

VIRULENCIA DE *Bacillus thuringiensis* NATIVAS DE GUANAJUATO, MÉXICO SOBRE LARVAS DE *Musca domestica*

Ruano-Roca Juan Augusto de Dios (1), Carrasco-Baeza, Víctor Manuel (2), Ángel-Sahagún, César Andrés (3)

1 [Ingeniería Agronómica en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala] | [jruanoroca@gmail.com]

2 [Maestría Interinstitucional de Producción Pecuaria, División Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato] | [hail_hunter@yahoo.com.mx]

3 [Departamento de Agronomía, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [csahagun@ugto.mx]

Resumen

La mosca doméstica (*Musca domestica*) es una de las plagas de mayor importancia a nivel mundial, debido a los problemas que ocasiona en los ámbitos pecuario y agrícola y sobre todo en la salud humana. El objeto de esta investigación fue determinar las concentraciones letales de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* de Guanajuato, México sobre larvas de *M. domestica*. Para la realización del experimento se evaluaron las cepas Bt 49 y Bt 115, las cuales se cultivaron en medio LB. Las concentraciones que se evaluaron fueron 2.5×10^8 , 2×10^8 , 1×10^8 y 5×10^7 espora-cristal/mL para la cepa Bt49, mientras que para la cepa Bt 115 fueron 2.5×10^8 , 2×10^8 , 1.5×10^8 y 1×10^7 espora-cristal/mL, además de un tratamiento testigo para cada cepa. Para la cepa Bt 49 se determinó una CL_{50} de 1.28×10^9 espora-cristal/mL mientras que para la cepa Bt 115 una CL_{50} de 5.27×10^{11} espora-cristal/mL. Se comprobó que la metodología empleada es la adecuada para la evaluación del control de larvas de *M. domestica* con *B. thuringiensis*. Se concluye que las dos cepas de *B. thuringiensis* evaluadas son virulentas para *Musca domestica* y que existen diferencias en su virulencia.

Abstract

The housefly (*Musca domestica*) is one of the most important pests in the world, due to the problems it causes in animal farms, agricultural areas and in the human health. The objective of this investigation was to determine lethal concentrations of two strains of *Bacillus thuringiensis* natives of Guanajuato, México on a *M. domestica* population from Irapuato, Guanajuato. For the experiment, the strains Bt 49, and Bt 115 were evaluated and cultivate in LB medium. The concentrations evaluated for Bt 49 strain were 2.5×10^8 , 2×10^8 , 1×10^8 and 5×10^7 spore-glass complex/mL and for Bt 115 strain the concentrations evaluated were 2.5×10^8 , 2×10^8 , 1.5×10^8 and 1×10^7 spore-glass complex/mL, in addition to a control treatment. For Bt 49 strain it determined a CL_{50} of 5.27×10^{11} spore-glass complex/mL, while the Bt 115 strain presented a CL_{50} of 5.27×10^{11} spore-glass complex/mL. It was checked that the methodology used was correct for evaluation of control of larvae of *M. domestica* with *B. thuringiensis*. It concludes that the two strains of *B. thuringiensis* evaluated are pathogens over *M. domestica* larvae in laboratory conditions and there are differences between the virulence of the evaluated strains.

Palabras Clave

Control Biológico; Entomopatógeno; CL_{50} ; control biológico, Producción pecuaria

INTRODUCCIÓN

La *Musca domestica* es una plaga cosmopolita, asociada a actividades humanas desde los trópicos hasta las regiones polares y de suma importancia a nivel global. En condiciones tropicales, pueden ocurrir hasta 20 generaciones de moscas por año, lo que refleja la rapidez con que este insecto se reproduce [11].

En el ámbito de producción animal, *M. domestica* es la especie de díptero que más dificultades ocasiona en granjas de aves de corral, porcinos, establos de caballos y ranchos; y no solamente presenta una molestia para el productor, sino también un grave problema sanitario al ser un vector de patógenos [11]. En el área agrícola, a pesar de no ser de importancia para muchos cultivos a nivel mundial, en los últimos años, la mosca doméstica se ha convertido en un serio problema para los productores de palma aceitera (*Elaeis guineensis* J.) debido a que las moscas han encontrado en el raquis de esta planta un lugar ideal para la ovoposición y desarrollo larval [2].

Villacide, Maciochi y Lantschner (2016) afirman que, dada su alta capacidad de nutrirse de cualquier tipo de materia orgánica, de reproducirse eficazmente en muchos sustratos y a su alta capacidad de hacerse resistentes a los insecticidas, la mosca es considerada una plaga universal y una de las más difíciles de controlar.

