

PATRICIA VALLE TRUJILLO
(Brand Manager)
Kenogard S.A.

TACHO MARTÍNEZ
(Field Research Manager)
Kenogard S.A.

FORAY® 48B la calidad frente a la Procesionaria

La procesionaria del pino [*Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller)] (Lepidóptera: Notodontidae, Thaumetopoeinae) es uno de los defoliadores más nocivos del área mediterránea y requiere la aplicación de medidas de control, ya que supone una grave amenaza para la funcionalidad y productividad de pinares naturales y artificiales. Además, en entornos urbanos, representa un problema sociosanitario por los efectos en humanos y otros animales homeotérmicos debido a que, los pelos urticantes de larvas a partir del III estadio (Niccoli et al., 2004), pueden flotar en el aire y provocar irritación en oídos, nariz y garganta o desencadenar intensas reacciones alérgicas.

El principal método para combatir de forma viable la procesionaria, es la aplicación del bio insecticida *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* con tratamientos aéreos o terrestres, mediante maquinaria especializada de fumigación. Estos tratamientos se realizan durante el inicio del otoño, fecha en la que el insecto se encuentra en una fase sensible, larvas en estadio I y II.

Para un buen control de esta plaga, es muy importante la elección de un formulado de calidad. Esta calidad viene determinada por las Unidades Internacionales en las que se expresa la potencia de un producto basado en *Bacillus thuringiensis*. El proceso de fabricación se realiza por fermentación, con la misma técnica que se realizan los antibióticos farmacéuticos. Si esta fabricación no se realiza en estrictas condiciones, se obtendrán productos con menos unidades biológicas, menos cantidad y calidad de toxinas, lo cual se traduciría en una menor eficacia para la plaga objetivo. Además, en la fermentación, hay un proceso clave que es la extracción

de la Beta exotoxina, la cual es tóxica para mamíferos. La planta de fermentación de los *B. thuringiensis* de Kenogard, se encuentra situada en Osage (E.E.U.U.), donde se fabrican los *Bacillus* con la máxima eficacia y seguridad.

El objeto de este estudio fue estimar las Unidades Internacionales (UI) de dos formulados comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* (Bt-k), lo cual, determinaría que un producto sea más eficaz que otro frente a la plaga objetivo.

Este estudio fue encargado por KENOGARD al laboratorio BIOISENCTICS.

Materiales y Métodos

El objetivo de este estudio fue estimar las Unidades Internacionales (UI) para dos productos comerciales: Foray® 48B frente a otro Bt-k (disponible en formulado comercial y que también se emplea en la actualidad en tratamientos forestales), utilizando la cepa ABTS-351 de *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* estándar y su UI asociada contra *Trichoplusia ni*, como referencia.





Para lo que se realizaron los siguientes estudios:

- Estimación de la LC50¹ para el standard Bt-k ABTS-351 contra *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua*.
- Estimación de la LC50 para Foray 48B contra *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua*.
- Estimación de la LC50 de otro Btk F frente a *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua*.

Obtención de larvas de *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)

Las colonias de laboratorio de *T. ni* y *S. exigua* se mantuvieron en una

cámara de crecimiento en condiciones controladas (25 ± 2 °C, 70 ± 5 de humedad relativa y un fotoperiodo 16:8 luz:oscuridad).

Las larvas se criaron con una dieta semisintética (Greene et al., 1976). Los adultos tuvieron acceso a una solución de azúcar al 10%. Para los estudios de toxicidad solo se seleccionaron larvas recién nacidas (< 2 h después de la eclosión).

Preparación, análisis volumétrico y obtención de proteínas insecticidas de la cepa de referencia y de los productos comerciales.

Se homogeneizó una muestra (1 g) de polvo del Standard Bt-k ABTS-351 en

① Vista interior planta de fermentación *Bacillus. E.E.U.U.*

100 ml de agua bidestilada (denominada 10x). Se diluyó una alícuota (10 ml) de ambos productos comerciales, en un volumen final de 1000 ml (denominado 10x). Este proceso se repitió tres veces para generar tres stocks diferentes. Para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) por muestra, se prepararon varias diluciones seriadas para cada producción. Se inocularon un total de 50 µl en placas de agar nutritivo y se incubaron a 28°C durante la noche. Este proceso se repitió tres veces utilizando alícuotas independientes.

Para obtener el perfil de las proteínas insecticidas (SDS-PAGE), una alícuota

② Planta de fermentación de 130.000 m²



↑ Vista interior
de un fermentador
(Capacidad 100.000L)

de 10 μ l de cada muestra se mezcló con 5 μ l de 30x Agente reductor (1/10 del volumen) y 3xSDS Sample Buffer (1 volumen) (New England Biolabs) y se desnaturalizó a 100°C durante 5 min. A continuación, cada mezcla se cargó en un gel de poliacrilamida al 10 % y se procesó durante 1 h a 36 mA. Seguidamente, el gel se tiñó con una solución de etanol al 50 % (v/v), ácido acético al 10 % (v/v) y azul de Coomassie R 250 al 0,1 %.

Resultados y Discusión.

