

EFFECTO INHIBITORIO DE LOS EXTRACTOS FOLIARES DE ALGUNAS ESPECIES FORESTALES SOBRE EL *Bacillus thuringiensis* VAR. *dendrolimus* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

J. M. MENENDEZ* Y ANGELA DUARTE*

RESUMEN

Ha sido señalado por otros autores el efecto que son capaces de ejercer las sustancias contenidas en los extractos de algunas especies forestales sobre el desarrollo del *Bacillus thuringiensis* comercial.

El efecto inhibitorio de los extractos foliares de *Pinus caribaea* Morelet, *Pinus tropicalis* Morelet, *Hibiscus elatus* L. y *Cedrela odorata* L. sobre *Bacillus thuringiensis* (Berliner) var. *dendrolimus* fue estudiado en condiciones de laboratorio con el objetivo de determinar si las sustancias contenidas en dichos extractos pueden inhibir o favorecer el crecimiento de la bacteria.

Manuscrito recibido para su publicación
22 de julio de 1985

Los resultados indicaron que algunos de los extractos de Pinus estudiados son capaces de inhibir el desarrollo in vitro de la bacteria, mientras que los de las latifolias consideradas no impiden el crecimiento de la misma.

INTRODUCCION

Para profundizar en, los trabajos de control de plagas de insectos por medio de microorganismos, es importante el conocimiento de la relación insecto-parásito-planta. Es conocido que un alto número de plantas producen sustancias, las cuales son capaces de repeler o inhibir el desarrollo de otros organismos; éstos son expulsados al exterior de la hoja por volatilización o excreción (Whittaker, 1970, citado por Morris, 1972).

Los conocimientos acerca del efecto que causan las bacterias sobre algunos insectos comenzaron con los estudios de Pasteur en 1870. Años más tarde, Cheshire y Cheyne's describieron el Bacillus alves y su papel en el control de "foulbrood" (enfermedad esta muy contagiosa y destructiva de las larvas de las abejas). Desde entonces se han descrito más de 90 especies entomopatógenas. Un ejemplo de ello es el Bacillus thuringiensis Berliner, bacteria formadora de cristales que es capaz de infectar un amplio rango de lepidópteros, producto de esto último, se está trabajando ampliamente en la producción masiva y su uso como insecticida bacterial (Falcon, 1971). Actualmente, la producción y utilización de insecticidas bacteriales alcanzan más de 40 formulaciones, con las que se controlan más de 200 especies de insectos (Burgyn y Martouret, 1973, citados por Jiménez, sa).

Surgeron y Martouret (1971) señalan los trabajos realizados durante los últimos 15 años por diferentes investigadores con la bacteria Bacillus thuringiensis Berliner, no por el poder de contagio que desarrolla la misma, sino debido a su capacidad de eliminar insectos selectivamente cuando se aplica como insecticida microbial.

Dichos autores señalan, además, que no sólo se debe considerar la patogenicidad del Bacillus y la variabilidad que puede experimentar el huésped, sino también se deben tener en cuenta

los factores ambientales que pueden influir en la interrelación huésped-patógeno.

Informaciones publicadas hasta la fecha indican que el follaje de algunas especies forestales son inhibitorias al Bacillus thuringiensis Berliner comercialmente producido (Kushener y Harvey, 1962; Smironoff, 1967, 1972; Palter y Peskcherskaya, 1967; Morris, 1969; Maksimiuk, 1970; citados por Morris, 1972). Estas sustancias antimicrobiales pudieran disminuir el desarrollo y multiplicación de la bacteria que será ingerida por la plaga de insectos.

Teniendo en cuenta la importancia que reviste el empleo de Bacillus thuringiensis Berliner en el control de plagas forestales, nos propusimos realizar un ensayo mediante el cual podamos determinar la relación que puede existir entre el microorganismo y un grupo de plantas hospederas.

El objetivo del presente trabajo consiste en determinar si los extractos foliares obtenidos a partir de algunas especies forestales de importancia económica son capaces de inhibir el desarrollo del Bacillus thuringiensis Berliner var. dendrolirinus.

