

CRIA ARTIFICIAL DE *Galleria melonella* Y SU EMPLEO EN LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA DE SUSPENSIONES DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

E. A. Arrarás, J. A. Arcas, O. M. Yantorno (1)

Recibido: 15/2/85

Aceptado: 25/6/86

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es ampliamente utilizado dentro de los esquemas de lucha biológica para el control de plagas de Lepidópteros en agricultura. La evaluación de productos comerciales a base del mismo, así como de suspensiones obtenidas en laboratorio, se debe realizar mediante un bioensayo.

En el presente trabajo se dan condiciones para la cría y ensayos biológicos con *Galleria mellonella*, lepidóptero sensible a la cepa empleada. La metodología presentada permite llevar a cabo las determinaciones mediante un método sencillo y reproducible. Para las condiciones empleadas se obtiene una concentración letal $50 (CL_{50}) = 2,27 \times 10^8$ esporos/g de alimento.

ARTIFICIAL BREEDING OF *Galleria melonella* AND ITS APPLICATION IN THE DETERMINATION OF BIOINSECTICIDAL ACTIVITY OF SUSPENSIONS OF *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

SUMMARY

Spore-crystal preparations of *Bacillus thuringiensis* are widely used in the control of lepidoptera in Agriculture. The evaluation of commercial products as well as the preparations obtained in our laboratory were done by means of bioassays in order to know the insecticidal activity of such preparations.

This paper gives details concerning the breeding and biological tests using *Galleria mellonella* which is a susceptible lepidopterus to the strain used.

The methodology used is simple and reliable. The lethal concentration (LC_{50}) obtained under the conditions employed was, $2,27 \times 10^8$ spores/g of the artificial diet.

INTRODUCCION

Es bien conocido que *Bacillus thuringiensis* produce durante su crecimiento un cristal proteínico intracelular, delta-endotoxina, el cual es tóxico para una amplia variedad de larvas de Lepidópteros (Angus, 1968; Pendleton, 1969; Sneh *et al.*, 1981).

Cuando una larva ingiere esta toxina, la misma es disuelta en el jugo intestinal y co-

mo resultado le produce síntomas patológicos. Dependiendo de la especie de insecto y de la dosis ingerida, la respuesta tóxica puede variar desde una cesación temporaria de la alimentación hasta una completa parálisis y muerte (Sneh *et al.*, 1981).

Usualmente un solo cristal es producido por célula durante la esporulación. La formación de esta delta-endotoxina y su actividad larvicida, pueden variar no solamente entre

(1) CINDEFI (CONICET, CIC, UNLP), 47 y 115, Facultad de Ciencias Exactas. 1900 - La Plata.

diferentes cepas, sino también con el tipo de medio de cultivo y con las condiciones de operación durante la obtención del bacilo (Dulmage, 1971).

Si bien la bibliografía especializada presta especial atención a las propiedades y características particulares del cristal, en los últimos años se han identificado algunas variantes de *Bacillus thuringiensis* con capacidad de producir exotoxinas. Los estudios de toxicidad efectuados con éstas sobre distintas especies de insectos, han puesto de manifiesto que las exotoxinas pueden ser empleadas con éxito en el control de la mosca común (*Musca domestica*) (Zamola *et al*, 1983).

La producción de microorganismos como agentes de control biológico es menos sofisticada que la de los agentes químicos, esto junto a su selectividad y bajo desarrollo de resistencia por insectos ha contribuido a impulsar su obtención a escala industrial (Arcas *et al*, 1984; Goldberg *et al*, 1980; Obeta *et al*, 1984; Dubois, 1968).

La evaluación de los productos comerciales como la de los caldos fermentados se debe realizar mediante ensayos biológicos, ya que como ha sido demostrado en trabajos previos, la determinación de la concentración de esporos no es en todos los casos un parámetro adecuado (Dulmage, 1970).

En el presente trabajo se dan condiciones para llevar a cabo la cría y ensayos biológicos con *Galleria mellonella*. Este lepidóptero, sensible a *Bacillus thuringiensis* (Burgerjon *et al*, 1967; Rogoff *et al*, 1969), presenta la ventaja de su fácil adaptación a una cría en laboratorio con dieta artificial (Dutky *et al*, 1962). Este trabajo tiene además como objetivo presentar un ensayo biológico accesible, empleando un lepidóptero de fácil manejo en relación a *Trichopusia-ni*.

