

Capítulo 5

Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos

Chapter 5

Entomopathogenic bacteria in insect biological control

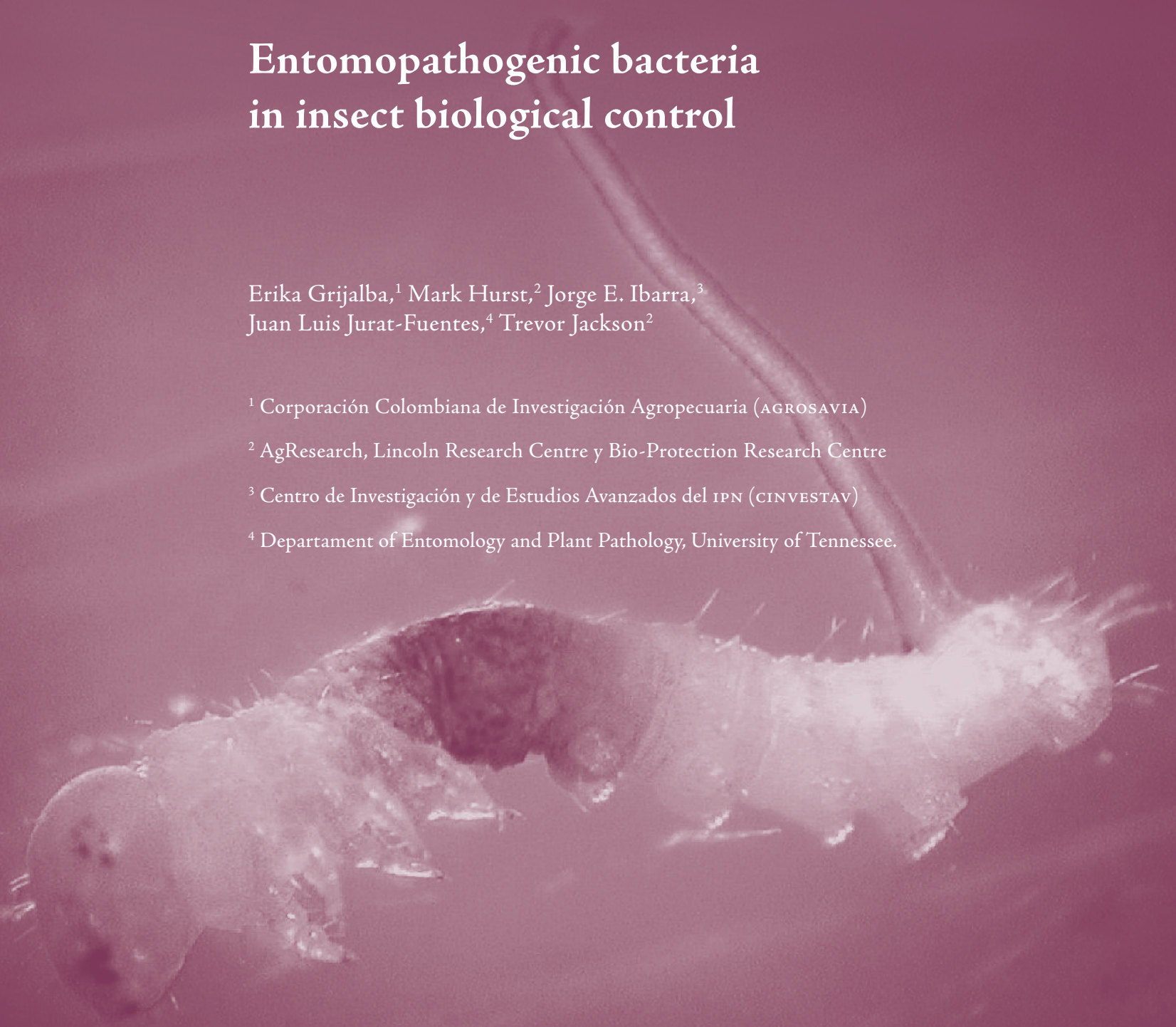
Erika Grijalba,¹ Mark Hurst,² Jorge E. Ibarra,³
Juan Luis Jurat-Fuentes,⁴ Trevor Jackson²

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

² AgResearch, Lincoln Research Centre y Bio-Protection Research Centre

³ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

⁴ Department of Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee.



Contenido

Introducción	300
Historia	301
Clasificación, huéspedes y uso en control biológico	302
Bacterias Gram-positivas	302
Bacterias Gram-negativas	316
Historias de éxito y aplicación	322
Limitaciones en el uso de bacterias entomopatógenas	324
Conclusiones y perspectivas	325
Agradecimientos	325
Referencias	326



Resumen

Este capítulo presenta una revisión de las bacterias entomopatógenas que han sido utilizadas para el control microbiológico de insectos considerados como plaga, incluyendo su identificación, modo de acción y uso en el control de plagas. En general, las bacterias entomopatógenas deben ser ingeridas y actúan mediante la liberación de toxinas o penetración de las células del intestino medio, antes de la invasión del hemocele para multiplicarse en el cadáver del insecto. Las bacterias entomopatógenas Gram-positivas tienen la capacidad de formar esporas, dentro de las que se encuentra el bien conocido *Bacillus thuringiensis* (Bt), así como patógenos de insectos de los géneros *Paenibacillus* y *Lysinibacillus*. En contraste, los entomopatógenos Gram-negativos no forman esporas e incluyen aislamientos de los géneros *Serratia*, *Yersinia*, *Photobacterium*, *Chromobacterium*, entre otros. Muchas bacterias entomopatógenas pueden ser producidas por fermentación, y se ha logrado llevar a cabo su producción masiva y comercialización. Por su parte, Bt ha sido el caso más exitoso de todos los controles microbianos con cepas activas sobre lepidópteros, coleópteros y dípteros, utilizadas en el control de plagas a gran escala; además, sus genes de toxinas han sido usados para la protección de plantas en cultivos transgénicos. Asimismo, los bioplaguicidas bacterianos también han sido el pilar para la producción de cultivos orgánicos. Aunque las bacterias entomopatógenas han sido los agentes de control microbiológico más exitosos a la fecha, el enorme rango de diversidad microbiana sugiere que aún hay muchas cepas y toxinas por descubrir.

Palabras clave

Bacillus thuringiensis, bacteria, entomopatógeno, *Serratia entomophila*, *Yersinia entomophaga*

Abstract

This chapter reviews entomopathogenic bacteria that have been used in microbial control of insect pests and covers their identification, mode of action and aspects of their use in pest control. In general, entomopathogenic bacteria must be ingested and act by release of toxins and/or penetration of the midgut cells before invasion of the haemocoel to multiply in the insect cadaver. The Gram-positive entomopathogenic bacteria are sporeformers and include the well-known *Bacillus thuringiensis* (Bt) as well as insect pathogens from the genera *Paenibacillus* and *Lysinibacillus*. The Gram-negative entomopathogens are non-sporeformers and include isolates from the genera *Serratia*, *Yersinia*, *Photobacterium*, *Chromobacterium* and others. Most bacterial entomopathogens can be produced by fermentation and have been amenable to mass production and commercialisation. Bt has been the most successful of all microbial controls with lepidopteran, coleopteran and dipteran active strains used in large scale pest control operations and toxin genes used for protection of transgenic crop plants. Bacterial biopesticides have also been the mainstay of organic crop production. While bacterial entomopathogens have been the most successful of all microbial control agents to date, the enormous range of bacterial diversity suggests that there are many strains and toxins yet to be discovered.

Keywords

Bacillus thuringiensis, bacteria, entomopathogenic, *Serratia entomophila*, *Yersinia entomophaga*

Introducción

Las bacterias y arqueobacterias, los organismos unicelulares más abundantes, tienen en su mayoría un tamaño de 1 a 7 μm y, a pesar de su tamaño y arquitectura simple sin núcleo y organelos (Murray, Rosentahl, & Pfaller, 2009), son fábricas bioquímicas, críticas para la ecología de la tierra (Lodish et al., 2006). Después de millones de años de evolución, estos seres tan pequeños, que de no ser por sus efectos podrían pasar desapercibidos, se han especializado y conformado en ecosistemas complejos con interacciones bien definidas y vitales para la vida de todos los seres vivos.

Los microorganismos rara vez se encuentran como una única especie en una población en el medio ambiente. Los estudios muestran una enorme riqueza en diferentes hábitats, detectada en pequeñas muestras de suelo, sedimento, animales, plantas (Braga, Dourado, & Araújo, 2016) y aún en insectos, siendo esta última una relación que ha coevolucionado por más de 250 millones de años, abarcando desde el comensalismo al parasitismo o patogénesis (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). Los insectos están íntimamente relacionados con las bacterias en todos los estados de su vida; por ejemplo, sus huevos están rodeados por películas bacterianas y, cuando las larvas nacen, ingieren estas bacterias, llegando a establecer distintas comunidades bacterianas en su tracto gastrointestinal (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). Estas comunidades residentes intestinales continúan enriqueciéndose a lo largo del desarrollo del insecto, a través de los alimentos que consumen (Krishnan et al., 2014). Las bacterias que se localizan en el interior de los insectos pueden producir feromonas en los adultos, y después de la muerte del insecto participan en el proceso de descomposición (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012).

Las bacterias entomopatógenas son capaces de entrar al huésped y evadir sus defensas para proliferar y multiplicarse, causando enfermedad, mediada por factores de patogenicidad como toxinas y enzimas. Tras causar la muerte del insecto, la nueva progenie de las bacterias sale para infectar nuevos huéspedes. En algunos casos, como *Bacillus* spp., las bacterias

esporulan produciendo un estado de vida resistente a factores ambientales, lo que les da una gran ventaja al considerar la limitada disponibilidad de huéspedes viables y la dispersión pasiva de las bacterias entomopatógenas (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012).

Históricamente, las bacterias Gram-negativas han sido separadas de las Gram-positivas por su incapacidad para absorber el colorante cristal violeta, propiedad que se debe a la estructura de su pared celular. Por su parte, las bacterias Gram-positivas (*Firmicutes*), como *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus sphaericus*, poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas y que está formada principalmente por peptidoglicano, mientras que las Gram-negativas (*Gracilicutes*), como *Pseudomonas* spp., *Serratia entomophila* y *Yersinia entomophaga*, poseen una membrana externa que mantiene su estructura y constituye una barrera para las moléculas de gran tamaño (Murray et al., 2009).

En la búsqueda de alternativas que permitan el manejo de cultivos sostenibles, muchos expertos promueven el manejo integrado de plagas como la mejor opción; para ello, herramientas como los plaguicidas microbianos son una excelente alternativa (Mnif & Ghribi, 2015). Los microorganismos utilizados como ingrediente activo de bioplaguicidas no son tóxicos, ni patógenos para la vida silvestre, humana o de otros organismos no relacionados con la plaga a controlar, salvaguardando a insectos benéficos (incluyendo predadores o parasitoides) en las áreas tratadas (Chakoosari, 2013; Chandler et al., 2011). Sin embargo, esta alta especificidad puede ser al mismo tiempo una debilidad, ya que su potencial de mercado puede limitarse mucho (Chandler et al., 2011). Dentro de sus ventajas, también vale la pena mencionar que, en algunos casos, los microorganismos pueden establecerse en una población plaga o en su hábitat, permitiendo su control en generaciones subsiguientes (Chakoosari, 2013; Chandler et al., 2011), o pueden promover el crecimiento de las raíces y de las plantas al favorecer la microflora benéfica del suelo (Berg, 2009),

lo que permite un incremento en la productividad del cultivo (Mnif & Ghribi, 2015).