MATERIALES Y METODOS

Se colectaron 3 g de yemas y follajes tiernos de cuatro especies forestales (Pinus caribaea Morelet, Pinus tropicalis Morelet, Hibiscus elatus L. y Cedrela odorata L.). Inmediatamente, éstas fueron desinfectadas con solución de hipoclorito de Na al 1 % durante 3 min; se enjuagaron, posteriormente, con agua destilada estéril. Las muestras fueron maceradas en morteros de porcelana estériles hasta su total trituración.

Se añadieron 25 mL de agua destilada estéril, homogenizando por agitación la muestra; seguidamente se filtraron utilizando papel de filtro Filtrak 3 hw de 11 cm de diámetro, y se obtuvieron de esta forma los extractos de cada una de las especies en agua.

Este proceso de extracción fue repetido utilizando como solventes, alcohol etílico en un caso y acetato de etilo en el otro, en lugar de agua.

A cada uno de estos extractos se le hicieron mediciones de pH con un potenciómetro MPH-4B con la finalidad de determinar la influencia que pueden ejercer los mismos en los resultados obtenidos.

Los filtrados fueron recogidos en frascos previamente esterilizados que contenían discos bacteriológicos de 5 mm de

diámetro, con el objetivo de impregnar los mismos en los extractos. Con los residuos que quedaron en el papel de filtro se impregnaron también discos bacteriológicos, con la finalidad de determinar si los solventes utilizados para la extracción fueron capaces de extraer todas las sustancias inhibitorias presentes en la muestra.

Previamente, fue sembrada la bacteria en placas de Petri de 10 mm x 110 mm que contenían medio agar nutriente de la Oxoid; se prepararon tres placas por cada una de las muestras. En ellas se colocaron cinco discos impregnados con los diferentes extractos obtenidos anteriormente.

Para controlar el efecto que pueden ejercer el alcohol y el acetato de etilo como solventes utilizados en la obtención de los extractos foliares, utilizamos como control discos impregnados con dichos solventes y los colocamos sobre la superficie de placas de Petri donde previamente había sido sembrada la bacteria.

Las placas fueron colocadas en una incubadora a $28 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Los diámetros de las zonas de inhibición que se desarrollaron alrededor de los discos fueron medidos después de 24 h.

Se realizaron tres réplicas de cada una de las variantes ensayadas.

La cantidad de datos por cada una de las variantes estudiadas está dada por: cinco discos x tres placas x tres réplicas para un total de 45 datos.

Los datos obtenidos de las mediciones efectuadas a las zonas de inhibición en cada una de las variantes fueron promediados, y se expresaron los resultados como las medias de los diámetros medidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se observa en los resultados reflejados en la Tabla 1, los extractos foliares del Pinus caribaea Morelet y el Pinus tropicalis Morelet en general, son capaces de inhibir el desarrollo del Bacillus thuringiensis Berliner var. dendrolimus, mientras los extractos del Hibiscus elatus L. y Cedrela odorata L. no inhiben la bacteria.

TABLA 1. Medias de los diámetros (mm) de las zonas de inhibición producidas por las diferentes especies.

Especies forestales	Extractos			Residuos		
	Agua	Alcohol etílico	Acetato de etilo	Agua	Alcohol etílico	Acetato de etilo
<u>Pinus caribaea</u> Mor.	0	7,4	10,8	8,2	6,6	0
<u>Pinus tropicalis</u> Mor.	0	7,2	7,8	5,8	2,5	0
<u>Hibiscus elatus</u> L.	0	0	0	0	0	0
<u>Cedrela odorata</u> L.	0	0	0	0	0	0

Es de destacar que los extractos acuosos del P. caribaea Morelet y P. tropicalis Morelet no fueron capaces de inhibir el crecimiento, mientras que los residuos de éstos sí lo hicieron. Entendemos que esto se debe a que las sustancias inhibitorias presentes en estos pinos no son solubles en H₂O, por tanto no pasan el extracto filtrado, y permanecen en el residuo macerado.