MATERIALES Y METODOS

Organismo y condiciones de cultivo

Para la realización del presente trabajo se empleó una cepa de *Bacillus thuringiensis* va-

riedad kurstaki (HD-1) gentilmente cedida por el Northern Regional Research Laboratory (Peoria, Illinois). La obtención de las suspensiones esporo-cristal para su posterior utilización en la realización de ensayos biológicos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología empleada por Arcas *et al* (1984) en un trabajo previo, con un medio de cultivo compuesto por glucosa, extracto de levadura y sales.

El recuento de esporos viables se realizó por unidades formadoras de colonias, después del tratamiento térmico de las muestras a 60° C durante 10 minutos.

Cría de larvas

Para la iniciación de la cría, se obtienen larvas de panales de abejas infectadas naturalmente por *Galleria mellonella* (en el presente estudio los panales provenían de apiarios de la localidad de Venado Tuerto, Provincia de Santa Fe). Estos panales se mantienen a 30° C hasta la aparición de mariposas, a partir de las cuales previo apareamiento, se obtienen huevos. El procedimiento empleado para la cría es una modificación del propuesto por Dutky *et al* (1962). Se colocan de 10 a 12 mg de huevos próximos a eclosionar (300 huevos) en un frasco de cría de aproximadamente 1.500 cm³ con tapa ancha, preferentemente metálica, con 20 a 30 perforaciones de 4 mm de diámetro, y cubierta con una malla de alambre y papel de filtro, de modo tal de lograr un cierre adecuado para evitar el escape de larvas recién nacidas.

Sobre los huevos se coloca el alimento, constituido por (g): miel pura 75, glicerol 31, H₂O 25, extracto de levadura 3 y Nestum (3 cereales) 125. Estos elementos deben mezclarse en la siguiente secuencia: mezclar la miel, el glicerol y el agua en un baño a 50°C; enfriar a 40° C y agregar el extracto de levadura; esparcir el líquido sobre una bandeja con el Nestum y proceder al amasado hasta lograr una consistencia firme, darle forma del frasco y depositar la masa sobre los huevos. Este medio provee el alimento necesario

para cubrir el período desde la eclosión hasta la formación de la pupa sin necesidad de agregados. El frasco es incubado a 30° C en completa oscuridad. Aproximadamente a la semana se inicia la eclosión de los huevos. A los 20 días se debe sacar el papel de filtro de la tapa. A los 40 días, las larvas comienzan a tejer sus capullos. A los 50 días comienza el empupamiento y a los 70 a 80 días hay plena aparición de mariposas dentro del frasco.

Una vez que aparecen las mariposas se hace pasar una corriente de CO₂ hasta lograr el total adormecimiento de las mismas. Luego se destapa el frasco, se lo invierte y se recolectan las mariposas. Estas son colocadas en número de 10 a 12 (cuidando que existan ambos sexos) para su apareamiento en cajas de material plástico de 15 x 10 x 5 cm. En la tapa se coloca un papel parafinado plegado pegado con cinta adhesiva.

Las cajas de apareamiento se incuban a 30° C en oscuridad (sin alimento) por espacio de 5 a 7 días, al cabo del cual ha ocurrido una completa oviposición sobre el papel. Se retiran luego los huevos y se los limpia superficialmente con una corriente de aire (o bien por inmersión durante 1 minuto en agua lavandina al 5% y lavado en agua corriente durante 20 minutos).

Es conveniente la desinfección permanente de todo el material para prevenir fundamentalmente infecciones fúngicas.

Cría de larvas para bioensayos

Se utilizan los mismos frascos que para la cría, o bien cajas de Petri grandes. Se colocan 30 mg de huevos (aproximadamente 1.000 huevos), y sobre estos una fina capa de alimento, constituido por (g): miel pura 15, glicerol 6,3, H₂O 5 y Nestum 25, preparado en el orden mencionado anteriormente. Los frascos o las cajas son colocados en cuarto estufa a 30° C, y al cabo de 25 días (15 a 18 días a partir de la eclosión) se obtienen larvas de aproximadamente 8 a 10 mm de longitud, apropiadas para la realización del bioensayo).

Bioensayos

Para su realización se toman cajas de Petri, en número adecuado según la cantidad de tratamientos y repeticiones necesarias, que dependerán del diseño experimental a emplear.