El mercado global de los biopesticidas fue valorado en el 2011 en 1,3 billones de dólares, y se proyectaba que para el 2017 alcanzaría los 3,2 billones de dólares, al incrementarse la demanda por cultivos libres de residuos químicos y por alimentos orgánicos (Dutta, 2015). Dentro de los bioinsecticidas para todos los tipos de cultivos, los basados en bacterias entomopatógenas comprenden el 74% del valor de mercado (Thakore, 2006), lo que no sería de extrañar dadas las diversas maneras en que las bacterias se encuentran estrechamente relacionadas con los insectos. No obstante, solo unas pocas bacterias patógenas de insectos han sido utilizadas como agentes de control biológico (Mnif & Ghribi, 2015), siendo *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner) la más común y frecuentemente utilizada como ingrediente activo de bioinsecticidas (Jisha, Smitha, & Benjamin, 2013). Este dominio de Bt en el mercado de bioinsecticidas bacterianos se da, posiblemente, debido a su mayor estabilidad en los procesos de producción, formulación y aplicación en campo, al utilizar como ingrediente activo las esporas y los cristales proteicos Cry. Pero la amplia diversidad de bacterias, incluidos los recombinantes naturales y manipulados, proporciona un excelente recurso para el desarrollo de nuevos bioplaguicidas. Quizás el mayor desafío para la comercialización de estos plaguicidas sea el desarrollo de procesos de fermentación y formulación, no solo en laboratorio, sino en la etapa de escalamiento, que permitan obtener bioinsecticidas estables y eficaces durante su almacenamiento y aplicación en campo, a base de bacterias entomopatógenas no necesariamente esporuladas.

Historia

La bacteria entomopatógena más estudiada y utilizada es *B. thuringiensis*, cuyo descubrimiento y usos han sido a veces rodeados de controversias, desinformación y especulaciones. No hay duda de que el primer caso documentado de la existencia de *B. thuringiensis* lo registró el investigador japonés Shigetane Ishiwata en 1901, al lograr aislar la bacteria de una colonia de gusanos de la seda (*Bombyx mori*) y comprobar que era la causante de la enfermedad que en esa época se le

denominaba “flacheria” (de la palabra francesa *flacherie*). Ishiwata denominó a la bacteria como “sottokin” o “sotto bacillus”, proveniente del vocablo japonés *sotto* que significa “muerte súbita” o “colapso”, aduciendo a la rapidez con la que las larvas morían después de alimentarse con esta (Beegle & Yamamoto, 1992).

La primera incertidumbre sobre este caso se presentó por el hecho de que Louis Pasteur, entre 1865 y 1870, en su famoso rescate de la industria sericícola francesa por el descubrimiento y elaboración de un protocolo de desinfección de colonias enfermas, descubrió dos enfermedades infecciosas del gusano de seda: una plenamente identificada hasta hoy como pebrina (pébrine), causada por el microsporidio *Nosema bombycis*; otra, la flacheria (flacherie), causada por bacterias. Aquí reside la incertidumbre. Los dibujos de su cuaderno de trabajo contenían diversos tipos de bacterias, incluyendo evidentes formas bacilares. Debido a que la flacheria posteriormente se asoció también a la presencia de virus, el dilema de corroborar si Pasteur fue el primero en trabajar con *B. thuringiensis* sigue sin resolverse (Steinhaus, 1975).

El segundo caso de controversia ocurre cuando el microbiólogo alemán Ernst Berliner recibe, en 1911, una muestra de larvas muertas de la palomilla de los graneros (*Ephestia kuehniella*), encontradas en la región de Turingia (Alemania Oriental). En esta muestra, Berliner descubrió (en realidad redescubrió) la bacteria causante de tales infecciones, a la que aisló, corroboró su patogenicidad y, como debió hacerlo en su momento Ishiwata, describió para darle un nombre científico: *Bacillus thuringiensis*, aduciendo a su origen geográfico. Ishiwata y sus sucesores, a pesar de haber seguido el estudio de la bacteria, no consideraron describir y nombrar formalmente a lo que posteriormente llamaron *Bacillus sotto*. Ya era tarde, y el nombre formal quedó aceptado como *Bacillus thuringiensis*.

Examinando en detalle la historia de *B. thuringiensis*, se pueden encontrar otros datos interesantes —por no decir, controvertidos—. Cuando Berliner describió formalmente la bacteria en 1915, la Primera Guerra Mundial interrumpió su línea de investigación y, desafortunadamente desde el punto de vista taxonómico, llevó a la pérdida de la cepa Berliner original. No fue sino hasta 1927 cuando un

estudiante de Berliner, Otto Mattes, aisló una cepa de *B. thuringiensis*, a partir del mismo insecto del que se había servido Berliner, y substituyó la cepa original perdida, un aspecto controvertido en taxonomía, ya que se “asume” que es la misma cepa de Berliner. Esta cepa es la que se utiliza en las primeras pruebas de campo en Hungría y Yugoslavia, y de la que se obtuvo el primer producto comercial de origen francés en 1938: Sporeine (Steinhaus, 1975).

La irrupción de la Segunda Guerra Mundial interrumpió de nuevo el estudio de la bacteria como agente de control biológico, y no es sino hasta la década de los años cincuenta cuando Edward Steinhaus reactivó la misma cepa (guardada en su refrigerador), para convertirla en el más exitoso y más utilizado agente de control biológico. Este desarrollo disparó una efervescente investigación sobre la bacteria, lo que permitió el aislamiento de una gran cantidad de nuevas cepas y el avance para que, en la década de los años sesenta, diversas compañías alrededor del mun-

do se interesaran en su comercialización (Lambert & Peferoen, 1992; Lisansky & Coombs, 1994).

Después de Sporeine, en 1961 se registró Thuricide en Estados Unidos, mientras que en Europa, grandes compañías de agroquímicos comenzaron su producción y desarrollo, como Solvay en Bélgica o Sandoz en Suiza. En 1970 alcanzaron el mercado Dipel y Bactospein (Ravensberg, 2011).

Otra de las bacterias pioneras fue *Paenibacillus popilliae*, utilizada para el control de las larvas del escarabajo japonés *Popillia japonica* en pasturas (Klein, 1988). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por su sigla en inglés) desarrolló y registró en ese país un bioinsecticida (Milky Spore Powder) a base de *P. popilliae*, en 1948, producido por laboratorios Fairfax (Lord, 2005). En este caso, dado que la bacteria es un patógeno obligado, al no poder completar su ciclo vital fuera del huésped tuvo limitada producción y éxito comercial.

Clasificación, huéspedes y uso en control biológico

Bacterias Gram-positivas

Las bacterias Gram-positivas se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, con forma de bacilos y cocos, y como especies de aerobios y anaerobios facultativos o estrictos. Una característica única dentro de las bacterias Gram-positivas es la facultad de poder formar esporas de resistencia frente a condiciones adversas, lo que las hace más estables frente a procesos de producción, formulación y almacenamiento, así como en los resultados obtenidos a nivel biológico cuando son aplicadas en invernadero o campo. El modo de acción de este grupo de bacterias entomopatogénicas está casi siempre asociado a la producción de toxinas que destruyen la barrera del epitelio intestinal para favorecer el paso de la bacteria a la hemolinfa, donde normalmente se suceden ciclos de esporulación y división, causando septicemia y muerte del insecto (figura 5.1). Además, diferentes especies de bacterias Gram-positivas producen distintas toxinas, aunque algunas especies producen toxinas comunes, como las toxinas Cry de *B. thuringiensis* (figura 5.2), que son a veces producidas por cepas de otras especies de *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*.

Bacillus thuringiensis (Bt)

El *B. thuringiensis* es una bacteria aerobia facultativa, esporulante, ubicua en su distribución, que ha sido aislada en diferentes partes del mundo, y de sistemas muy diversos como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas y granos almacenados, entre otros (De Maagd, Bosch, & Stiekema, 1999). La mayoría de las cepas de Bt producen cristales proteicos durante la esporulación, que exhiben actividad específica contra larvas de lepidópteros, dípteros, coleópteros, hemípteros, himenópteros y malófagos (Schnepf et al., 1998) y células humanas cancerígenas (Lee et al., 2000; Mizuki et al., 2000). Los cristales son liberados al medio ambiente después de la lisis del esporangio, durante el final de la etapa de esporulación (figura 5.3) (Jisha et al., 2013). Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados, aplanados, esféricos y otras formas más atípicas (figura 5.4) (Khetan, 2001).