Los extractos de estas especies (P. caribaea y P. tropicalis) en alcohol etílico y acetato de etilo sí mostraron una alta inhibición, en el desarrollo del Bacillus, indicando esto que estos solventes orgánicos solubilizaron y arrastraron las sustancias inhibitorias. Se pudo observar, además, que al diámetro de la zona de inhibición causada por los extractos en acetato fue ligeramente mayor que la de los extractos en alcohol, indicando esto que el acetato fue capaz de extraer mayor cantidad de sustancias inhibitorias que el alcohol (ver Figuras 1-6).

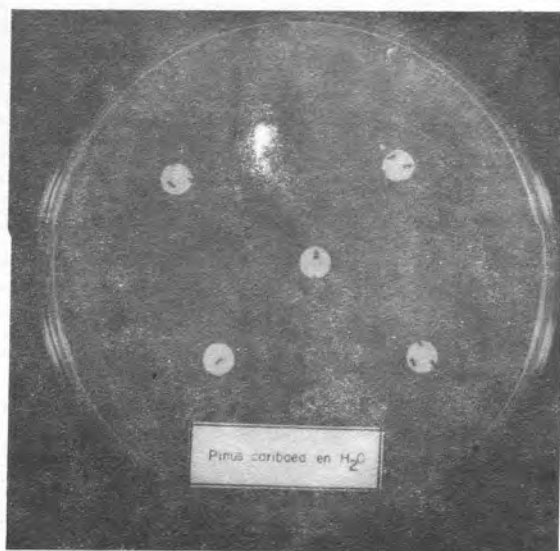


FIGURA 1. Pinus caribaea en H₂O.

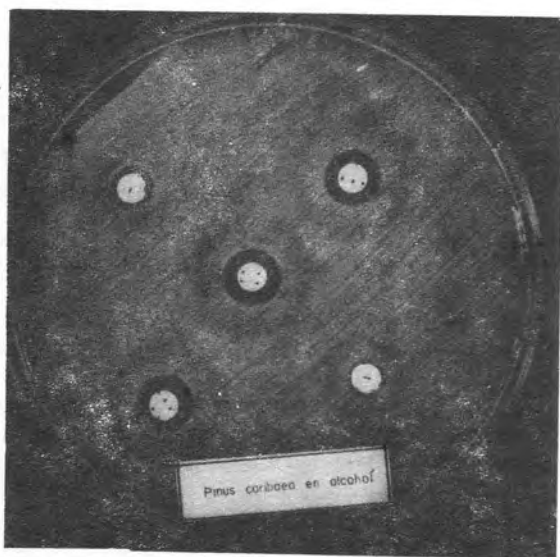


FIGURA 2. Pinus caribaea en alcohol.

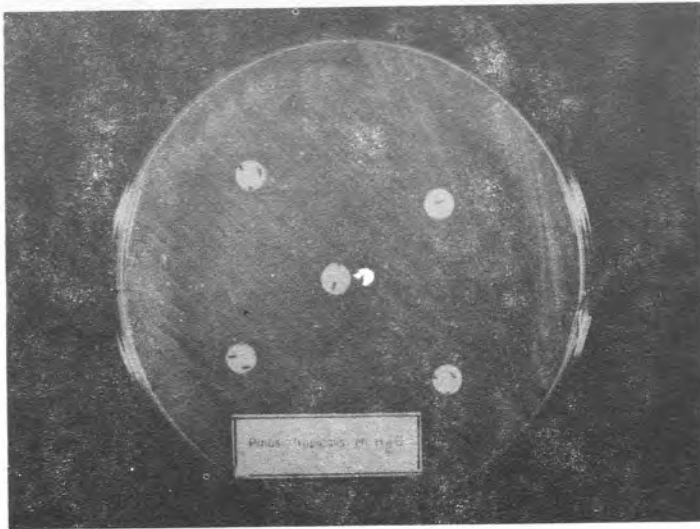


FIGURA 3. Pinus tropicalis en H₂O.