En cada caja se coloca una masa constituida por (g): sacarosa 1,75, H₂O 1,75, glicerol 2,10 y Nestum 4,40. Se depositan luego entre 10 y 12 larvas de las obtenidas en el punto anterior, constituyéndose esta caja en la unidad experimental. Las suspensiones que se deseen testear deben ser agregadas en el H₂O o bien sustituir a ésta en las proporciones adecuadas para no alterar la consistencia de la masa.

Las cajas se llevan a estufa, y diariamente se realizan recuentos de larvas muertas (es conveniente retirarlas porque de lo contrario son ingeridas por el resto de las larvas) o también se puede realizar mediciones de peso. Estos datos son sometidos al análisis de la variancia (Gómez, 1978) o en la determinación de dosis letales mediante la regresión lineal (Dagnelie, 1975).

RESULTADOS

En el Cuadro Nº 1 y Figura 1 se muestra la variación del % de mortandad y Probits en función de la concentración de esporos en la dieta empleada.

Concentración (esporos/g de alimento)	Long. Conc.	% de Mortandad	Probits
4 x 10 ⁷	7,60	19	4,12
23 x 10 ⁷	8,36	52	5,05
42 x 10 ⁷	8,62	58	5,20
61 x 10 ⁷	8,78	64	5,36
80 x 10 ⁷	8,90	80	5,84

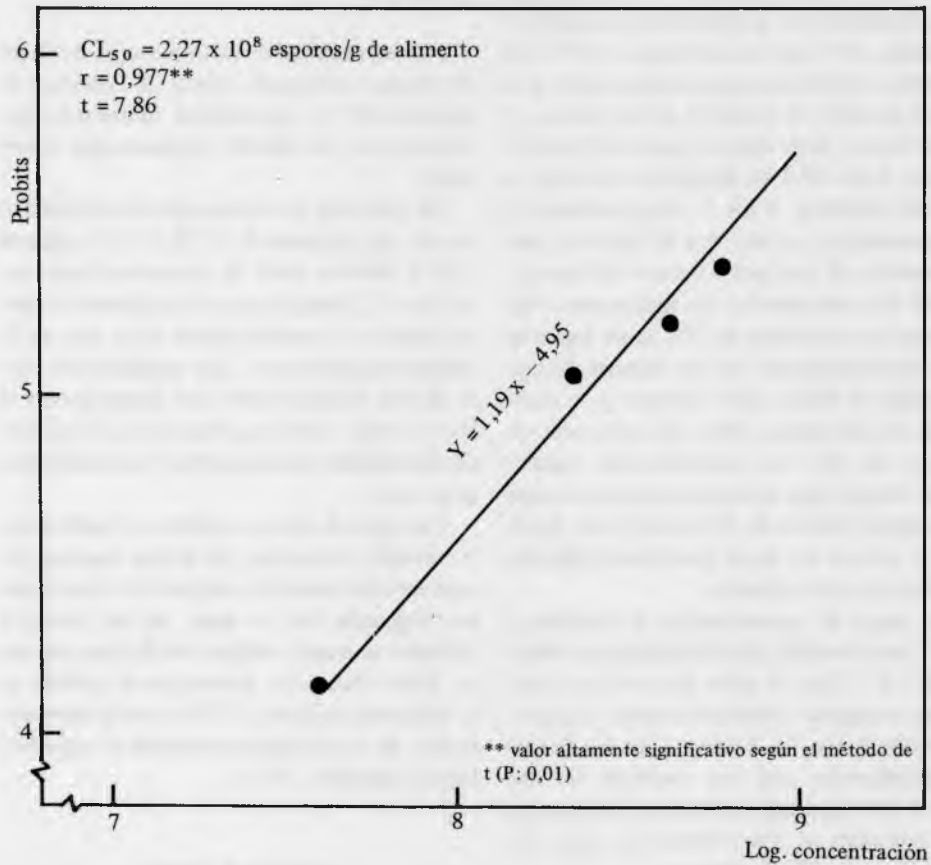


Figura 1: Probits versus Logaritmo de la concentración de esporos en la dieta empleada.

En la Figura 2 se aprecia la variación en el tiempo del % de mortandad para tres formulaciones diferentes. Se ve que las curvas obtenidas son similares con los 3 productos empleados.

