



Fitosanidad

ISSN: 1562-3009

nhernandez@inisav.cu

Instituto de Investigaciones de Sanidad

Vegetal

Cuba

Fernández-Larrea, Orietta; Díaz, A.

Evaluación de fuentes nutricionales alternativas para la reproducción masiva de la cepa LBT-3 de
Bacillus thuringiensis variedad kurstaki

Fitosanidad, vol. 4, núm. 3-4, septiembre-diciembre, 2000, pp. 77-80

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209118243016>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

EVALUACIÓN DE FUENTES NUTRICIONALES ALTERNATIVAS PARA LA REPRODUCCIÓN MASIVA DE LA CEPA LBT-3 DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VARIEDAD KURSTAKI

Orietta Fernández-Larrea y A. Díaz

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F,
Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

RESUMEN

Se determinó la concentración de esporas y cristales/mL obtenidas después de 48 horas de cultivo agitado en zaranda a 28-30° C de la cepa LBT-3 de *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki en 13 medios de cultivos de diferente composición. Los nutrientes ensayados fueron: almidón de maíz, levadura panadera, jugo de pepino, harina de maíz, harina de soya, melaza de caña, mosto de cervecería, fosfato dibásico de amonio, carbonato de calcio y sulfato de potasio, los cuales se utilizaron a diferentes concentraciones y combinaciones. La concentración de esporas y cristales/mL osciló entre $6,5 \times 10^6$ y $6,6 \times 10^9$. El medio compuesto por 35 g/L de levadura torula, 5 g/L de almidón, 2 g/L de fosfato de amonio y 0,1 g/L de sulfato de potasio resultó el mejor. Los bioensayos con larvas del III instar de *Plutella xylostella* demostraron que cuando se utilizaron concentraciones de 10^8 esporas/mL, el porcentaje de mortalidad fue de 100 a las 72 horas para las cuatro variantes de medio de cultivo con las cuales se obtuvieron las concentraciones de esporas y cristales más elevadas.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, reproducción, medios de cultivo

ABSTRACT

Concentration of spores and crystals/mL obtained after 48 hours of culture agitated in zaranda at 28-30 of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki LBT-3 strain in 13 culture medium of different composition. Nutrient tested were: starch of corn, yeast baker, cucumber juice, flour of corn, soy flour, cane molasses, brewery must, dibasic ammonium phosphate, calcium carbonate and potassium sulfate, which were used to different concentrations and combinations. The concentration of spores and crystals/mL oscillated between $6,5 \times 10^6$ and $6,6 \times 10^9$. The medium composed by 35 g/L of torula yeast, 5 g/L of starch, 2g/L of ammonium phosphate and 0,1 g/L of potassium sulfate were the best. Bioassays with III instar larvae of *Plutella xylostella* demonstrated that when concentrations of 10^8 spores/mL were used the mortality percentage was 100 at 72 hours for the four variants of culture medium with which the higher concentrations of spores and crystals were obtained.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, reproduction, culture medium

INTRODUCCIÓN

La producción de un bioplaguicida a partir de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) requiere de un medio de cultivo que, además de permitir un buen rendimiento de esporas y cristales tóxicos, resulte de fácil adquisición y económico [Bernhard y Utz 1993, Ibarra 1997]. Para lograr esto se reporta el uso de varias fuentes naturales que proveen el nitrógeno y el carbono necesario, así como las sales y otros elementos. Ejemplos de estas fuentes son las harinas de soya, maíz, pescado, lejor del remojo del maíz, melazas, sacarosa, levaduras y diversos tipos de almidones [Vanderkar y Dulmage, 1983; Devisetty, 1993; Morris *et al.*, 1996, 1997].

Aun cuando se ha planteado por diversos autores que para cada cepa de *Bt* debe diseñarse un medio de cultivo específico [Dulmage y Rodees, 1971; Muga, 1983; Galán, 1996], también se conoce que algunas fuentes resultan eficaces para la reproducción de diferentes cepas de *Bt* [Bernhard y Utz, 1993; Morris *et al.*, 1995]

Con la finalidad de valorar la posibilidad de utilizar diferentes fuentes nutritivas naturales de fácil adquisición, se diseñaron y evaluaron 13 medios de cultivo a partir de ocho productos naturales diferentes y tres sales inorgánicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa: Fue empleada la cepa LBT-3 de *Bt* variedad kurstaki, perteneciente al cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), la cual fue mantenida en cuñas con agar nutritivo en forma de cultivos espolillados a 4° C durante el transcurso de los experimentos.