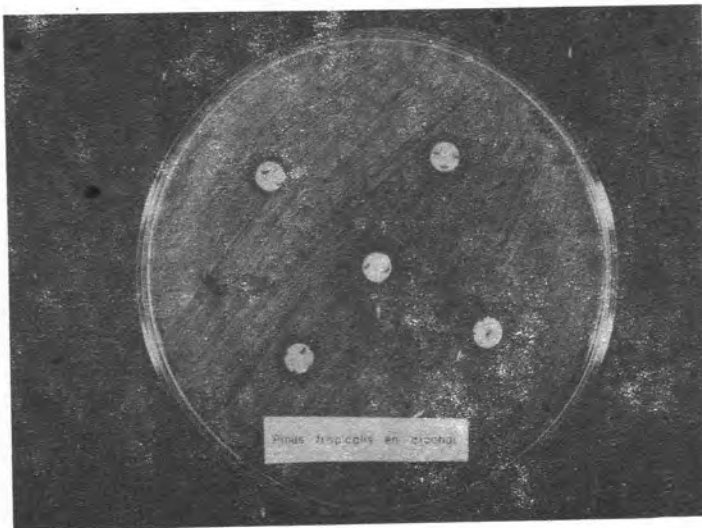


FIGURA 4. Pinus tropicalis en alcohol.

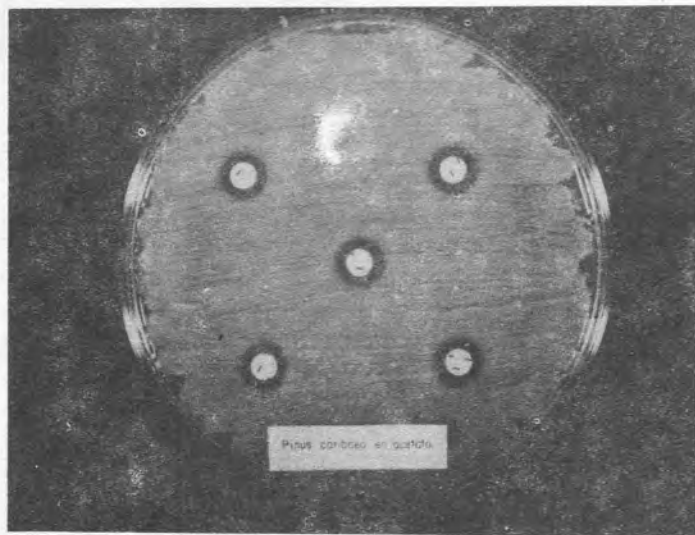


FIGURA 5. Pinus caribaea en acetato.

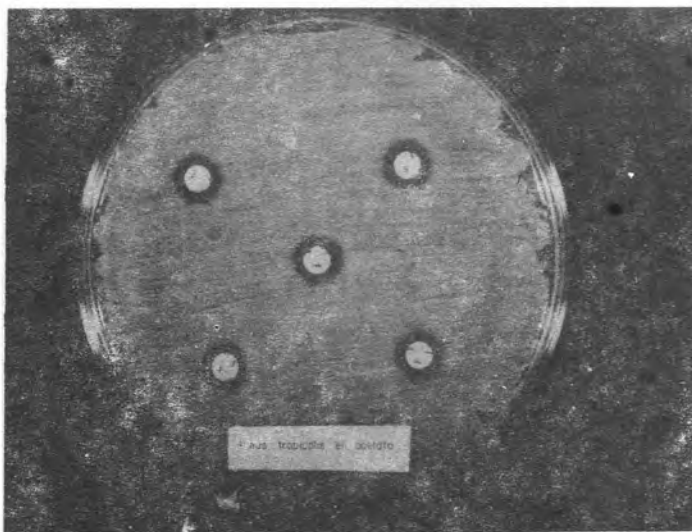


FIGURA 6. Pinus tropicalis en acetato.

Esta hipótesis se pudo confirmar al hacer un análisis del efecto provocado por los diferentes residuos con los cuales fueron impregnados los discos, observando que los residuos de los extractos acuosos tuvieron una mayor inhibición que los de alcohol y éstos, a su vez, mayor que los de acetato; quedó demostrado así que a medida que el solvente utilizado realizó una mayor extracción de las sustancias foliares, menor efecto de inhibición se observó en los discos que fueron impregnados con sus residuos.