DISCUSION

La determinación de la actividad larvívora de *Bacillus thuringiensis* puede ser estimada de datos de esporulación y de la presencia o ausencia de delta-endotoxina. Sin embargo, como ya ha sido mencionado (Dulmage, 1970) el parámetro más adecuado para la evaluación de la actividad es el bioensayo. Los métodos citados en bibliografía (Rogoff

et al, 1969; Schesser *et al*, 1977) se remiten en general a procedimientos experimentales de los mismos, sin especificar condiciones de cría de larvas, que permitan mantener a las mismas en el laboratorio, para su posterior empleo.

El procedimiento de cría reseñado presenta ventajas importantes, ya que requiere muy poca mano de obra, se lleva a cabo en recintos oscuros sin necesidad de fotoperíodo, y a temperatura constante sin variaciones en la amplitud térmica. Además el período comprendido entre la eclosión de los huevos y la aparición de mariposas, transcurre en un único recipiente, sin necesidad de realimentación, lo que reduce a un mínimo los

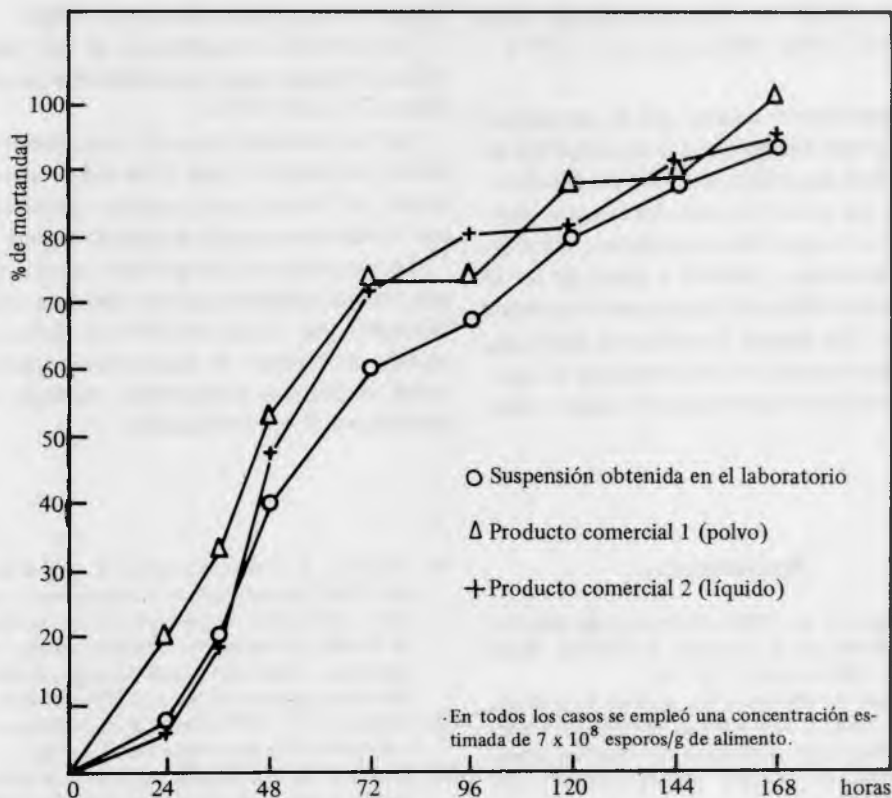


Figura 2: Variación del porcentaje de mortandad en función del tiempo, de larvas de *Galleria mellonella* con tres suspensiones de esporo-cristal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

elementos necesarios y la atención requerida. Estas condiciones lo hacen propicio para test biológicos de suspensiones de *Bacillus thuringiensis* y otros ensayos.

Es de destacar que es posible mantener sin inconveniente, hasta aproximadamente 7 generaciones de *Galleria mellonella*, a partir de la cual comienza un decrecimiento de la fecundidad, manifestada a través de una menor oviposición, disminución en el porcentaje de huevos eclosionados y retardo en el apareamiento y oviposición de las mariposas. Una forma de subsanar este inconveniente es renovar la población en primavera, época en la cual es fácil obtener panales de abejas atacados por este lepidóptero. Es conveniente hacer en esos casos una nueva determinación de la concentración letal 50 (CL_{50}) ya que pueden surgir diferencias con la nueva población.

La técnica empleada en los bioensayos en este trabajo puede ser fácilmente utilizada en la comparación del poder insecticida de suspensiones esporo-cristal de *Bacillus thuringiensis*, tal como muestra la Figura 2. También se puede emplear para cuantificar el poder larvicida de una suspensión esporo-cristal de *Bacillus thuringiensis* (Cuadro Nº 1, Figura 1). Se aprecia de los resultados obtenidos, que la actividad tóxica de la cepa (para los medios empleados) está asociada con los niveles de esporulación alcanzados.