Condiciones de cultivo: Los cultivos fueron realizados utilizando frascos erlenmeyers de 500mL de capacidad, a los cuales se añadieron 100mL de los diferentes medios de cultivo ensayados. Se cultivaron en condiciones de agitación después de inoculados con 1 mL de una sus-

pensión de 10^8 esporas por mL obtenidas por el arrastre de un cultivo esporulado con solución salina estéril de NaCl al 0,85%. La agitación se llevó a cabo durante 48 horas a 28-30° C y 140 rpm en una zaranda orbital termostatada,

Los medios ensayados (*Tabla 1*) fueron esterilizados a 121° C durante 40 minutos, con excepción del que contenía jugo de pepino, que se esterilizó durante 20 minutos a igual temperatura. En todos los medios el valor del pH inicial se ajustó a 6,8.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo ensayados

Nutriente	Medios												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Almidón	20	10			3			5	2,5	10			
Levadura torula			30	30	35	20		35	5	15	35	5	5
Levadura panadera							10		2,5	5		2,5	2,5
Jugo de pepino	200	200											
Harina de maíz			15	25									
Harina de soya				5				3			5		
Melaza caña						10	20					2,5	10
Mosto cerveza						10							
$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$					2	2	2	2			2		
CaCO_3	0,3		3	3		0,3				0,3			
K_2SO_4						1		1	1			1	

Análisis de las muestras: Los análisis se realizaron en los cultivos de 48 horas, en los cuales se determinó la concentración de esporas y cristales por mililitro, mediante conteo en Cámara de Neubauer bajo un microscopio de contraste de fase a 400 x aumento. Las características de los cultivos y la verificación de la presencia de esporas y cristales se determinó mediante observación al microscopio a 1 000 x de una preparación teñida con solución de cristal violeta al 0,5%.

Bioensayos: Se emplearon larvas del III instar de *Plutella xylostella*. El alimento consistió en hojas de col impregnadas con una solución acuosa que contenía 10^8 esporas y cristales/mL, obtenida a partir del cultivo de las cuatro mejores variantes de los medios ensayadas. El conteo de larvas muertas se realizó a las 24, 48 y 72 horas de montado el bioensayo. Se montaron tres réplicas por variante con 10 insectos cada una; se mantuvo un testigo en el cual el alimento se impregnó sólo con agua. Fue determinado el porcentaje de mortalidad por la fórmula de Abbott.

Ánalisis estadísticos: Los valores de las concentraciones de esporas y cristales obtenidos fueron transformados a valores logarítmicos, y las medias calculadas se sometieron a un análisis de varianza simple y comparación de las medias por la prueba de Duncan con un 95% de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un criterio importante para la producción de *Bt* es la cantidad de endotoxina o cristal tóxico que se produce y su actividad; esta producción se encuentra asocia-

da a la fase de esporulación durante el desarrollo de esta especie bacteriana, por lo cual la determinación de la concentración de esporas y cristales puede resultar un criterio útil para la evaluación y selección primaria de un medio de producción para *Bt* [Bernhard y Utz, 1993].

En la *Tabla 2* se muestran los valores de las concentraciones obtenidas en las diferentes variantes de medios de cultivo ensayadas. Los valores más elevados corresponden con las variantes 5, 11, 6 y 3, en las cuales coincide que la fuente de nitrógeno es la levadura torula a concentraciones entre 20-35 g/L, y en estos mismos medios la fuente de carbono resultó baja en las variantes 3 y 11, a diferencia de los medios 5 y 6, en los cuales se empleó más de una fuente de carbono.

La presencia de sales que pudieran actuar como tampon no se encontraban en las mejores variantes, lo cual indica que los nutrientes utilizados pueden suministrar las sales necesarias para el buen desarrollo de la cepa empleada.