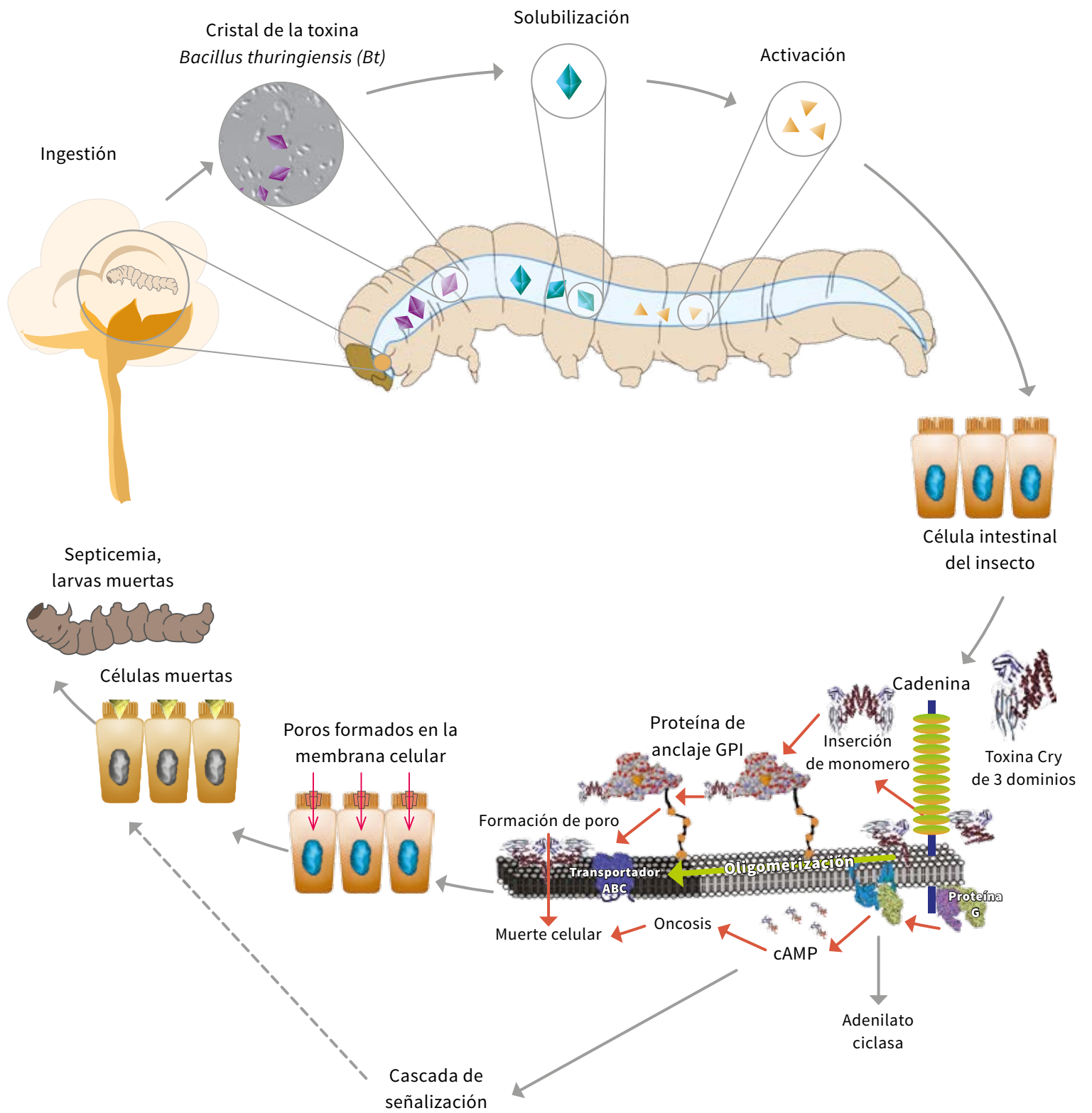


Figura 5.1. Modo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

Fuente: Adaptada de Adang, Crickmore y Jurat-Fuentes (2014)

Su actividad insecticida es específica para un grupo reducido de especies huéspedes, generalmente cercanas taxonómicamente, y pueden causar la muerte en 48 horas o menos (Jisha et al., 2013). El cristal proteico de Bt se compone, principalmente, de una o varias toxinas

llamadas comúnmente δ -endotoxinas, de entre 70 y 140 kDa, de las cuales se conocen dos familias: las proteínas Cry (del inglés *Crystal*) y Cyt (del inglés *Cytotoxic*), que varían en número y tipo, dependiendo de la cepa de la bacteria (Adang, Crickmore, & Jurat-Fuentes, 2014).

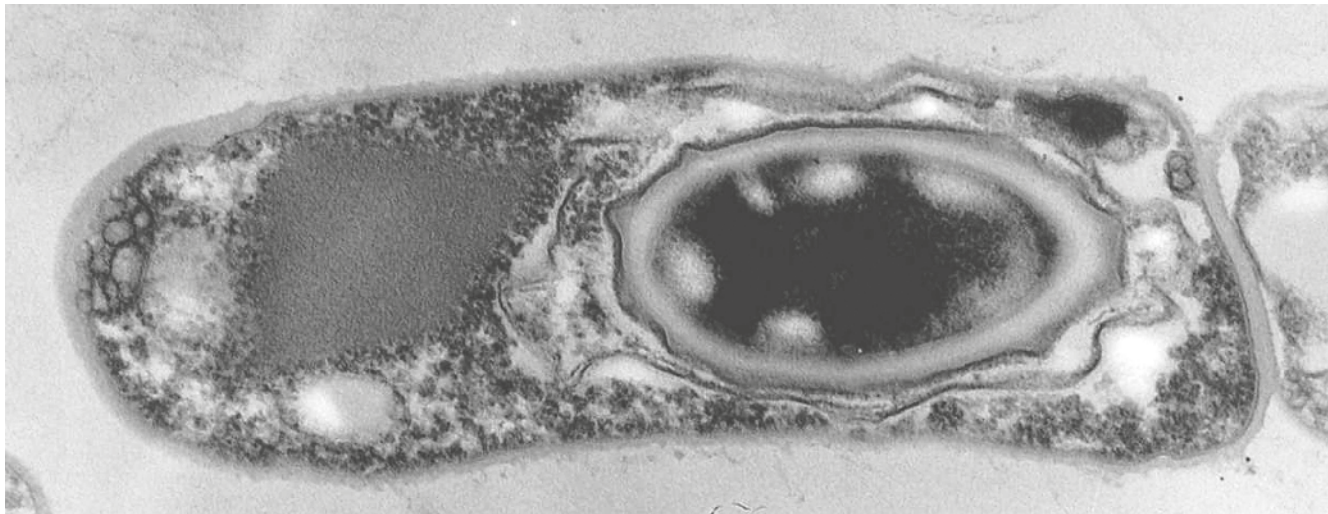
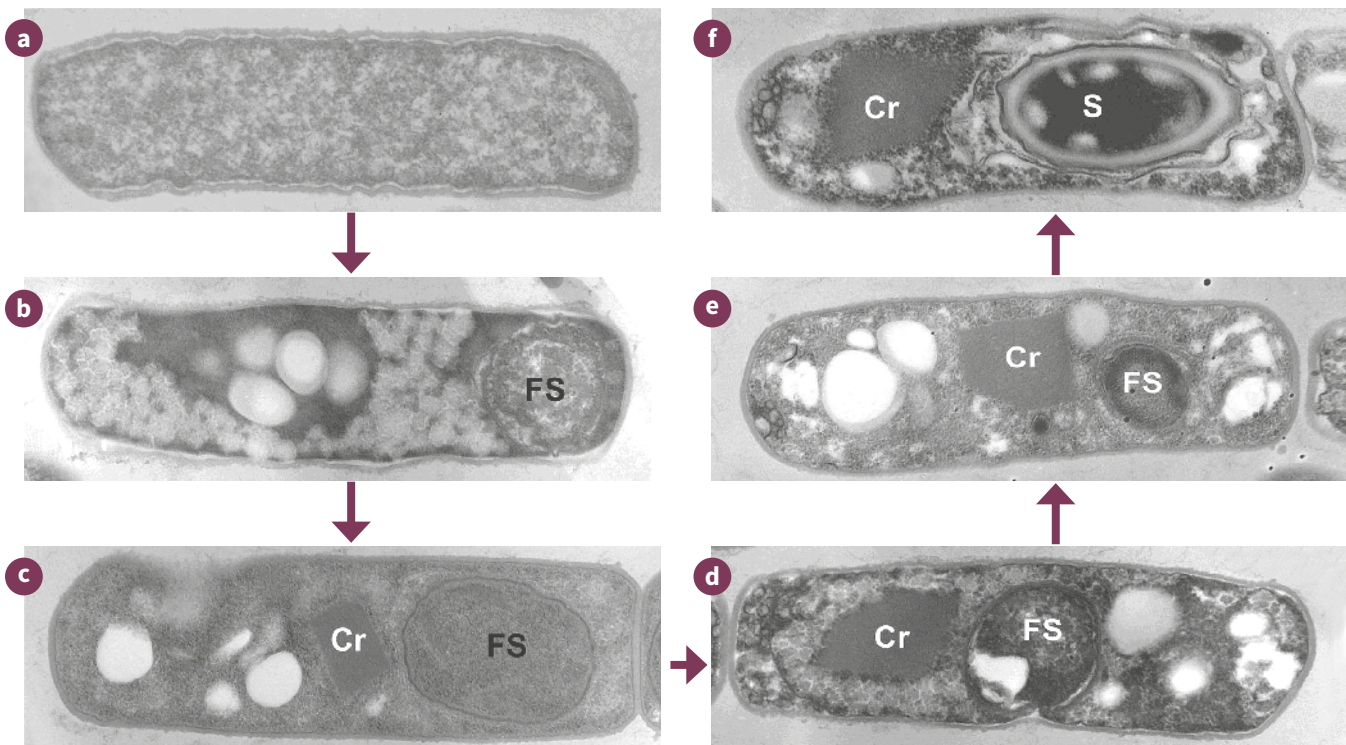


Foto: Jorge E. Ibarra

Figura 5.2. Microfotografía electrónica de transmisión de un esporangio de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki. Imagen tomada con un microscopio Phillips Morgani, operado a un voltaje de aceleración de 70 kV y 5600X de magnificación.



Fotos: Jorge E. Ibarra

Figura 5.3. Ciclo de *Bacillus thuringiensis*. a. Célula vegetativa; b. Inicio de la formación de la protospora en el incipiente esporangio FS = protospora; c. Formación de la primera capa de la protospora (FS) y el inicio de la formación del cristal parasporal (Cr); d. Acumulación de capas de la protospora (FS) y aumento del tamaño del cristal (Cr); e. Inicio de la formación del exosporium en la protospora (FS) y aumento de tamaño del cristal (Cr); f. Estado final de la esporulación S = espora, Cr = cristal.

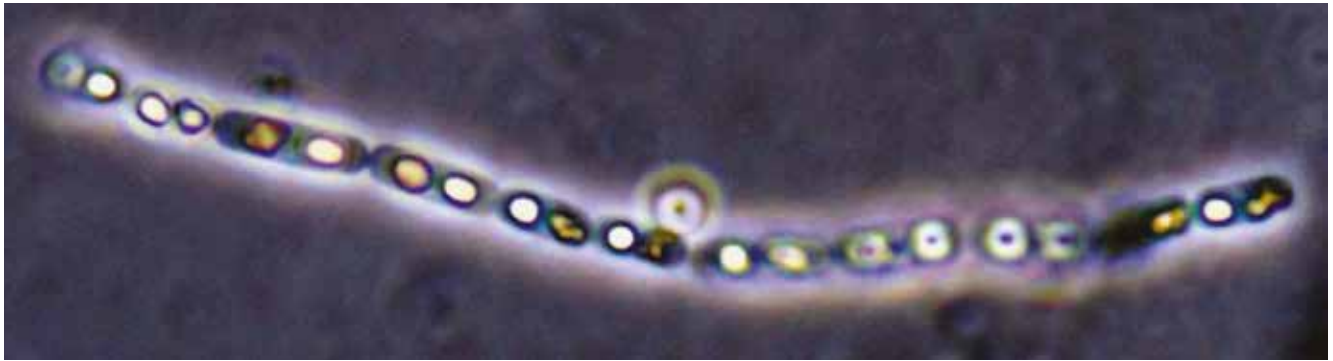


Foto: Jorge E. Ibarra

Figura 5.4. Microfotografía de contraste de fases de fases de esporangios maduros concatenados de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki. Cada esporangio muestra una espora (refringente) y un cristal parasporal (un poco amarillento). La siguiente fase es la autólisis, cuando la pared del esporangio se degrada y libera las esporas y cristales, separadamente.

Inicialmente, la clasificación de las δ -endotoxinas fue realizada por Höfte y Whiteley (1989), con base en la especificidad de la actividad insecticida. En esta, las proteínas se dividían en cuatro clases: (I) para lepidópteros, (II) específico para lepidópteros y dípteros, (III) específico para coleópteros y (IV) específico para dípteros. Sin embargo, se presentaron inconsistencias al encontrar discrepancias entre genes que tenían una alta homología, pero codificaban toxinas con espectro de acción distinto, lo que dio lugar a la revisión de la nomenclatura. En la nueva nomenclatura se asignaron nombres a miembros de superfamilias de genes, de acuerdo con su grado de homología en la secuencia proteica.