Cuando se grafica Probits vs. log concentración (Figura 1) se obtiene una $CL_{50} = 2,27 \times 10^8$ esporos/g de alimento, valor altamente reproducible en las condiciones empleadas. El coeficiente de regresión obtenido es $r = 0,977$, valor altamente significativo al 0,01 de probabilidad, según el método de t ($t = 7,86^{**}$). La ecuación de regresión calcu-

lada de Probits vs. log concentración para larvas de *Galleria mellonella* es $Y = 1,19 x - 4,95$.

Es importante señalar que la mortandad de las larvas expuestas a las suspensiones esporo-cristal no refleja todos los modos de actividad. En todos los casos las larvas sobrevivientes no crecen ni se alimentan, estos hechos comienzan a notarse a partir de las 24 a 48 horas incluso en las que posteriormente mueren. Una manera de evaluar la inhibición de la alimentación, es determinando el tamaño o peso de las larvas sobrevivientes en rela-

ción al de los testigos (Sneh *et al*, 1981).

Los niveles de mortandad de los tratamientos testigos para las condiciones presentadas, no superó el 5%.

Se han realizado ensayos con medio de cultivo obtenido al final de la etapa fermentativa (48 horas) que permiten corroborar que el mismo no aporta sustancias activas.

La metodología desarrollada en este trabajo permite poder mantener larvas en el laboratorio por largos períodos de tiempo y realizar bioensayos de suspensiones esporo-cristal de *Bacillus thuringiensis*, mediante un método sencillo y reproducible.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Angus, T. A., 1968. The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticida. *World Rev. Pest. Control* 7: 11-26.
- 2) Arcas, J.; Yantorno, O.; Arrarás, E. y Ertola, R., 1984. A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotech. Letters* 6 (8): 495-500.
- 3) Burgerjon, A. et Biache, G., 1967. Contribution a l'étude du spectre d'activité de différentes souches de *Bacillus thuringiensis*. *Ent. Exp. Appl.* 10: 211-230.
- 4) Dagnelie, P., 1975. Analyse statistique a plusieurs variables. Ed. Les Press Agronomiques de Genbeaux A. S. L. B. 363.
- 5) Dubois, M. R., 1968. Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Applied microbiol.* 16 (7): 1098-1099.
- 6) Dulmage, H. T., 1970. Production of the spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invert. Pathol.* 16: 385-389.
- 7) Dulmage, H. T., 1971. Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. *J. Invert. Pathol.* 18: 353-358.
- 8) Dutky, S. R.; Thompson, J. V. and Cantwell, G. E., 1962. A technique for mass rearing the greater wax moth (Lepidoptera: Galleriidae) *Proc. Ent. Soc. WASH.* 64 (1): 56-58.
- 9) Goldberg, I.; Sneh, B.; Battat, E. and Klein, D., 1980. Optimization of medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. *Biotech. Letters*, 2 (10) 419-426.
- 10) Gomes, F. P., 1978. Curso de estadística experimental. Ed. Hemisferio Sur S. A. 324.
- 11) Obeta, J. A. N.; Okafor, N., 1984. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* substp. *israelensis*. *Applied and Env. Microbiol.* 47 (4): 863-867.
- 12) Pendleton, I. R., 1969. Insecticides of crystal-forming bacteria. *Process Biochem.* 4(12): 29-32.
- 13) Rogoff, M. H.; Ignoffo, C. M.; Singer, S.; Gard, I. and Prieto, A. P., 1969. Insecticidal activity of thirty-one strains of *Bacillus* against five insect species. *J. Invert. Pathol.* 14(2): 122-129.
- 14) Schesser, J. H.; Kramer, K. J. and Bulla, Jr. L. A., 1977. Bioassay for homogeneous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* using the Tobacco-Hornworm, *Manduca sexta*. *Applied and Env. Microbiol.* 33(4): 878-880.
- 15) Sneh, B.; Schuster, S.; Broza, M., 1981. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (lep. Noctuidae). *Entomophaga* 26(2): 179-190.
- 16) Zamola, B.; Valles, P.; Sarić, A.; Kubović, M.; Sidor, C. and Miccoli, P., 1983. *Bacillus thuringiensis* - an Insecticidal Micro-organism with perspective. *Process Biochem* 18:5-9.