Los resultados del bioensayo (*Tabla 3*) demostraron que los cultivos obtenidos con las cuatro mejores variantes de medios producían ciento por ciento de mortalidad a las 72 horas en *Plutella xylostella* cuando se emplearon concentraciones de 10^8 esporas/mL. Este resultado confirma la validez de los medios seleccionados, ya que Dulmage (1970) alertó que no necesariamente una elevada concentración de biomasa de *Bt* compuesta por esporas y toxinas, tiene que coincidir con una elevada actividad insecticida, y que en todos los casos esta debe ser comprobada mediante bioensayos, aun cuando resulte válido utilizar el criterio de concentración para la selección de un medio en una primera etapa de trabajo.

Evaluación de fuentes nutricionales...

Tabla 2. Concentraciones de esporas y cristales en los diferentes medios de cultivo ensayados

Medio	Concentración esporas y cristales /mL
5	6,4 x 10 ⁹ a
11	5,8 x 10 ⁹ a
6	4,4 x 10 ⁹ ab
3	3,75 x 10 ⁹ abc
10	2,7 x 10 ⁹ bc
4	2,3 x 10 ⁹ c
9	1,3 x 10 ⁹ cd
7	6,68 x 10 ⁸ d
12	5,6 x 10 ⁸ d
8	5,22 x 10 ⁸ d
1	4,46 x 10 ⁸ d
13	4,04 x 10 ⁸ d
2	6,46 x 10 ⁸ e
	CV 12%
	ES 0,18

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de *Plutella xylostella* con los cultivos de *Bt* de las cuatro mejores variantes

Variante (medio)	Por ciento de mortalidad 24h	Por ciento de mortalidad 48h	Por ciento de mortalidad 72h
5	40	80	100
11	35	80	100
6	30	70	100

Los resultados obtenidos concuerdan con otros autores, los cuales indican que la fuente de nitrógeno resulta esencial para una buena producción de esporas y cristales, y reportan concentraciones de 10-40 g/L en medios industriales [Vanderkar y Dulmage 1983; Devesitty, 1993; Bernhard y Utz, 1993; Ibarra, 1997; Morris, 1997].

Estos mismos autores coinciden en que las harinas de soya, maíz, semilla de algodón y otros granos resultan las mejores fuentes de nitrógeno para la producción de *Bt*, aunque también han utilizado algunos tipos de levaduras, de las cuales se considera que la mejor resulta la levadura panadera [Ejiofar y Okater, 1989; Yoon *et al.*, 1987]. Por su parte, Salama *et al.* (1983) obtuvieron concentraciones más elevadas de esporas y cristales cuando emplearon levadura forrajera, mientras que otros consideran que la adición de extracto de levadura en los medios de producción de *Bt* incrementan los rendimientos de esporas y cristales [Vanderkar y Dulmage, 1983; Goldberg *et al.*, 1980; Xie *et al.*, 1990].

Las sales minerales tales como fosfatos, sulfatos y carbonatos se utilizan frecuentemente en los medios de producción de *Bt*; en el caso de los fosfatos se considera importante su efecto tampón para mantener el equilibrio del pH [Devesitty 1993]. Se reporta también la importancia del calcio y el manganeso para la esporulación de *Bt* [Bernhard y Utz 1993; Foda *et al.*, 1995].

En relación con los carbohidratos, tanto los monosacáridos como la glucosa, los di y polisacáridos como los almidones y sacarosa, y las fuentes combinadas como las melazas, han sido muy utilizados en estas producciones, pero en todos los casos si la concentración resulta elevada puede conducir a una brusca disminución de los valores del pH con la consiguiente inhibición del crecimiento y esporulación [Vanderkar y Dulmage, 1983; Foda *et al.*, 1995; Galán *et al.*, 1996]. Otros efectos tales como alargamiento del cristal fueron observados por Sherer *et al.* (1980) cuando la concentración de carbohidratos se incrementó de 0,1 a 0,6 %. Por su par-

te, Carreras *et al.* (1998) encontraron que concentraciones superiores a 15 g/L de carbohidratos inducían lisis por fago en una cepa lisogénica de *Bt*, lo cual no ocurría a concentraciones de 10 g/L.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos nos permiten considerar la posibilidad de utilizar fuentes nutritivas naturales alternativas de fácil adquisición y económicas para la producción industrial de *Bt*.
- Las mejores fuentes resultaron la levadura forrajera, la harina de soya y el almidón para la producción de la cepa LBT-3 de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*.