Normalmente, los programas de control se han enfocado en el uso de larvicidas y adulticidas químicos; sin embargo, estos métodos representan riesgos potenciales para el ambiente y la salud humana; además, el uso excesivo de productos químicos ha provocado que la plaga desarrolle resistencia; actualmente se reporta resistencia a los grupos de los carbamatos, organofosforados y piretroides [17].

En este contexto, para minimizar el impacto que los productos químicos tienen sobre el ambiente y el ser humano y disminuir los casos de resistencia, se han desarrollado estrategias de control dentro de un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP), que permitan reducir el uso de los métodos químicos. Entre estas estrategias destaca el uso de parasitoides, depredadores y

entomopatógenos, como alternativas de control biológico [17].

Uno de los entomopatógenos más utilizados a nivel mundial es *Bacillus thuringiensis*, una bacteria gram positiva, ubicua, aerobia estricta, que se ha utilizado extensamente como bioinsecticida debido a su capacidad de matar insectos de diversos órdenes, principalmente Lepidópteros y Dípteros [4].

B. thuringiensis, durante su ciclo de vida, presenta dos fases principales: la primera es el crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición, y la segunda es esporulación y formación de proteínas endotóxicas [14]. La reducción de poblaciones de *M. domestica* usando *B. thuringiensis* inició en 1959, cuando se realizó pruebas de alimentación en laboratorio para determinar la susceptibilidad de la *M. domestica* a cepas de *B. thuringiensis* [8].

Estudios previos referentes al tema han sido realizados por Zimmer *et al.* (2013) quienes evaluaron la actividad larvicida y los efectos subletales de las bacterias entomopatógenas *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y *B. thuringiensis* var. *israelensis* sobre larvas de mosca doméstica. La investigación demostró que las larvas del primer instar de *M. domestica* son susceptibles a la acción de estas dos variedades de *B. thuringiensis* y que a una concentración de 10^9 UFC / mL las larvas de mosca se ven afectadas y mueren en un rango del 30-40% antes de llegar al estado adulto.

En otro estudio realizado por Alonso, Jiménez y Ángel (2016) se evaluaron cepas de *B. thuringiensis* nativas del Estado de Guanajuato, México sobre larvas de *M. domestica*. Los resultados demostraron que las cepas tienen un porcentaje de control del 10 al 70% en condiciones de laboratorio y que existen diferencias en la virulencia de las cepas evaluadas.

Otro estudio realizado por Merdan (2012) se demostró que al usar cantidades de $1\mu\text{g/mL}$ de *B. thuringiensis* sobre larvas de mosca doméstica se observó una mortalidad de 46.6%, con una concentración de $10\mu\text{g/mL}$, un 66.7%, con $50\mu\text{g/mL}$ un 74.4% y con $100\mu\text{g/mL}$ un 86.6%.

Por lo antes expuesto el objetivo de la presente investigación fue determinar las concentraciones

letales de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas de Guanajuato, México sobre una población de larvas de *Musca domestica* de Irapuato, Guanajuato que permita determinar la cepa más virulenta.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Parasitología y Control Biológico (LPCB) de la División de Ciencias de La Vida del Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato.

Para la realización del bioensayo se utilizaron larvas de dos días de edad de *M. domestica* obtenidas del insectario del LPCB. El sustrato utilizado para la crianza de las larvas fue una mezcla de salvado de trigo y agua, el cual se fermenta durante un periodo de 48 horas, mientras que el alimento utilizado para los adultos fue leche en polvo, utilizando 2 onzas de leche por caja. En el insectario, cada tercer día, las poblaciones de moscas se trasladaron otra caja con sustrato y alimento nuevo.

Las cepas de *B. thuringiensis* que se emplearon para el experimento son nativas del Estado de Guanajuato y pertenecen al LPCB, en donde fueron previamente caracterizadas (Bt 49 y Bt 115). Inicialmente las cepas fueron reactivadas en agar bacteriológico; posteriormente para la realización del bioensayo, las cepas de *B. thuringiensis* se cultivaron en medio LB, con agitación a 200 rpm por 7 días.

Tabla 1: CL₅₀ para las cepas Bt 49 y Bt 115

Cepa	CL ₅₀ (espora-cristal/mL)	Intervalo de confianza (espora-cristal/mL)
Bt49	1.28x10 ⁹	2.83x10 ⁸ -5.82x10 ⁹
Bt115	5.27x10 ¹¹	8.749-2.5x10 ⁹

Durante la incubación se monitorearon los cultivos para verificar esporangios. Después de siete días de incubación, se centrifugó el cultivo, para obtener el complejo espora-cristal, a 4500 rpm por

un periodo de 15 min a 20±1°C, posteriormente se determinó la concentración de las diferentes cepas con una cámara de Neubauer; por último, se ajustó cada cepa a las concentraciones a evaluar.