Las dos latifolias estudiadas presentaron resultados semejantes, o sea, que ninguno de los extractos obtenidos de ellas fueron capaces de inhibir el desarrollo del Bacillus thuringiensis Berliner var. dendrolimus. En este caso tampoco los residuos de las mismas manifestaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento del Bacillus (ver Figuras 7-12).

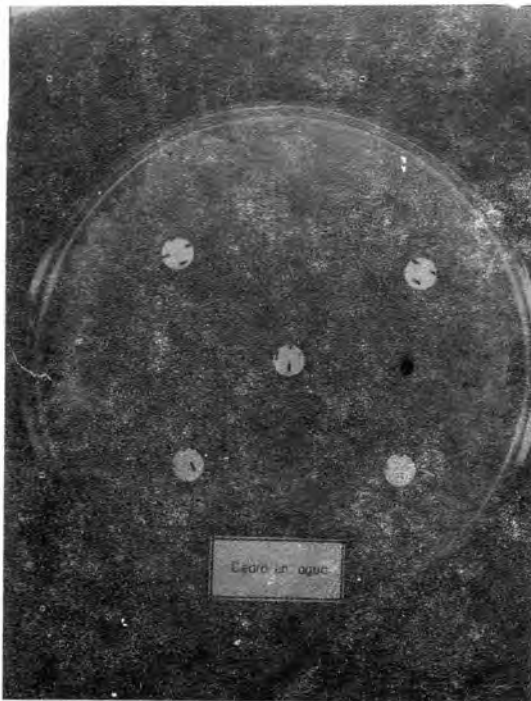


FIGURA 7. Cedro en agua.

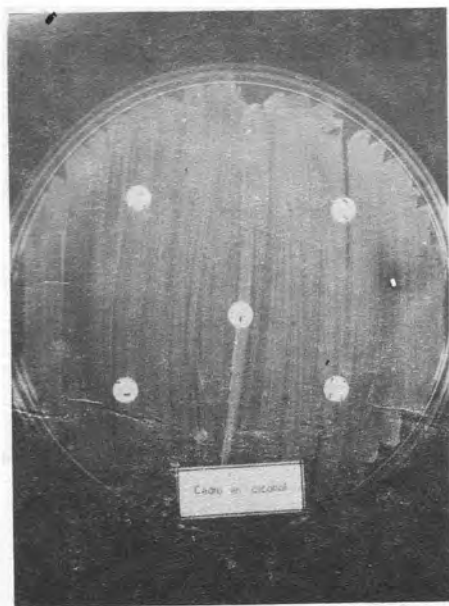


FIGURA 8. Cedro en alcohol.

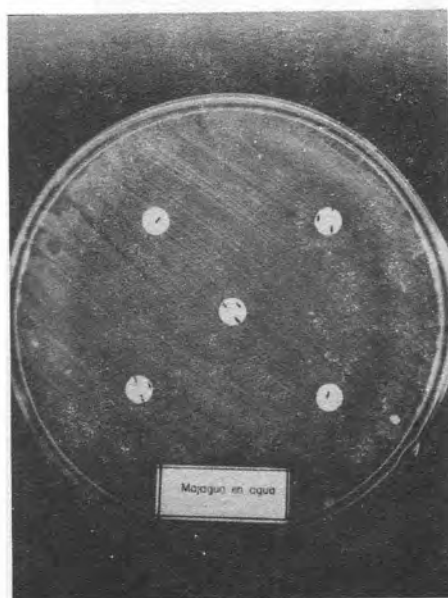


FIGURA 9. Majagua en agua.

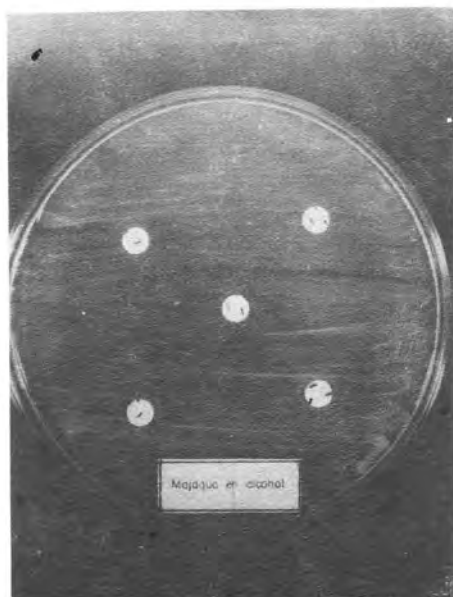


FIGURA 10. Majagua en alcohol.