Asimismo, los números romanos fueron cambiados a números arábigos (Crickmore et al., 1998). Siguiendo esta nomenclatura, hasta la fecha se han reportado más de 700 toxinas Cry (LifeSci, 2017), agrupadas en 282 holotipos. El criterio principal para incluir una toxina en esta nueva nomenclatura es que tenga una secuencia significativamente similar a una o más toxinas dentro de la nomenclatura, o que sea una inclusión proteica paraesporal que exhiba actividad pesticida o algún efecto tóxico verificable experimentalmente sobre un organismo diana o blanco (LifeSci, 2017). La mayor parte de estas proteínas son tóxicas para lepidópteros, aunque algunas despliegan actividad dual como las toxinas Cry1Ca o Cry2A, que son activas contra lepidópteros y dípteros (figura 5.5) (Bravo, 2004). En la tabla 5.1 se presenta una lista de los órdenes de los insectos susceptibles a las diferentes familias de toxinas Cry. Cabe señalar que algunos reportes sobre la actividad tóxica de estas proteínas están sujetos a corroboración, tanto por su especificidad como por sus niveles de toxicidad.



Foto: Jorge E. Ibarra

Figura 5.5. Larva de primer instar del gusano de cuerno del tabaco, *Manduca sexta*, atacado por las toxinas de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki HD-1. Se puede observar la melanización defensiva a nivel del mesenterón, tratando (infelizmente) de contrarrestar la invasión de las bacterias presentes en el intestino de la larva.

La mayoría de toxinas Cry muestra una estructura tridimensional caracterizada por la presencia de tres dominios con distintos roles en el modo de acción, aunque otras toxinas presentan estructuras más diversas (Adang et al., 2014). El dominio I está compuesto de un grupo de siete hélices anfipáticas; el dominio II contiene tres láminas β -antiparalelas, y el dominio III está formado por un sándwich de dos láminas β -antiparalelas.

Tabla 5.1. Efecto de las familias de toxinas Cry sobre órdenes de insectos

Familia de la toxina cristalina	Orden del insecto diana	Ejemplos
Cry1A	Lepidoptera	<i>Manduca sexta</i> (gusano del tabaco), <i>Heliothis virescens</i> (gusano bellotero), <i>Trichoplusia ni</i> (oruga de la col o gusano falso medidor)
Cry1B	Coleoptera, Diptera, Lepidoptera	<i>Anthonomus grandis</i> (gorgojo del algodón), <i>Musca domestica</i> (mosca doméstica), <i>Plutella xylostella</i> (palomilla dorso de diamante)
Cry1C	Diptera, Lepidoptera	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla), <i>Spodoptera exigua</i> (gusano soldado)
Cry1F	Lepidoptera	<i>Spodoptera</i> spp., <i>Helicoverpa armigera</i> (gusano del algodón), <i>Trichoplusia ni</i> (oruga de la col o gusano falso medidor)
Cry1G	Lepidoptera	<i>Agrotis ipsilon</i> (gusanos grises), <i>Ostrinia nubilalis</i> (taladro del maíz), <i>Trichoplusia ni</i> (oruga de la col o gusano falso medidor)
Cry1I	Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (escarabajo de la patata)
Cry2A	Diptera, Hemiptera, Lepidoptera	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla), <i>Macrosiphum euphorbiae</i> (pulgón de la patata), <i>Pectinophora gossypiella</i> (gusano rosado del algodón)
Cry3A	Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera	<i>Tenebrio molitor</i> (gusano de la harina), <i>Macrosiphum euphorbiae</i> (pulgón de la patata), <i>Solenopsis invicta</i> (hormiga roja de fuego)
Cry3B	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i> (gusano de la raíz del maíz)
Cry4	Diptera	<i>Anopheles gambiae</i> (mosquito), <i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla), <i>Culex quinquefasciatus</i> (mosquito)
Cry5	Hymenoptera, especie de nematodos	<i>Diprion pini</i> (mosca de sierra del pino), <i>Meloidogyne hapla</i> (nematodo del nudo de la raíz)
Cry6A	Especies de nematodos	<i>Pristionchus pacificus</i> , <i>Acrobeloides</i> spp., <i>Pratylenchus</i> spp. (nematodos de lesión)
Cry7A	Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (escarabajo de la patata)
Cry7B	Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i> (palomilla dorso de diamante)
Cry8A	Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (escarabajo de la patata)
Cry8B	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i> (gusano de la raíz del maíz)
Cry8D	Coleoptera, Lepidoptera	<i>Popillia japonica</i> (escarabajo japonés)

(Continúa)

(Continuación tabla 5.1)

Familia de la toxina cristalina	Orden del insecto diana	Ejemplos
Cry9	Lepidoptera	<i>Phthorimaea operculella</i> palomilla de la papa), <i>Bombyx mori</i> (gusano de seda), <i>Agrotis segetum</i> (gusanos grises)
Cry10	Diptera, Coleoptera	Mosquitos, <i>Hypothenemus hampei</i> (broca del café) y <i>Anthonomus grandis</i> (picudo del algodón)
Cry11B	Diptera	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla), <i>Anopheles stephensi</i> (mosquito), <i>Culex pipiens</i> (mosquito trompetero)
Cry12A	Especies de nematodos	<i>Pratylenchus</i> spp. (nematodo lesionador)
Cry18A	Coleoptera	<i>Melolontha melolontha</i> (escarabajo de mayo)
Cry19A	Diptera	<i>Anopheles stephensi</i> (mosquito), <i>Culex pipiens</i> (mosquito trompetero)
Cry20A	Diptera	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla)
Cry22A	Coleoptera, Lepidoptera	<i>Anthonomus grandis</i> (gorgojo del algodón), <i>Plutella xylostella</i> (palomilla dorso de diamante)
Cry23A	Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i> (gorgojo castaño de la harina)
Cry24C	Diptera	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla)
Cry32A	Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i> (palomilla dorso de diamante)
Cry32B	Diptera	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito de la fiebre amarilla)
Cry34/Cry35 Cry36A	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i> (gusano de la raíz del maíz)
Cry37A	Coleoptera	<i>Popillia japonica</i> (escarabajo japonés)
Cry39A	Diptera	<i>Anopheles stephensi</i> (mosquito), <i>Culex pipiens</i> (mosquito trompetero)
Cry43	Coleoptera	<i>Anomala cuprea</i> (escarabajo de junio)
Cry47A	Diptera	<i>Lucilia cuprina</i> (mosca australiana de las ovejas)
Cry48A/Cry49A	Diptera	<i>Culex quinquefasciatus</i> (mosquito)
Cry51A	Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i> (gusano de seda)
Cry55A	Coleoptera, especie de nematodos	<i>Phyllotreta cruciferae</i> (escarabajo de la pulga crucífero), <i>Meloidogyne hapla</i> (nematodo del nudo de la raíz)

Fuente: adaptada de Jurat-Fuentes y Jackson (2012); los ejemplos de especies susceptibles fueron obtenidos a partir de la base de datos de especificidad de las toxinas de *B. thuringiensis* de Van Frankenhuyzen y Nystrom (2011) y revisiones publicadas por Van Frankenhuyzen (2009).

El modo de acción de las toxinas incluye una serie de pasos, que pueden dictaminar su especificidad (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017). Una vez que el insecto ingiere el cristal, este es solubilizado por las condiciones alcalinas en el intestino, y es proteolíticamente transformado en un fragmento tóxico (Zalunin, Elpidina, & Oppert, 2015).

Durante la activación proteolítica, un corto péptido de unos 28-45 aminoácidos del extremo N-terminal y la mayoría del extremo C-terminal (~500 aminoácidos) son escindidos de la proteína completa (protoxina). La toxina activa resultante se une a receptores localizados sobre las microvellosidades de la membrana apical de las células del epitelio del intestino medio, favoreciendo un nuevo procesamiento por proteasas, que resulta en la oligomerización de la toxina (Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo, & Soberón, 2002). Este paso de la unión a receptores es aparentemente uno de los más críticos para la toxicidad, ya que los casos de altos niveles de resistencia a toxinas Cry están siempre ligados a la alteración de al menos uno de los receptores, con la consecuente reducción de la unión de la toxina a la membrana epitelial (Ferré & Rie, 2002).

Diferentes proteínas han sido propuestas como receptores de las toxinas Cry; es el caso, por ejemplo, de las caderinas, aminopeptidasas, fostasas alcalinas e, incluso, lípidos (Pigott & Ellar, 2007). Sin embargo, los estudios más recientes identifican proteínas de la familia de las "ATP binding cassette" (ABC) como los receptores más relevantes para la toxicidad, y cuya modificación resulta en los más altos niveles de resistencia (Heckel, 2012).

Estudios recientes sugieren que las proteínas ABC están involucradas en la formación del oligómero y su inserción en la membrana para formar poros (Bretschneider, Heckel, & Pauchet, 2016). El flujo de iones a través del poro de la toxina Cry y el flujo de agua que lo acompaña resultan en la muerte celular por *shock* osmótico (Endo, Azuma, Adegawa, Kikuta & Sato, 2017). La muerte de células intestinales resulta en la desaparición de la barrera epitelial, con lo cual las bacterias residentes en el intestino invaden la hemolinfa para causar la muerte del insecto por septicemia (Raymond, Johnston, Nielsen-LeRoux, Lereclus & Crickmore, 2010). Los síntomas que se observan en las larvas de insectos contaminadas son cese de la ingesta,

parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y, finalmente, la muerte (Aronson, Beckman, & Dunn, 1986; Gupta, Dow, Hall, & Harvey, 1985).

Otra de las proteínas interesantes de Bt son las denominadas *Vegetative insecticidal proteins* (VIP), proteínas insecticidas que se producen durante la fase vegetativa de la bacteria. Dentro de este grupo se incluyen las toxinas binarias Vip1 y Vip2, con actividad específica sobre coleópteros, y Vip3, con un amplio rango contra lepidópteros (Yu et al., 2011). Shingote et al. (2013) reportaron la potencia insecticida de Vip1/Vip2 contra *Sitophilus zeamais*, con un 60% de mortalidad. Estudios realizados por Fang et al. (2007) con Vip3Ac1 mostraron una alta actividad insecticida de estas proteínas contra las larvas de los lepidópteros *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae), gusano cogollero del maíz, y *Helicoverpa zea* (Noctuidae), gusano elotero.

Técnicas de identificación subespecífica de *B. thuringiensis*

Con el objeto de clasificar la gran cantidad de cepas de Bt, que desde su redescubrimiento se iban aislando, varios investigadores sugirieron —y pusieron a prueba— diversas técnicas de identificación subespecífica. Varias de estas técnicas se basaron en el cristal parasporal típico de la especie, al que unos años antes Angus (1954) había atribuido el factor insecticida de la bacteria. Así, la incipiente electroforesis y la reacción cruzada con anticuerpos de las proteínas del cristal se propusieron para clasificar las diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Finalmente, la técnica desarrollada por De Barjac y Bonnefoi (1962), basada en la serotipificación flagelar de las cepas, fue aceptada ampliamente. Esta clasificación aún persiste hasta la fecha, pero sus limitantes (ver más adelante) y el desarrollo de técnicas moleculares han estimulado el desarrollo de otras técnicas más eficientes, rápidas e informativas.