Las concentraciones evaluadas fueron 2.5x10⁸, 2x10⁸, 1.5x10⁸, 1.0x10⁸, 5x10⁷ y 1.0x10⁷ espora-cristal/mL, a un grupo no se colocó el complejo espora-cristal y se le consideró como grupo testigo. Por cada unidad experimental se utilizó un vaso de 60 mL, en el cual se colocó 30 g de dieta a base de salvado de trigo y se sustituyó el agua por la concentración correspondiente para cada tratamiento, a excepción del testigo; en cada tratamiento se colocaron 30 larvas de dos días de edad para su evaluación. En total para cada cepa se evaluaron 6 concentraciones, cada concentración se consideró un tratamiento, cada uno tuvo 5 repeticiones, a un tratamiento se le colocó solo agua y se consideró testigo.

Finalmente, los frascos se colocaron en la cámara de incubación a 25±1°C y se concluyó el ensayo cuando las moscas dentro de los vasos del grupo testigo eclosionaron. Se determinó el porcentaje de mortalidad para cada concentración y se ajustaron los resultados mediante la fórmula de Abbott. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de Probit para correlacionar el logaritmo de la concentración y la mortalidad para obtener la CL₅₀ de cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el experimento, se determinó que existen diferencias en las concentraciones letales de cada cepa.

La diferencia entre la CL₅₀ de ambas cepas (Bt49 y Bt115) demuestra que se puede seleccionar la cepa más virulenta para estudios posteriores. Los resultados del análisis Probit indicaron que la cepa Bt49 presenta una menor CL₅₀ (1.28x10⁹ espora-cristal/mL) y que por lo tanto presenta un mayor potencial larvicida respecto a la cepa Bt115 (5.27x10¹¹ espora-cristal/mL) (Tabla 1; Figura 1).

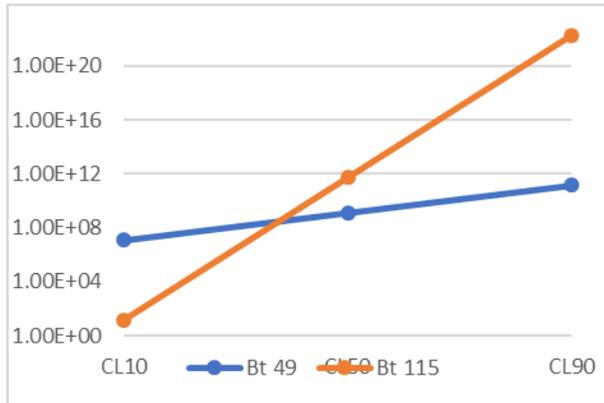


FIGURA 1: Concentraciones letales (10, 50 y 90) de *B. thuringiensis* de las cepas Bt49 y Bt115

En otro estudio desarrollado por Mwamburi (2008) se investigó sobre el control de mosca doméstica con *B. thuringiensis* en granjas de gallinas. En dicho estudio se caracterizaron las cepas de la bacteria y se determinaron las CL₅₀ y CL₉₀ de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de mosca doméstica. Los resultados mostraron una CL₅₀ de 6.23×10^9 esporas-cristal/mL, resultados que se asemejan a los obtenidos en este estudio para la cepa Bt49. Se comprobó que las larvas no se ven afectadas por la bacteria al primer día de exposición, sino que después de cuatro o cinco días la bacteria empieza a tener efecto sobre los insectos. Se demuestra, además, que entre más bajas sean las concentraciones letales más susceptibles son las larvas de mosca doméstica que son expuestas al complejo espora-cristal, y por lo tanto se aumenta el porcentaje de control. Este comportamiento se observa en la presente investigación, demostrando que la población de Irapuato es susceptible a la cepa Bt49.

Un estudio realizado por Fernández (2010) en el que se caracterizaron cepas de *B. thuringiensis* nativas del Estado de Nuevo León y su toxicidad en tres poblaciones de Nuevo León, Morelos y Veracruz se determinó también CL₅₀. Al igual que en esta investigación, se cultivaron las cepas de *B. thuringiensis* y posteriormente se obtuvo el complejo espora-cristal. Los resultados obtenidos

de los bioensayos realizados demostraron que las CL₅₀ de las cepas evaluadas fueron significativamente diferentes, al igual que lo sucedido en esta investigación. Estas variaciones de toxicidad se deben principalmente a variaciones naturales de la bacteria y a la susceptibilidad de las poblaciones evaluadas. Esta variabilidad también se observa en el presente estudio y se demuestra en la diferencia de patogenicidad entre cada una de las cepas evaluadas.

