividad.

Otro aspecto que consideramos necesario investigar, es la acción de esporos y cristales por separado, para verificar el poder patogénico de cada una de estas inclusiones bacterianas.

CONCLUSION

Del análisis de las experiencias a campo y laboratorio, resulta evidente la capacidad de las bacterias productoras de cristales, especialmente *Bacillus thuringiensis* var. *alesti* para producir septicemia y muerte en larvas del "bicho del cesto" común. Esta acción, quedó demostrada mediante el cumplimiento de los postulados de KOCH aplicados en los ensayos de 1971-1973.

RESUMEN

Durante los años 1971-1974, se ha ensayado un método de lucha biológica contra el "bicho del cesto" común, *Oiketicus moyanoi* MALLEA et al. Este ha consistido en la aplicación a campo y en condiciones de laboratorio, de bacterias entomógenas productoras de

LAMINA I

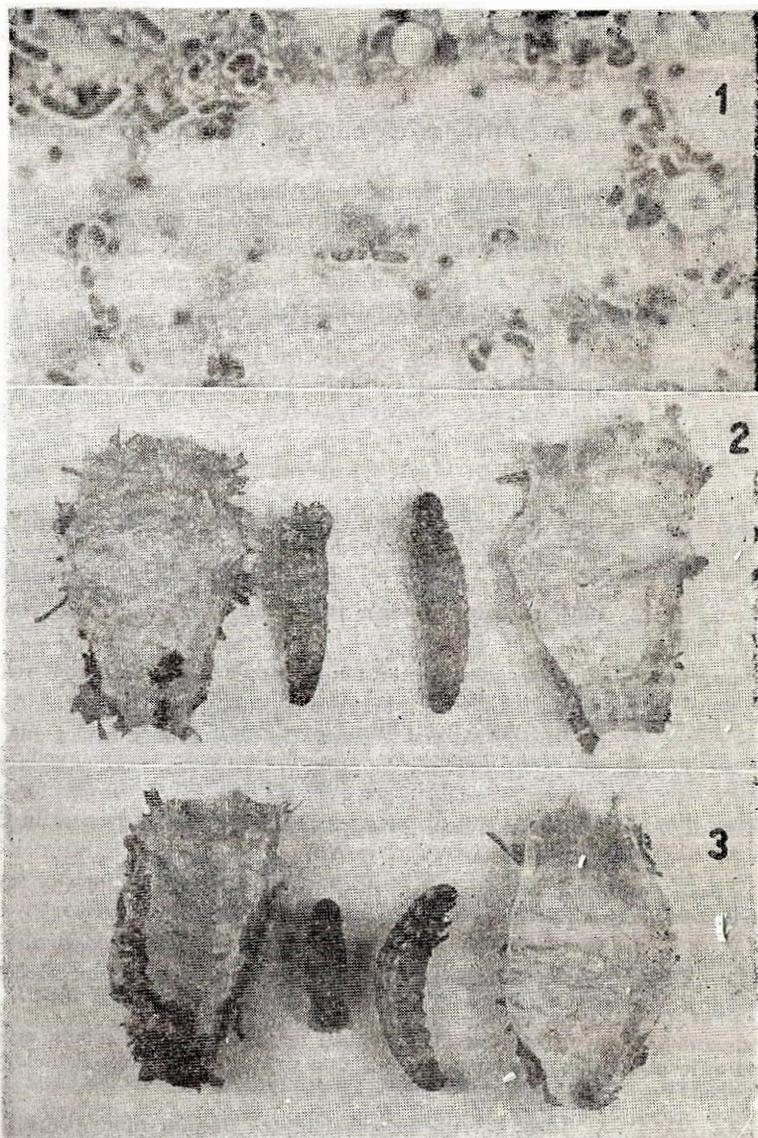


Foto 1: Preparado microscópico de líquido intestinal de bicho del cesto atacado por la bacteria. Se observan cristales sueltos, células esporuladas y gotitas de grasa.

Foto 2: Izquierda, larva después de 24 hs. de haber ingerido *B. thuringiensis*, cesto manchado por diarrea; derecha, larva sana.

Foto 3: Idem después de 72 hs.

oristales, del género *Bacillus*. Se utilizaron *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *alesti* y *Bacillus entomocidus* var. *subtoxicus*.

Las cepas fueron cultivadas en nuestros laboratorios y aplicadas en pulverizaciones.

Los resultados obtenidos, permiten vislumbrar excelentes posibilidades para el control de esta plaga, evitando la aplicación de insecticidas químicos y los problemas que ellos traen aparejados.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Profesor Dr. Norberto J. Palleroni y al señor Raúl López la valiosa colaboración para la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1 ANGUS, T. A., 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature*, 173, 545.
- 2 ANGUS, T. A., 1956. General characteristics of certain insect pathogens related to *B. cereus*. *Can. J. Microbiol.*, 2, 111-121.
- 3 BONNEFOIS, A., BURGERJON, A. and GRISON, P., 1958. Titrage biologique des preparations de spores de *Bacillus thuringiensis* BERLINER. *Compt. rend.*, 247, 1418-1420.
- 4 HEIMPEL, A. M., 1963. The status of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Chemistry* 41, 64-74.
- 5 — — —, 1967. A taxonomic key proposed for the species of the "Crystalliferous Bacteria". *Journal of Invertebrate Pathology* 9, 364-375.
- 6 MALLEA, A. R., G. S. MÁCOLA, G. G. GARCÍA S., L. A. BAHAMONDES y J. H. SUÁREZ, 1972. Posición sistemática del "bicho del cesto" común, en Mendoza, *Oiketicus moyanoi* n.s.p., *Rev. Fac. Cien. Agr.*, t. XVIII (1): 61-67.
- 7 SMIRNOFF, W. A., 1962. A staining method for differentiating spores, crystals and cels of *Bacillus thuringiensis* (BERLINER). *Journal of Insect Pathology* 4, 384-386.
- 8 STEINBAUS, E. A., 1959. On the improbability of *Bacillus thuringiensis* BERLINER. Mutating to forms pathogenic for vertebrates. *Journal Econ. Ent.* 52, 506-508.