Serotipificación flagelar

Como se mencionó, De Barjac y Bonnefoi (1962) desarrollaron la técnica de serotipificación flagelar, iniciando con 24 cepas de Bt. La técnica se basa en la reacción cruzada de anticuerpos específicos contra

Tabla 5.2. Serovariedades de *Bacillus thuringiensis* conocidas hasta la fecha

Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar
1	<i>thuringiensis</i>	30	<i>medellin</i>
2	<i>finitimus</i>	31	<i>toguchini</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	32	<i>cameroun</i>
3a,3b, 3c	<i>kurstaki</i>	33	<i>leesis</i>
3a, 3b, 3d	<i>mogi</i>	34	<i>konkukian</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	35	<i>seoulensis</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	36	<i>malayensis</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	37	<i>andaluciensis</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>
5a, 5b	<i>galleriae</i>	39	<i>brasiliensis</i>
5a, 5c	<i>canadienses</i>	40	<i>huashongensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	41	<i>soocheon</i>
7	<i>aizawai</i>	42	<i>jinghongiensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	43	<i>guiyangiensis</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	44	<i>higo</i>
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	45	<i>roskildiensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	46	<i>chanpaisis</i>
10a, 10b	<i>darmnsadiensis</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	48	<i>balearica</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	49	<i>muju</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	50	<i>navarriensis</i>
12	<i>thopmsoni</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
13	<i>pakistani</i>	52	<i>kim</i>
14	<i>israelensis</i>	53	<i>asturiensis</i>
15	<i>dakota</i>	54	<i>poloniensis</i>
16	<i>indiana</i>	55	<i>palmanyoliensis</i>
17	<i>tohokuensis</i>	56	<i>rongseni</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
18a, 18c	<i>yosso</i>	58	<i>argentiniensis</i>
19	<i>tochigiensis</i>	59	<i>iberica</i>
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	60	<i>pingluonsis</i>
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
21	<i>colmeri</i>	62	<i>zhaodongiensis</i>
22	<i>shadongiensis</i>	63	<i>bolivia</i>
23	<i>japonensis</i>	64	<i>azorensis</i>
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>
24a, 24c	<i>novosivirsk</i>	66	<i>graciosensis</i>
25	<i>coreanensis</i>	67	<i>vazensis</i>
26	<i>silo</i>	68	<i>thailandensis</i>
27	<i>mexicanensis</i>	69	<i>pahangli</i>
28a, 28b	<i>monterrey</i>	70	<i>sinensis</i>
28a, 28c	<i>jegathesan</i>	71	<i>jordanica</i>
29	<i>amagiensis</i>		

Fuente: Adaptada de Lecadet (1998) y Khyami-Horani, Hajaj y Charles (2003)

proteínas (flagelinas) de los flagelos de la bacteria. Es decir, la proteína de los flagelos de una nueva cepa de Bt es inyectada a un conejo que desarrolla anticuerpos específicos contra los flagelos (flagelinas) de esa cepa. Al mezclar el antisuero extraído de ese conejo con la cepa original, la suspensión precipitaría por la reacción cruzada antígeno-anticuerpo. Esa cepa recibiría un nombre subespecífico y, cada vez que se observara una reacción cruzada de ese mismo antisuero con una cepa desconocida, se le asignaría el mismo nombre subespecífico. Si ninguno de los antisueros desarrollados hasta ese momento presentaba reacción cruzada con alguna cepa desconocida, se iniciaría el proceso de inmunización de un conejo para obtener el antisuero respectivo y se le asignaría un nuevo nombre a esa nueva cepa.

De esta forma, el Instituto Pasteur en París posee la más amplia colección de antisueros y se le ha considerado el centro internacional de acopio para la serotipificación de nuevas cepas de Bt, así como también para la asignación de nuevos nombres a las cepas que no presenten reacción cruzada con los antisueros acumulados. Otro centro de serotipificación de cepas de Bt es el laboratorio del doctor Michio Ohba (Kyushu University) en Japón, que también posee una amplia colección de antisueros que

normalmente coinciden con los del Instituto Pasteur. En la actualidad, el Instituto Pasteur mantiene una colección de 71 serotipos diferentes, pero debido a que algunos presentan varios sub-serotipos (tabla 5.2) el número de nombres subespecíficos es de 85 (Khyami-Horani, Hajaj, & Charles, 2003). Por otro lado, debido al gran número de serotipos y a la frecuencia con que se añadían nuevos nombres, se decidió utilizar el término “serovariedad” (o serovar) por el de “subespecie” (Lecadet et al., 1999) y al antisuero correspondiente (designado por un número arábigo) como antígeno H.

Si bien este sistema sigue funcionando, en la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas moleculares (ver más adelante), pero siguiendo la clasificación desarrollada por la serotipificación. De este modo, a pesar de que estas técnicas no utilizan antisueros, se les continúa llamando “serovariedades” a los diferentes grupos de entidades subespecíficas de *B. thuringiensis*. Las limitaciones de la serotipificación (detalladas en la tabla 5.3) hacen necesario el desarrollo de nuevas técnicas de identificación subespecífica, enfocadas en aumentar la confiabilidad y ofrecer más información (Xu & Côté, 2008). Las principales técnicas moleculares desarrolladas hasta la fecha se detallan en secciones subsecuentes.

Tabla 5.3. Limitaciones de la serotipificación de cepas de *B. thuringiensis* conocidas hasta la fecha

<ul style="list-style-type: none"> ♦ Reactividad cruzada con cepas de <i>B. cereus</i>
<ul style="list-style-type: none"> ♦ Algunas cepas son “autoaglutinables” (reaccionan sin antisuero)
<ul style="list-style-type: none"> ♦ Existen cepas no flageladas (no hay reacción)
<ul style="list-style-type: none"> ♦ No se puede elaborar una relación filogenética entre las cepas
<ul style="list-style-type: none"> ♦ Se clausuró parcialmente el IEBC-IP (International Entomopathogenic Bacteria Center-Institut Pasteur)

Fuente: Elaboración propia

Secuenciación de las flagelinas

La técnica más rápida, eficiente y confiable, así como la mejor alternativa para sustituir a la serotipificación, es la secuenciación parcial de uno de los genes de las flagelinas. Una de las principales bondades de esta técnica es que guarda relación directa con la técnica de serotipificación, dado que son precisamente las flagelinas las que tienen reacción cruzada con los anticuerpos de cada serotipo. La estrategia desarrollada

por Xu y Côté (2008) propone diferenciar cepas de Bt, utilizando los mismos nombres subespecíficos de la serotipificación. Además, este método elimina la limitante que presentan las cepas autoaglutinantes, pues se basa en la comparación de las secuencias de las proteínas del flagelo, específicamente del gen *hag*, a pesar de que se han reportado cinco secuencias de los genes del flagelo de Bt: *hag*, *fliC*, *flaA*, *flaB* y *flaC*.

Es importante anotar que la flagelina Hag es la que provoca la reacción inmunológica en la técnica de serotipificación.

La técnica se basa en la amplificación parcial (aunque casi es el ORF completo) por PCR de la flagelina, utilizando los cebadores para la flagelina FlaA y para la flagelina Hag descritos por Santos-Mendoza, Ibarra, Delecluse y Juárez-Pérez (2002). Una vez obtenido el amplicón respectivo, es secuenciado y traducido a la secuencia de aminoácidos, que se somete a análisis Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para identificar a qué serovariedad corresponde. Si bien no existe una base de datos específica para realizar este análisis, el BLAST en línea es suficientemente confiable. Una de las ventajas de esta técnica es que se pueden predecir las relaciones filogenéticas de las diferentes serovariedades de Bt. En la figura 5.6 se presenta un dendrograma desarrollado a partir de la comparación de las secuencias del gen *flaA* de casi todas las cepas tipo de Bt.

Identificación por secuenciación multilocus

La identificación por secuenciación multilocus o MLST (por sus siglas en inglés) es una poderosa herramienta reciente en la determinación de relaciones genéticas y se emplea en taxonomía bacteriana. Es un método de caracterización de aislados microbianos por medio de la secuenciación de fragmentos internos de genes esenciales para el metabolismo (*house keeping genes*) y se diseñó inicialmente para estudios epidemiológicos. Esta técnica tiene la ventaja de que los datos obtenidos se pueden compartir a través de Internet, sin necesidad de intercambiar cultivos vivos. Para realizar la MLST, fragmentos de aproximadamente 500 pb de longitud de 6 o 7 genes son secuenciados; a cada secuencia se le asigna un marcador alélico y a cada combinación alélica o perfil alélico se le asigna un número de secuencia tipo (Jolley, Chan, & Maiden, 2004). Actualmente, existen bases de datos de combinaciones alélicas de bacterias y hongos para el análisis y comparación de microorganismos que son muy útiles, lo que se ha demostrado para el estudio las bacterias del grupo *cereus* (Soufiane & Côté, 2013).

Para cepas de Bt se utilizan cebadores que amplifican fragmentos de los siguientes genes: *glpF* (glycerol facilitator), *gmk* (guanylate kinase), *ilvD* (dihydroxyacid dehydratase), *pta* (phosphate acetyltransferase),

pur (pyruvate carboxylase), *pycA* (pyruvate carboxylase ATP-binding subunit) y *tpi* (triosephosphate isomerase). Una vez que los amplicones han sido secuenciados, se analizan en línea en el sitio <http://pubmlst.org/bcereus/>, que contiene una base de datos de muchas cepas de Bt, así como de otras especies del grupo *cereus*. Si bien esta es una herramienta altamente confiable, desafortunadamente la base de datos no está completa y deberán incluirse las secuencias de todas las cepas tipo, así como de otras cepas importantes. Sin embargo, es muy útil si se trata de serovariedades frecuentes.

Patrones de plásmidos

Una característica común de muchas cepas de Bt es la presencia de moléculas extra-cromosómicas y auto-replicables o plásmidos, en los que normalmente se localizan los genes de las toxinas Cry. El número y tamaño de estos plásmidos varía considerablemente entre diferentes cepas, oscilando desde un único plásmido hasta 17, y con un tamaño que va desde 1,4 hasta más de 130 kb (Baum & Gonzalez, 1992; Gonzalez & Carlton, 1980). Los plásmidos de Bt se pueden clasificar en dos grupos: 1) plásmidos de bajo peso molecular (< 50 kb), con un alto número de copias, y 2) plásmidos de elevado peso molecular o megaplásmidos (> 50 kb), que comparten secuencias de ADN homólogas (Lereclus, Lecadet, Ribier & Dedonder, 1982). Los plásmidos pequeños afectan la sensibilidad de las esporas a la luz ultravioleta (UV) y están involucrados en la regulación de la temperatura de la síntesis del cristal proteico (Benoit, Wilson, Bull, & Aronson, 1990). Por otro lado, algunos plásmidos pequeños han sido estudiados para el desarrollo de vectores de clonación (López-Meza, Barboza-Corona, Del Rincón-Castro, & Ibarra, 2003). Los megaplásmidos normalmente contienen los genes *cry* que codifican para las proteínas insecticidas que forman el cristal parasporal; sin embargo, son los plásmidos pequeños los que son muy útiles en la discriminación de serovariedades y cepas.