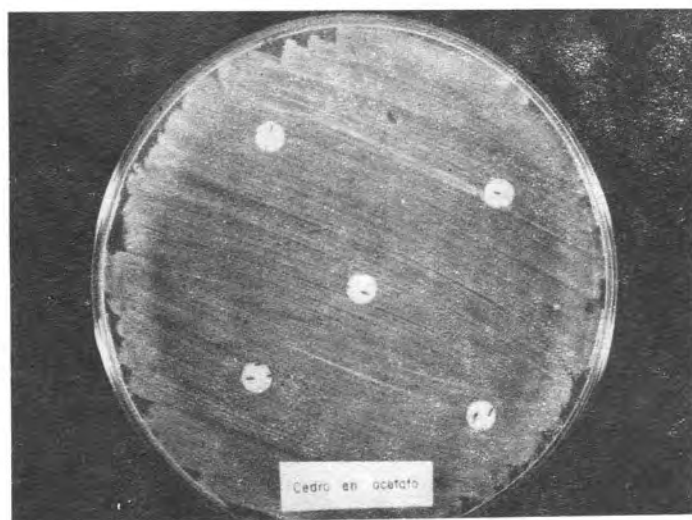


FIGURA 11. Cedro en acetato.

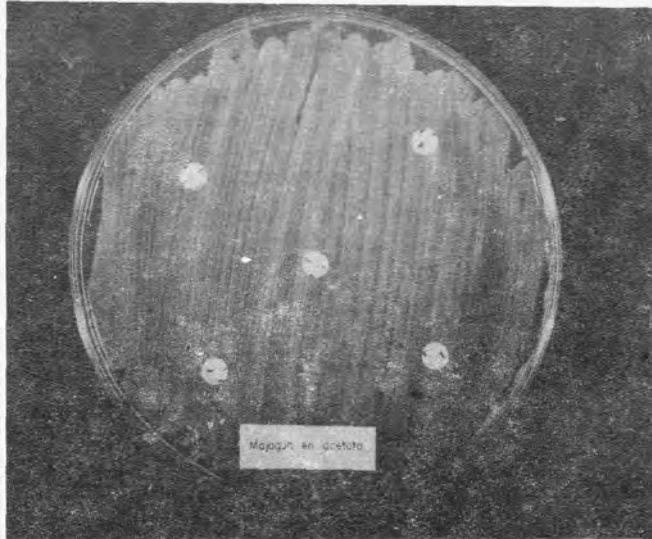


FIGURA 12. Majagua en acetato.

En las Figuras 13-15 se pueden observar los resultados obtenidos producto de impregnar discos con los diferentes solventes utilizados; se comprobó que la zona de inhibición producida en los casos anteriores, no fue motivada por los mismos.

En estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Forestales de Varsovia se encontró que los extractos foliares de algunas coníferas europeas poseían un mayor efecto inhibitorio sobre el Bacillus thuringiensis Berliner que los extractos de algunas latifolias de la misma región (Gtowacka, 1983).

Por otra parte, Morris (1972), en estudios similares con algunas especies forestales de América del Norte, encontró que los extractos de latifolias fueron menos inhibitorios al Bacillus thuringiensis Berliner, que los de las coníferas.