REFERENCIAS

- Bernhard K.; R. Utz: «Production of *B. thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses in *Bacillus thuringiensis* an Environmental Biopesticides», *Theory and Practice*, Ed. Enswistle, 1993, pp. 75-83.
- Carreras, B.; O. Fernández-Larrea; M. Stefanova: «Influencia de la fuente de carbohidratos en la expresión de lisis por fago de *B. thuringiensis*», *Rev. Prot. Vegetal* 13 no. 3, 1998, pp. 137-142.
- Divesity, B. N.: «Production and Formulation Aspects of *Bacillus thuringiensis*», Proceeding of the 2nd Camberra Meeting of *B. thuringiensis*, Sep./93, pp. 95-101.
- Dulmage, H. T.; R. A. Rhodes: «Production of Entomopathogens in Artificial Media», *Microbial Control of Insects and Mites*, Ed. Burgess and Hussey, Acad. Press, London, 1971, pp. 507-538.
- Ejiofor A; N. Oaker: «Production of Mosquitoes Larvicidal *B. thuringiensis* Serotypes H14 on Raw Material Media from Nigeria», *J. Applied Bacteriol* 67(1) 5-10,1989.
- Foda, M. S.; H. Salama; A. Seleen: «Factors Affecting Growth Physiology of *B. thuringiensis*», *Eur. Journal Microbiol. And Biotechnol.* 22:50-52, 1995.
- Galán, L. J.; J. A. García; M. E. Santa; I. Quintero: «Producción de *Bacillus thuringiensis*», *Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis**, Ed. Galán-Rodríguez-Olvera, Universidad Nuevo León, México, 1996, pp. 139-155.
- Goldberg, I.; B. Sneh; E. Battat; D. Klein: «Optimization of Medium for High Yields Production of Spores-Crystal Preparation of *B. thuringiensis* Effective Against the Egyptian Cotton Leaf Worm *Spodoptera littoralis*», *Biotechnol. Letters* 2:419-426, 1980.
- Ibarra, J.: «Producción, control de calidad y uso de *B. thuringiensis*», *Memorias II-Curso-Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Microbiano*, Tecomán, México 9-11 abril 1997, pp. 75-86.
- Morris, O. N.; P. Kanagaratman; V. Converse: «Effect of Cultural Conditions on Spores-Crystal Yields and Toxicity of *B. thuringiensis*», *Journal of Inv. Pathology* 77:129-136, 1996.
- Morris O. N.; P. Kanagaratman; V. Converse: «Suitability of 30 Agricultural Products and By-Products as Nutrient Source for Laboratory Production of *B. thuringiensis* Subsp Alzawai», *Journal of Inv. Pathology* 70: 113-120, 1997.
- Muga, G. M.: «Toxicidad de *B. thuringiensis* GM-2 en diferentes medios de cultivo», Tesis Fac. Ciencias Biológicas UANL, Nuevo León, Mexico, 1983.
- Salama, H. S; M. Foda; S. Selim: «Utilization of Fodder Yeast and Agroindustrial Byproducts in Production of Spores and Endotoxins from *B. thuringiensis*», *ZH.Mikrobiol.* 138:553-563, 1983.
- Scherer, P.; P. B. Luthy; V. Thrump: «Production of Endotoxins by *B. thuringiensis* as a Function of Glucose Concentration», *Appl. Microbiol.* 25: 644-646, 1980.
- Vanderkar, H. M.; H.T. Dulmage: *Guidelines for Production of *B. thuringiensis* H14*, UNDP/World BAN/WHO, Geneva, Switzerland, 1983.
- Xie, T.; J. Jung; B. Zhong; G. Wu: «Commercial Production and Application of *B. thuringiensis* Insecticides in China», Proceeding Vth International Colloq. Invertebrate Pathology, Adelaide, Australia, 1990, pp. 18-25.
- Yoon, K; H. Han; D.Yu: «Production of the Spores-Crystal Complex *B. thuringiensis* Var. *Israelensis* with Some Natural Media», *Korean Journal Entomol.* 17(4): 237-243, 1997.