Siendo Bt una bacteria Gram-positiva, la obtención de plásmidos es más complicada que para una Gram-negativa; sin embargo, se han reportado varios métodos de extracción (Ibarra & Federici, 1986; Pérez-García, Basurto Ríos, & Ibarra, 2010).

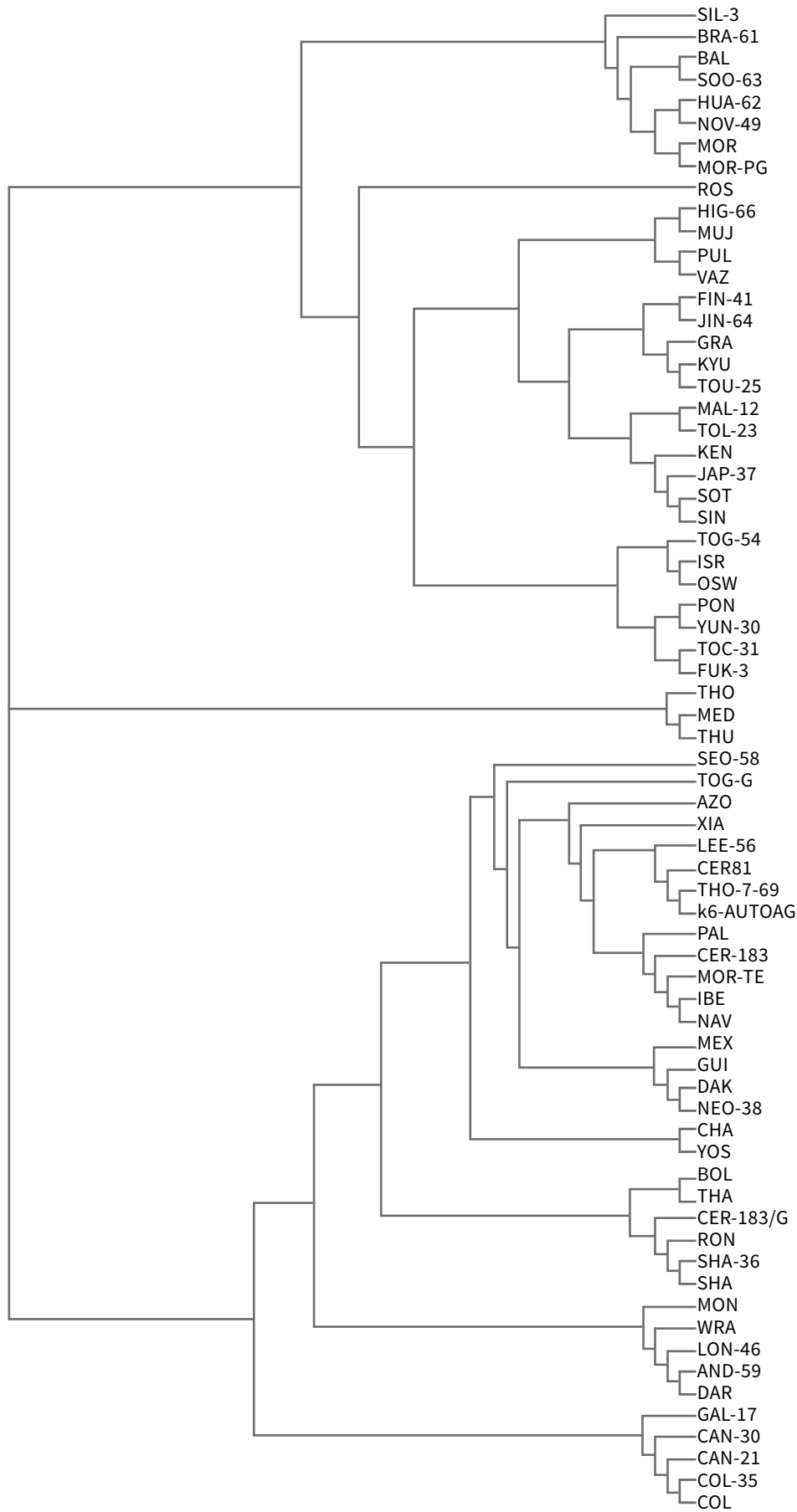


Figura 5.6. Relación filogenética entre cepas tipo de *Bacillus thuringiensis*, obtenida a partir de las secuencias del gen *flaA*.

Fuente: Santos-Mendoza et al., 2002

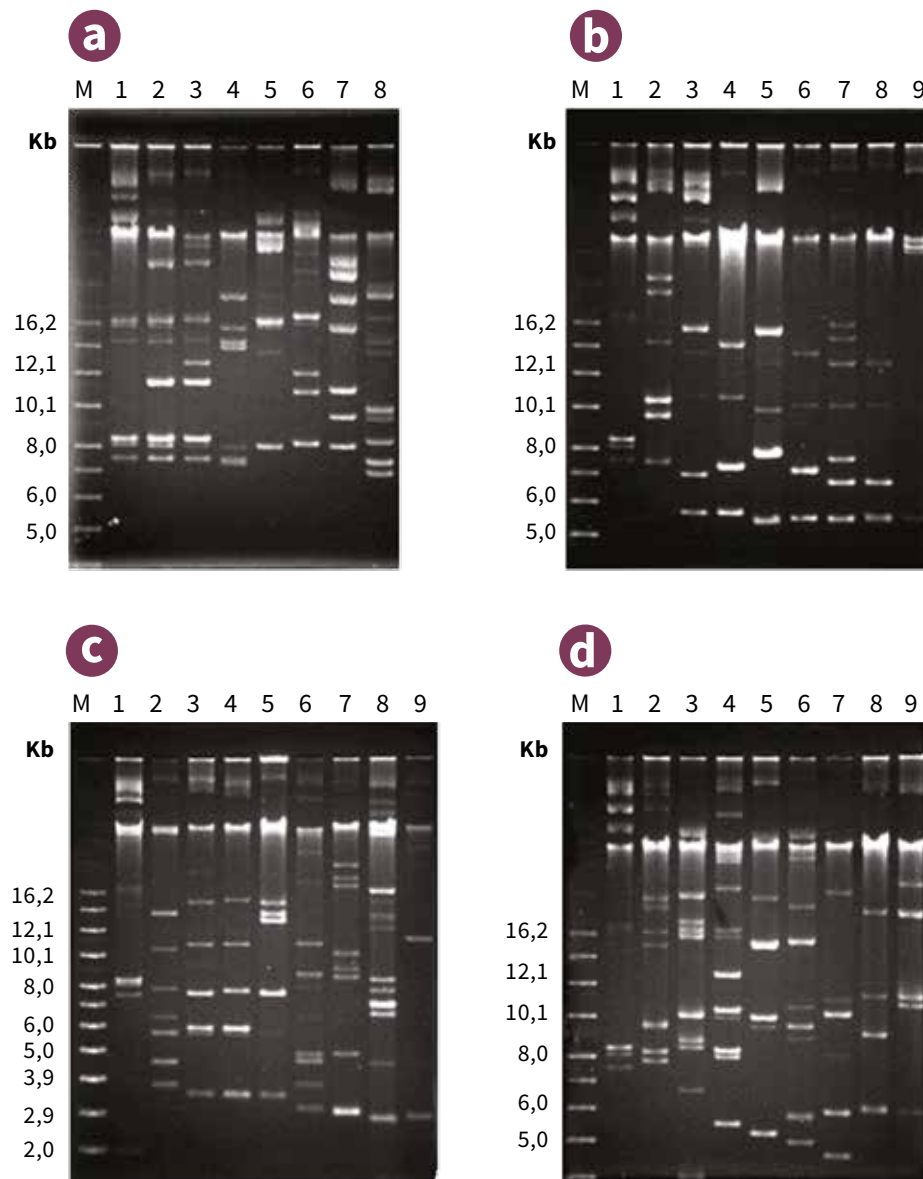


Figura 5.7. Patrón de plásmidos de cepas tipo de *Bacillus thuringiensis*. a. 1. *kurstaki* HD1, 2. *kurstaki* HD73, 3. *tolworthi*, 4. *kenyae*, 5. *galleriae*, 6. *toumanoffi*, 7. *thuringiensis*, 8. *alesti*. b. 1. *kurstaki* HD1, 2. *azorensis*, 3. *amagiensis*, 4. *yunnanensis*, 5. *roskildiensis*, 6. *muju*, 7. *israelensis*, 8. *malaysiensis*, 9. *jinghongiensis*. c. 1. *kurstaki* HD1, 2. *chanpaisis*, 3. *colmeri*, 4. *iberica*, 5. *palmanyolensis*, 6. *coreanensis*, 7. *cameroun*, 8. *kyushuensis*, 9. *guiyangiensis*. d. 1. *kurstaki* HD1, 2. *zhaodongensis*, 3. *seoulensis*, 4. *aizawai*, 5. *kumamotoensis*, 6. *neoleonensis*, 7. *canadensis*, 8. *pakistani*, 9. *medellin*. M. Marcador de peso molecular supercoiled DNA (Invitrogen).

Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenidos los plásmidos de alguna cepa, se separan por electroforesis en geles de agarosa, obteniéndose un patrón de bandas (plásmidos) que es característico de la serovariedad o de la cepa. En un estudio sobre la obtención de los patrones de plásmidos de todas las cepas tipo (Reyes-Ramírez & Ibarra, 2008), se llegó a la conclusión de que no existe una clara correspondencia entre los patrones de plásmidos y las diferentes serovariedades. Más aún, no fue posible obtener bandas polimórficas,

que permitieran elaborar un dendrograma entre las diferentes cepas. Sin embargo, aun cuando los patrones de plásmidos no fueran idénticos entre cepas de la misma serovariedad, estos al menos comparten algunos plásmidos, lo que no ocurre entre cepas de diferente serovariedad. Por otro lado, existen patrones de plásmidos que son únicos para una determinada cepa de Bt, lo que tiene gran importancia en la determinación de derechos de propiedad. Un ejemplo se presenta en la figura 5.7.

Paenibacillus sp.

Las bacterias del grupo *Paenibacillus* se caracterizan por mostrar una espora elipsoide que deforma el esporangio por su tamaño relativamente grande y por ser patógenos obligados, con lo que en el medio ambiente solo se encuentran en su forma esporulada. La falta de crecimiento vegetativo en caldo de cultivo nutritivo ha dificultado el desarrollo comercial de insecticidas basados en estas bacterias. Dos especies principalmente estudiadas, *Paenibacillus* (*Bacillus*) *popilliae* y *Paenibacillus* (*Bacillus*) *lentimorbus* (Dutky, 1963), son las causantes de la “enfermedad láctea” en larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*) y en

otras especies de escarabajos (Klein & Jackson, 1992). Inicialmente, la diferenciación de las dos especies se basó en la presencia de un cristal paraesporal en *P. popilliae* y su ausencia en *P. lentimorbus*. Posteriormente, la tipificación molecular confirmó los dos grupos de especies, pero indicó que la diferenciación con base en el cristal paraesporal no era adecuada, ya que este puede estar presente o ausente en ambas especies (Harrison, Patel, & Yousten, 2000). El análisis molecular también mostró variación intraespecífica, que puede ser relacionada con el lugar geográfico del aislamiento y con la especificidad del huésped (Dingman, 2009; Rippere, Tran, Yousten, Hilu, & Klein, 1998).