Ambos resultados presentan similitud a los obtenidos en nuestro trabajo. Haciendo un análisis de los factores que pudieron influir en los resultados obtenidos, nos inclinamos por dos que están relacionados directamente con las características de las especies estudiadas. Uno de estos factores es la diferencia en la composición química entre coníferas y latifolias, para lo cual

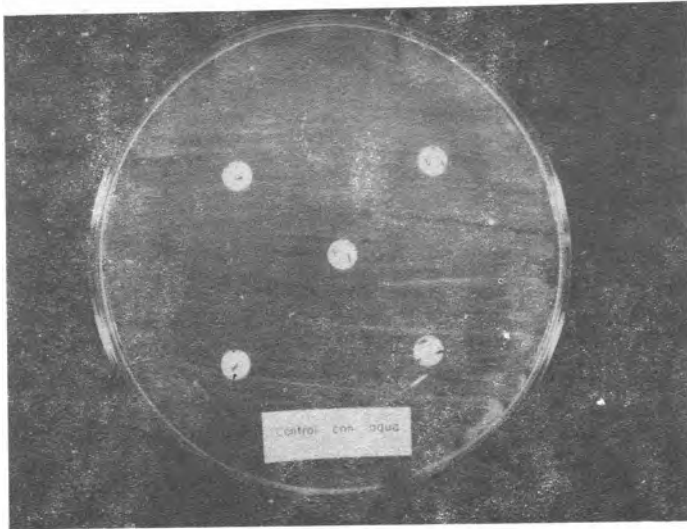


FIGURA 13. Control con agua.

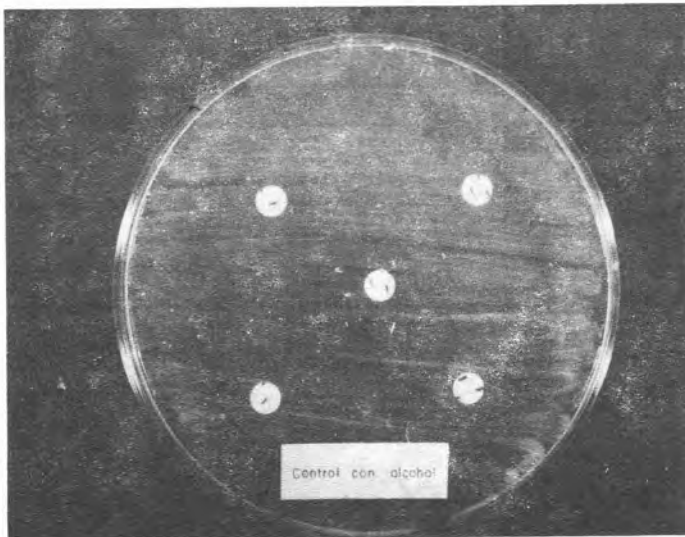


FIGURA 14. Control con alcohol.

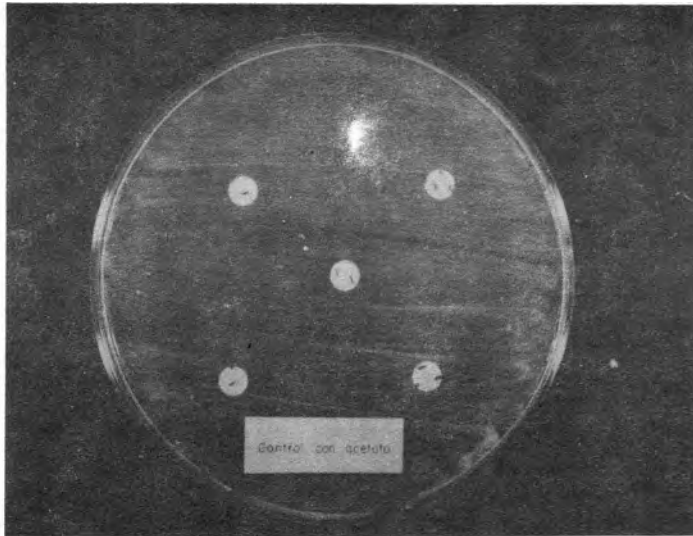


FIGURA 15. Control con acetato.

TABLA 2. Valores de pH de los diferentes extractos.

Especies estudiadas	Solventes usados		
	Agua	Alcohol etílico	Acetato de etilo
<u>P. caribaea</u>	4,5	5,4	3,9
<u>P. tropicalis</u>	5,2	5,8	4,5
<u>C. odorata</u>	7,0	6,9	4,8
<u>H. elatus</u>	6,7	6,3	4,8

Kráme y Kozlowski (1970) citados por Morris (1972) plantean que, en general, los lípidos, terpenos y otras sustancias se encuentran en mayor abundancia en las coníferas que en las latifolias.