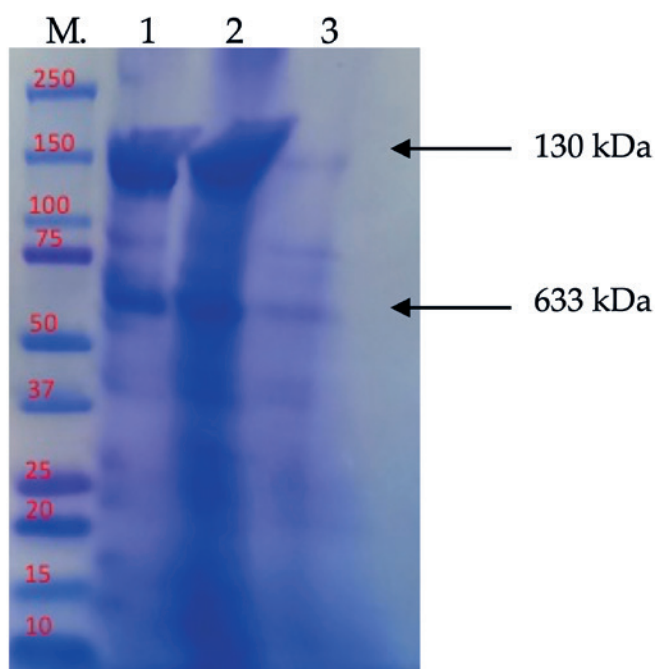
En la **Tabla 1** se muestran los resultados del análisis de las unidades formadoras de colonias de la cepa de referencia y los productos comerciales.

Estos resultados muestran una densidad muy alta de colonias en las muestras Btk ABTS-351 y Foray 48B con recuentos medios de 6,36x10⁶ UFC/ml y 1,60x10⁶, respectivamente, en comparación con Otro Btk (4,00x10⁴ UFC/ mililitros).

De acuerdo a estos resultados, el Standard Btk y el producto comercial Foray 48B son 159 veces y 40 veces más concentrados en términos de UFC que Otro Btk .

En la **Figura 1** se muestra el perfil de las toxinas proteicas de los productos evaluados. Las tres muestras presentan dos bandas de

aproximadamente 130 kDa (Kilodalton) y 633 kDa, que es el tamaño correspondiente a las proteínas Cry1 y Cry2, respectivamente. La intensidad de las bandas de proteína para Otro Btk (numero 3) es muy baja, probablemente debido a la menor concentración de ingrediente activo de este formulado.



↻
Figura 1. Perfil
de proteína
(SDS-PAGE).

M: Marca de peso
molecular (kDa);
1: Btk ABTS-351;
2: Foray 48B y
3: Otro Bt-k

En la Tabla 2 y Tabla 3 se muestran los resultados de la LC₅₀ obtenidos en los bio ensayos realizados sobre larvas neonatas de *T.ni* y *S. exigua* respectivamente.

Tabla 1.

Producto	Dilucion	Número de colonias	UFC/ml
Btk ABTS-351	10 ⁻⁴	31.8	6.36x10 ⁶
Foray 48B	10 ⁻²	800.0	1.60x10 ⁶
Otro Bt-k	10 ⁻²	20.0	4.00x10 ⁴

Tabla 2

Productos	*LC ₅₀ (mg/ml)	R.P	F.L (95%)		χ ²	df
			Más Bajo	Más alto		
Btk ABTS-351	0.0008	112.722	79.201	160.429	3.609	3
Foray 48B	0.0024	39.078	27.469	55.593	5.906	3
Otro Bt-k	0.0944	1	-	-	7.969	3

R.P: Potencia Relativa. F.L: limites fiduciales; χ²: el mejor con 3 grados

*La LC₅₀ estimada usando 5 concentraciones de producto frente a 28 *T ni* en larvas neonatas usando un volumen (35 µl) para tratar la superficie con dieta semi-sintética. La mortalidad se registró a los 7 días

Tabla 3

Productos	*LC ₅₀ (mg/ml)	R.P	F.L (95%)		χ ²	df
			Más bajo	Más alto		
Btk ABTS-351	0.106	140.341	90.195	218.648	1.437	3
Foray 48B	0.834	19.785	14.419	27.149	2.479	3
Otro Bt-k	16.505	1	-	-	14.685	3

R.P: Potencia Relativa. F.L: limites fiduciales; χ²: el mejor con 3 grados

*La LC₅₀ estimada usando 5 concentraciones de producto frente a 28 *T ni* en larvas neonatas usando un volumen (35 µl) para tratar la superficie con dieta semi-sintética. La mortalidad se registró a los 7 días

Para la estimación de las Unidades Internacionales de ambos formulados comerciales en relación con el Btk estándar emplearemos la siguiente formula.

$$\text{Formulado comercial (UI/mg)} = \frac{\text{LC50 Standard} \times \text{UI Standard}}{\text{LC50 Formulado comercial}}$$

En la Tabla 4 se muestran los resultados de cada formulado para cada una de las especies evaluadas.

Tabla 4

Productos	UI/mg <i>T. ni</i>	UI/mg <i>S. exigua</i>
Foray 48B	21,643.00	8,252.00
Otro Bt-k	550.00	417.00

CONCLUSIONES

1. Foray® 48B está 40 veces más concentrado en términos de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) que el otro Btk.
2. La potencia insecticida relativa de Foray® 48B fue 39.078 veces más tóxica en comparación con el producto comercial Otro Btk F para larvas de neonatos de *Trichoplusia ni*.
3. La potencia insecticida relativa de Foray 48B fue 19.785 veces más tóxica en comparación con el producto comercial Otro Btk F para larvas de recién nacidos de *Spodoptera exigua*.
4. Las Unidades Internacionales (UI) estimadas para los productos comerciales Foray® 48B y Otro Btk F en comparación con Standard Btk ABTS-351 (64 930 UI/ mg) contra *Trichoplusia ni* fueron 21 643 y 550 UI/ mg, respectivamente.
5. Las Unidades Internacionales (UI) estimadas para los productos comerciales Foray® 48B y Otro Btk F en comparación con Standard Btk ABTS-351 (64 930 UI/ mg) contra larvas de recién nacidos de *Spodoptera exigua* fueron 8252 y 417 UI/mg, respectivamente.

Este estudio demuestra que Foray® 48B responde a unos estándares de calidad muy altos y esto puede tener un impacto en el control de *Thaumetopoea pityocampa*.