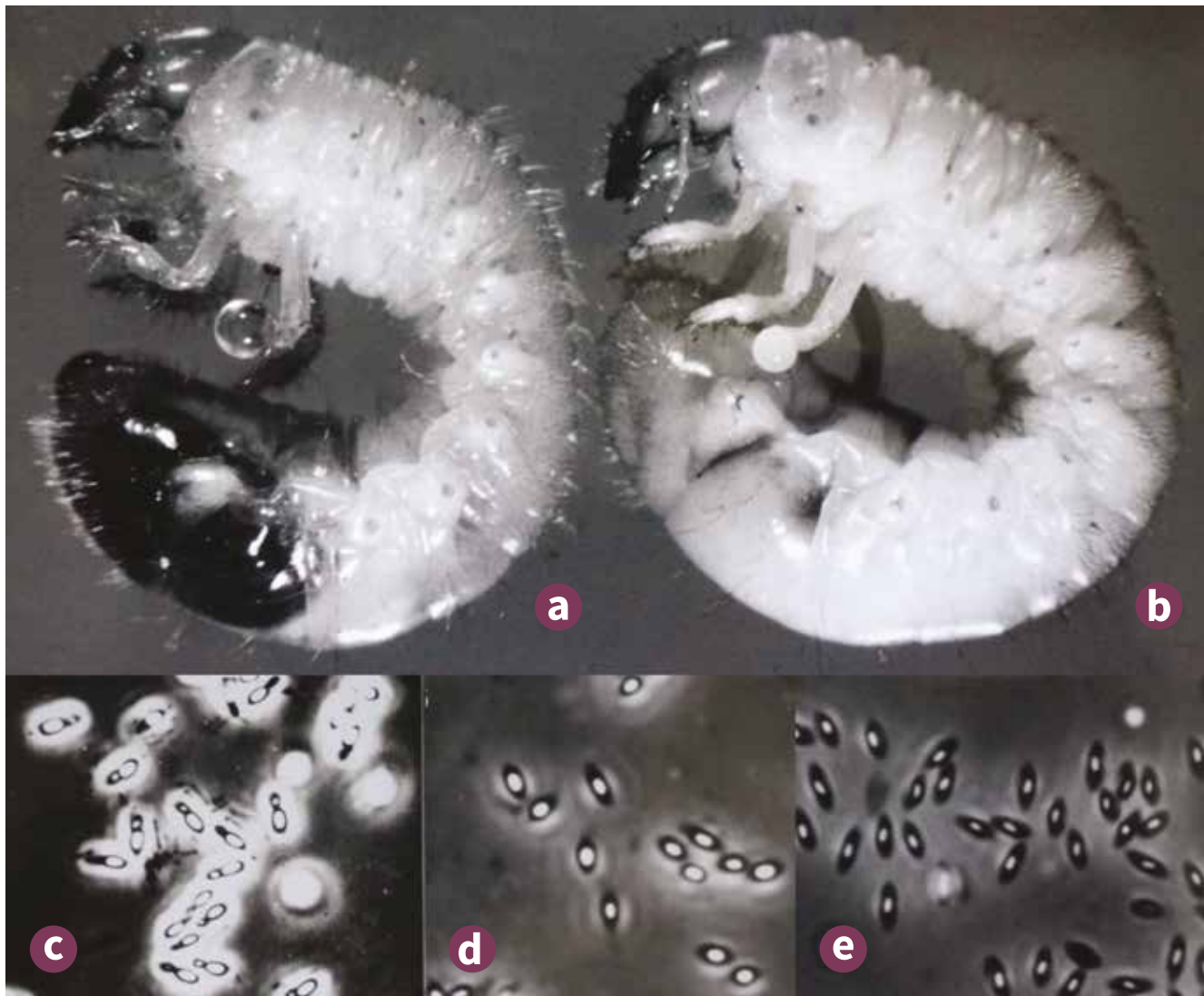


Figura 5.8. Enfermedad láctea en larvas del escarabajo, *Popillia japonica*, causada por *Paenibacillus popilliae*. a. Larva sana con hemolinfa clara; b. Larva infectada de color blanco y hemolinfa blanquecina; c. Esporas típicas Tipo A1 con espora y paraespora (Tipo huella); d. B1; e. B2 sin paraespora.

Fuente: Adaptada de Klein y Jackson (1992)

Tras la ingestión por la larva huésped, las esporas de *P. popilliae* germinan en los fluidos intestinales y las células vegetativas producidas logran llegar a la base del epitelio intestinal, donde comienzan a proliferar (Splittstoesser, Tashiro, Lin, Steinkraus, & Fiori, 1973). Las toxinas que acompañan al cristal parasporal pueden tener importancia para la disrupción del epitelio intestinal (Zhang, Hodgman, Krieger, Schnetter, & Schairer, 1997), facilitando la invasión de la hemolinfa por la bacteria, aun cuando las cepas sin cristal pueden ser tan patogénicas como las que lo tienen. Luego de este paso, suceden episodios de esporulación y germinación en la hemolinfa del huésped hasta que la acumulación de esporas da lugar al característico color blanquecino de la hemolinfa, que da nombre a la enfermedad (*láctea*). Las esporas son liberadas del cadáver y permanecen listas para un nuevo episodio de infección en el suelo (figura 5.8).

Otra especie del mismo género, *Paenibacillus larvae*, es reconocida como la causa de la Loque Americana de abejas melíferas, que se ha distribuido con las abejas domésticas en muchas partes del mundo (James & Li, 2012).

Lysinibacillus sphaericus

La bacteria *Lysinibacillus sphaericus* (figura 5.9), anteriormente denominada como *Bacillus sphaericus*, es generalmente reconocida por la producción de una espora esférica localizada en posición terminal de un esporangio que aparece deformado. La bacteria ha sido

comúnmente aislada de muestras de suelo (Monnerat et al., 2004; Monnerat, Nicolas, Frachon, & Hamon, 1992), estanques eutróficos (Yousten, Fretz, & Jelley, 1985), e insectos (Kellen et al., 1965). *L. sphaericus* probablemente se compone de una serie de especies relacionadas (Gómez-Garzón, Hernández-Santana, & Dussán, 2016), que pueden ser agrupadas por la homología del ADN (*L. sphaericus* DNA homology group IIA), pero no son fácilmente distinguibles a nivel morfológico (Krych, Johnson, & Yousten, 1980). La evaluación realizada a 35 cepas indicó que estas eran casi clonales (Ge, Hu, Zheng, Wu & Yuan, 2011). Los mayores niveles de toxicidad de las cepas de *L. sphaericus* se presentan contra los mosquitos *Culex*, *Anopheles* y *Mansonia*, con niveles de toxicidad variable contra los géneros *Aedes* y *Ochlerotatus* (Berry, 2012). También se ha reportado actividad contra las moscas de arena, *Phlebotomus* sp. (Robert et al., 1997; Wahba, 2000; Wermelinger, Zanuncio, Rangel, Cecon & Rabinovitch, 2000) y otros invertebrados (Bone & Tinelli, 1987; Key & Scott, 1992).

La actividad insecticida de la bacteria se debe mayormente a la producción de toxinas binarias (Bin) durante la esporulación, incluyendo algunas toxinas Cry de *B. thuringiensis* como la Cry48-Cry49, y toxinas mosquitocidas (Mtx) durante la fase vegetativa. Estas toxinas reconocen receptores específicos en el intestino (Silva-Filha, Nielsen-LeRoux, & Jean-François, 1999), y su acción provoca la destrucción del epitelio intestinal (Singh & Gill, 1988), facilitando la invasión de la hemolinfa y septicemia. El aislamiento de nuevas cepas de *L. sphaericus* con alta eficacia

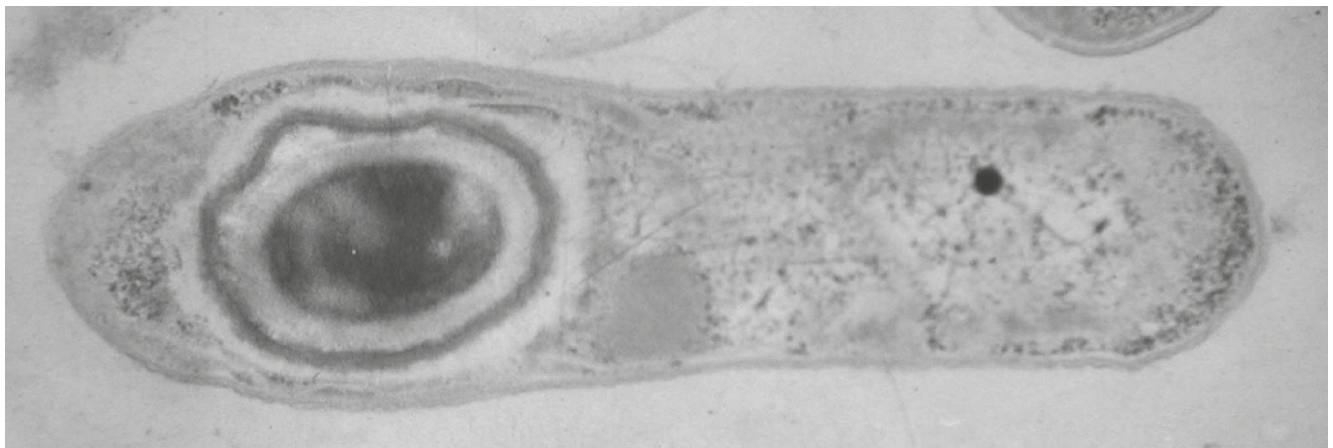


Foto: Jorge Ibarra

Figura 5.9. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de *Lysinibacillus sphaericus*. Imagen tomada con un microscopio Phillips Morgani operado a un voltaje de aceleración de 70 kV y 5600X de magnificación.

contra mosquitos (Hire, Hadapad, Vijayalakshmi & Dongre, 2010; Park, Mangum, Zhong, & Hayes, 2007), sugiere el potencial de poder desarrollar productos mosquitocidas más eficaces basados en esta bacteria.