El otro factor que se ha de tener en cuenta es la diferencia entre los pH de los extractos de coníferas y latifolias. En la Tabla 2 se pueden observar los valores de pH medidos a los diferentes extractos. Las dos especies de pino mostraron valores que oscilaron entre 3,9 y 5,8; se observó que extractos con valores de 4,5 en unos casos provocaban inhibición del crecimiento de las bacterias, mientras que en otro caso no los inhibía.

En el caso de las latifolias se observa un rango de pH mayor que en el de las coníferas; oscila este entre 4,8 y 7,0

Aquí observamos cómo los extractos con valores mínimos de pH (4,8) no inhibieron el desarrollo de la bacteria, mientras extractos de las coníferas con valores similares ~~S~~ ~~Í~~ hicieron; quedó demostrado así que, aunque los pH pudieron haber influido en los resultados obtenidos, no fueron determinantes en los mismos, quedando entonces como única posibilidad de inhibición de la bacteria la composición química o naturaleza de los extractos.

CONCLUSIONES

1. El Pinus caribaea Morelet y Pinus tropicalis Morelet contienen sustancias capaces de inhibir el desarrollo del Bacillus thuringiensis Berliner var. dendrolimus siendo éstas insolubles en H₂O en nuestras condiciones de estudio.
2. Hibiscus elatus L. y Cedrela odorata L. no poseen sustancias inhibitorias del crecimiento del Bacillus thuringiensis Berliner var. dendrolimus capaces de solubilizarse en agua, alcohol etílico o acetato de etilo.
3. Estos resultados deben ser considerados a la hora de realizar experimentos con Bacillus thuringiensis Berliner var. dendrolimus como medio de control de plagas forestales.

RECOMENDACIONES

No podemos afirmar que todas las especies de coníferas y latifolias tengan un comportamiento similar a las estudiadas, por tanto, recomendamos que se amplíe este estudio a otras especies forestales de importancia económica.

Igualmente, se recomienda que se profundice en el estudio de la caracterización de los extractos foliares de aquellas especies que seancapaces deinhibir el desarrollo de la bacteria, para de esta forma determinar cuál o cuales son las sustancias capaces de producir dicho efecto.

ABSTRACT

INHIBITION EFFECT OF LEAF EXTRACTIVES FROM FOREST TREES ON Bacillus thuringiensis VAR. dendrolimus UNDER LABORATORY CONDITIONS

Other authors have reported the effect of substances obtained in some extractives from forest species on the development of the commercial Bacillus thuriqiensis. The inhibition effect of leaf extractives from Pinus caribaea Morelet, Pinus tropicalis Morelet, Hibiscus elatus L and Cedrela odorata on Bacillus thuriqiensis (Berliner) var. dendrolimus was studied under laboratory conditions to determine if the substances contained in these extractives can inhibit or favor bacterial growth. Obtained results showed that some pine extractives are able to inhibit the "in vitro" development of bacteria, and those from broadleaved trees do not impede its growth.

BIBLIOGRAFIA

BURGERJON, A. y D. MARTOURET. 1971. Determinación y significación del espectro hospedante del Bacillus thuringiensis, Inglaterra. p. 305-325.

- FALCON, L. A. 1971. Use bacteria for microbial control. En: Microbial control of insects and mites. London and New York, Academic Press. p. 67-95.
- GTOWACKS, B. 1983. Comunicación personal.
- JIMENEZ, J. R. sa. Uso de entomopatógenos en el control biológico de insectos y plagas. Dpto. de Lucha biológica, La Habana, IISV.
- MORRIS, O. N. 1972. Inhibitory effects of foliage extracts of some trees on commercial Bacillus thuringiensis. Can. Ent. 104: 1357-1361.
- VANKOVA, J. 1958. Cultivo del Bacillus thuringiensis en laboratorio a escala de Empresa. **En:** Transactions of the First International Conference of Insect Pathology and Biological Control, Praga. p. 59-63.