En otro estudio realizado por Baía (2015) se evaluaron nueve cepas de bacterias con acción larvicida. Las bacterias evaluadas pertenecían a las especies *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus thuringiensis* y *Lysinibacillus sphaericus*, de las cuales, tres cepas (BL102, BT1193 y BTK176) presentaron mortalidades mayores al 50%. Dichas cepas fueron sometidas a experimento de concentraciones letales, cuyos resultados mostraron una CL₅₀ de 12.40×10^8 CFU/mL para la cepa BT1193, 4.76×10^8 CFU/mL para la cepa BTK176 y 4.16×10^8 para la BL102, los anteriores resultados muestran mayor efectividad que los encontrados en el presente estudio, probablemente el origen de las cepas es un factor que influye en la especificidad de *B. thuringiensis* para *M. domestica*.

CONCLUSIONES

Se determinó que la metodología utilizada durante la investigación para la determinación de CL₅₀ de *B. thuringiensis* sobre larvas de *M. domestica* es efectiva.

La CL₅₀ de las dos cepas de *B. thuringiensis* son diferentes y que la población de mosca doméstica de Irapuato es más susceptible a la cepa Bt 49 que la cepa Bt115 en condiciones de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato por

despertar el interés por la investigación y promover este 5to. Verano de investigación Científica para estudiantes de Excelencia en el extranjero. A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por las enseñanzas y el apoyo brindado durante esta investigación. Al Dr. César Andrés Ángel Sahagún y al MVZ Víctor Manuel Carrasco Baeza por su asesoría, apoyo y consejos durante esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] Alonso, K., Hernández, S. y Ángel, C. (2016) Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* (berliner) nativas del estado de Guanajuato sobre larvas de *Musca domestica* (Linnaeus). *Veranos de la Investigación Científica*. 2 (1) 39-43.
- [2] De Paz, G. (2014) Control de mosca doméstica (*Musca domestica*) en el raquis de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala.
- [3] Del Rincón, M., Méndez, J. e Ibarra, J. (2006) Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Folia Entomol. Mex.*, 45(2): 157-164.
- [4] Fang, Y., Lin, Z., Liu, J. Shu, C., Wang, X., Zhang, X., Yu, X., Zhao, D., Liu, G., Hu, S. Zhang, H. Al-Msallem, I. y Yu, J. (2011) A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 38, 567-576.
- [5] Hodgman, T., Ziniu, Y., Ming, S., Sawyer, T., Nicholls, C. y Ellar, D. (1993) Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. *Federation of European Microbiological Societies*, 114, 117-122.
- [6] Hofte, H. y Whiteley, H. (1989) Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews*, 53 (2), 242-255.
- [7] Larrain, P. y Salas, C. (2007) Housefly: development in different types of manure. *Chilean journal of Agricultural Research* 68. 192-197
- [8] Merdan, B. (2012) *Bacillus thuringiensis* as a feed additive to control *Musca domestica* associated with poultry houses. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 65, 83-87.
- [9] Mwambury, L. (2008) Biological control of the Common Housefly (*Musca domestica*) using *Bacillus thuringiensis berliner* var. *israelensis* and *Beauveria bassiana* in cage poultry facilities. (Tesis de Doctorado) University of Kwazulu-natal, Pietermaritzburg, Republic of South Africa.
- [10] Reyes, T., Salcedo, R., Ibarra, J. y Barboza, J. (2003) Identificación de Genes Cry en cepas mexicanas de *B. thuringiensis* con potencial insecticida. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* 13 (2) 39-46.
- [11] Sánchez-Arroyo, H. y Capinera, J. (2017) House fly, *Musca domestica* Muscidae Linnaeus. *EENY, Department of Entomology and Nematology*. 48, 0-8.
- [12] Scott, J., Warren, W., Beukeboom, L., Bopp, D., Clark, A., Giers, S., Hediger, M. Jones, A., Kasai, S., Leichter, C., Meisel, R., Li, M., Minx, P., Murphy, T., Nelson, D., Reid, W., Rinkevich, F., Robertson, H., Sackton, T., Satelle, D., Thibaud, F., Tomlinson, C., Van de Zande, L., Walden, K., Wilson, R. y Liu, N. (2014) Genome of the housefly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to septic invorement. *Genome biology*, 15 (466) 0-16.
- [13] Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. y Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiological and molecular biology reviews*. 62 (03) 775-806.
- [14] Soberon, M. y Bravo, A. (2007) Las toxinas cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotechnology V*. 14. 303-314
- [15] Villacide, J., Masciocci, M. y Lanstchner, V. (2016) Aspectos básicos de la biología de la mosca doméstica. *Serie de divulgación sobre insectos de importancia ecológica, económica y sanitaria*. 12. 0-7.
- [16] Whalom, Mark. y Wingerd, B. (2003) Bt, Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54, 200-211.
- [17] Zimmer, C., Dias, L., Pires, S., Delgado, A., Ribeiro, P. y Leivas, F. (2013) Efficacy of enthompathogenic bacteria for control of *Musca domestica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114 (22), 241-244