Bacterias Gram-negativas

Como grupo, las bacterias Gram-negativas se caracterizan por la ausencia de esporas y pueden encontrarse en forma de bacilos y cocos, como especies de aerobios y anaerobios facultativos. Asimismo, las bacterias Gram-negativas están ampliamente distribuidas y son abundantes en el medio ambiente; de esta manera, no es sorprendente encontrarlas y siempre pueden ser aisladas de insectos muertos o enfermos. Cuando comenzó el desarrollo de la patología de insectos, los investigadores dedicaron considerables esfuerzos al aislamiento y diagnóstico de enfermedades asociadas a bacterias Gram-negativas (Bucher, 1981; d'Herelle, 1911). No obstante, estos estudios fueron perdiendo credibilidad, debido a la inestabilidad de las bacterias, ya que no poseen estructuras de resistencia como las esporas; además, se presentaron inconsistencias en la

obtención de efectos patogénicos y en la mortalidad del insecto, probablemente debido a que la mayoría de especies son patógenos oportunistas. En contraste con la diversidad de bacterias entomopatógenas del género *Bacillus*, solo unas cuantas especies de bacterias no formadoras de esporas se han confirmado como entomopatógenas.

Serratia sp.

Algunos miembros del género *Serratia* pueden infectar un amplio rango de huéspedes, incluyendo plantas, vertebrados e invertebrados (Grimont & Grimont, 1978; Hejazi & Falkiner, 1997; Inglis & Lawrence, 2001). Los primeros registros de *Serratia* como patógeno de insectos se realizaron a partir de cadáveres de gusanos de seda que tenían un color rojizo (Steinhaus, 1941). La bacteria causante, *Serratia marcescens* (figura 5.10), produce grandes cantidades de enzimas degradadoras como lecitinasas, quitinasas (Lysenko, 1976) y proteasas (Kaška, 1976), que ayudan a la invasión de la cavidad hemocélica en la que la bacteria se multiplica rápidamente y el insecto muere por septicemia (figura 5.11) (Podgwaite & Cosenza, 1976). Muchas cepas de *S. marcescens* son activas por vía oral contra un gran número de especies de insectos, incluyendo la mosca tsetse (*Glossina* spp.) (Poinar, Wassink, Leegwater-van der Linden, & van der Geest, 1979), el gusano bellotero del maíz (*Helicoverpa zea*) (Robert, Farrar, Phyllis, Martin, & Ridgway, 2001), la mosca voladora (*Lucilia sericata*) (O'Callaghan, Garnham, Nelson, Baird, & Jackson, 1996) y los escarabajos de mayo (*Melolontha melolontha*) (Jackson & Zimmermann, 1996). Sin embargo, aunque en algunos experimentos se alcanzan altos niveles de patogenicidad, la variabilidad de las respuestas y la preocupación por su relación con patógenos humanos ha limitado la investigación sobre *S. marcescens* como un plaguicida microbiano.

En contraste, algunas cepas de *Serratia proteamaculans* y de una nueva especie, *Serratia entomophila*, causan la enfermedad ámbar en las larvas del gusano blanco de la hierba, *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Grimont, Jackson, Ageron, & Noonan, 1988; Stucki, Jackson, & Noonan, 1984). C.

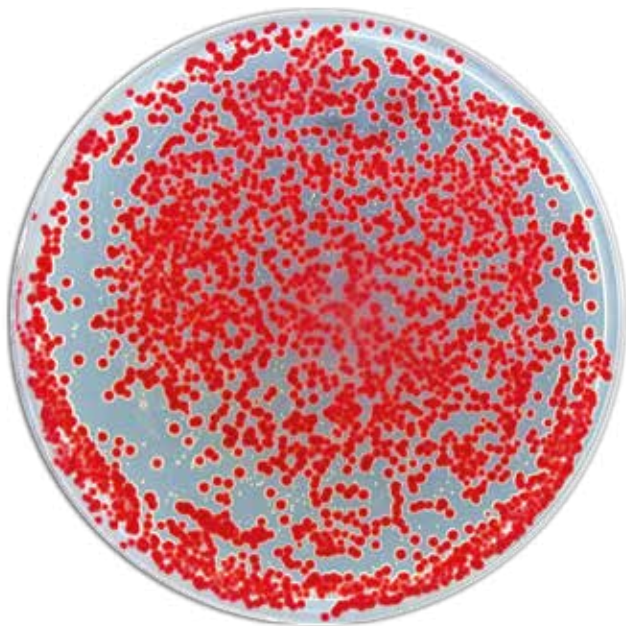


Foto: Jorge E. Ibarra

Figura 5.10. Vista macroscópica de colonias de *Serratia marcescens*, mostrando su típico pigmento de prodigiosina.



Fotos: Trevor Jackson

Figura 5.11. Larvas del escarabajo *Costelytra givenii*. a. Larva sana; b. Larva con infección crónica de *Serratia entomophila*; c. Larva muerta con septicemia causada por *Yersinia entomophaga*.

zealandica es una plaga endémica y ubicua en Nueva Zelanda, donde se alimenta de las raíces de hierbas, tréboles y de un amplio rango de plantas comerciales, incluyendo los cultivos de cereales. Las larvas suelen alcanzar niveles perjudiciales después de 2 a 4 años de la siembra, causando parches de daño en el pasto que se incrementan en tamaño año tras año (Kain & Atkinson, 1970). En algunos casos, se han registrado más de 400 larvas por m², lo que ocasiona pérdida en la producción e inhibición de la regeneración de las pasturas (Stucki et al., 1984).

A la fecha, solo otros tres aislamientos geográficamente distintos de *S. entomophila* han sido registrados en el mundo: 1) una cepa no patogénica aislada de un pozo de agua en Francia; 2) el aislamiento Mexicano Mor. 4.1, reportado para el control del gusano blanco *Phyllophaga blanchardi* (Núñez-Valdez et al., 2008) y 3) la cepa de *S. entomophila* AB2, aislada del gusano del algodón *Heliothis armigera* en India (Chattopadhyay, Gorthi, Chatterjee & Sen, 2011). Sin embargo, se necesita una alta dosis de *S. entomophila* para el control de *H. armigera*, el gusano africano del algodón (*Spodoptera littoralis*) y las larvas de la polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) (Chattopadhyay, Chatterjee, Gorthi & Sen, 2012).

La enfermedad del gusano blanco de la hierba, denominada “enfermedad ámbar”, fue identificada mediante el reconocimiento de una condición inusual: la aparición de una coloración crema o blanca en las larvas, asociada con la disminución de la población en los estudios en campo (Trought, Jackson & French, 1982). Después de que la larva ingiere las cepas patogénicas de *S. entomophila* o de *S. proteamaculans*, estas dejan de alimentarse de 2 a 5 días. El rápido inicio de la inanición de las larvas antes de morir evita nuevos daños en las pasturas. El intestino de las larvas, que normalmente es de color oscuro, cambia y las larvas toman una característica coloración ámbar (Jackson, Huger & Glare, 1993). Los niveles de las principales enzimas digestivas, tripsina y quimotripsina, disminuyen abruptamente al tiempo que el intestino cambia su color.

En contraste con muchas otras bacterias entomopatógenas, se ha observado que no hay destrucción o formación de ampollas en el epitelio del intestino medio dentro del tracto alimenticio (Jackson et al., 1993). Las larvas pueden permanecer en este estado de enfermedad por un período prolongado (1 a 3 meses) antes de que la bacteria eventualmente invada el hemocele, resultando en la rápida muerte del insecto

por septicemia (Jackson et al., 1993; Jackson, Boucias, & Thaler, 2001). En relación con el ciclo de vida de las larvas (aproximadamente 7 a 8 meses), el período de la enfermedad representa un tiempo extenso, denominándose entonces una infección crónica. La dosis letal media (DL_{50}) para *S. entomophila* cepa 154 contra la larva del gusano blanco de la hierba fue calculada entre 2×10^4 a 4×10^4 células/larva (Jackson et al., 2001).

La diferenciación de las formas patogénicas y no patogénicas, entre aislamientos de dos especies de *S. entomophila* y *S. proteamaculans* colectados en campo, fue resuelta mediante la identificación de un plásmido asociado con los aislamientos patogénicos (Glare, Corbett, & Sadler, 1993; Grkovic, Glare, Jackson, & Corbett, 1995). Los factores de virulencia de *S. entomophila* y de *S. proteamaculans* son codificados sobre un gran plásmido conjugativo denominado pADAP (por las siglas en inglés de “amber disease associated plasmid”) o “plásmido asociado a la enfermedad ámbar” (Glare et al., 1993). El plásmido pADAP codifica dos regiones asociadas a la virulencia: 1) un complejo de toxinas (TC) activas en el insecto, denominadas *sepABC* (“*S. entomophila* pathogenicity” o “patogenicidad de *S. entomophila*”) (Hurst, Glare, Jackson, & Ronson, 2000) y 2) el profago AFP (antifeeding prophage), que inhibe la alimentación. Los TC fueron identificados en el nematodo vector de la bacteria *Photorhabdus luminescens* (Bowen et al., 1998) y han sido identificados en un rango diverso de bacterias incluyendo *Bacillus* y algunas especies fúngicas. Generalmente, los TC están compuestos por tres proteínas denominadas TC-A, TC-B y TC-C, que se combinan para formar un complejo con actividad insecticida (Ffrench-Constant & Waterfield, 2005). Los aminoácidos que componen la proteína TC-A varían de acuerdo con el rango de hospederos (Sergeant, Jarrett, Ousley, & Morgan, 2003; Waterfield, Hares, Yang, Dowling, & Ffrench-Constant, 2005), mientras que los componentes de la proteína TC-C son los principales efectores de la toxina (Hurst et al., 2000).

El segundo factor de virulencia en el plásmido pADAP es el profago que inhibe la alimentación, región codificante AFP, formada por un grupo de 18 genes, cuyos productos se combinan para formar una estructura similar a un virus. La ingestión de este profago por la larva del gusano blanco de la hierba hace que cese su alimentación (Hurst, Glare,

& Jackson, 2004; Hurst, Jones, Tan, & Jackson, 2007). Los productos traducidos de *afp1-afp16* forman la partícula de tipo fago AFP, mientras que se ha propuesto que *afp17* y *afp18* codifican los componentes de la toxina llevados por el AFP (Hurst et al., 2004). Ortólogos del gen AFP, denominados como PVC (de la sigla de *Photorhabdus virulence cassettes*) o “cassettes de virulencia de *Photorhabdus*”, fueron identificados en el genoma de *P. luminescens* TTO1 (Hurst et al., 2004). Los genes PVC codifican para un rango de toxinas, incluyendo MCF y LopT (Hurst et al., 2004; Yang, Dowling, Gerike, Ffrench-Constant, & Waterfield, 2006). Basados en datos bioinformáticos, estructurales y de predicción de función, el AFP ha sido descrito como una variante libre de células del sistema de secreción tipo VI (Bönemann, Pietrosiuk, & Mogk, 2010; Zhang, De Souza, Anantharaman, Iyer, & Aravind, 2012).

La capacidad de toxinas como AFP para detener la alimentación del insecto reduce la cantidad de materia orgánica que entra en su intestino, disminuyendo así la tasa de los procesos metabólicos en el insecto. La reducción en el paso de alimentos a través del intestino a su vez facilita el establecimiento de *S. entomophila* dentro de este. La cepa *S. proteamaculans* 143, que no contiene la AFP pero posee los ortólogos de Sep TC, muestra una patogenicidad variable hacia el gusano blanco de la hierba, del que aproximadamente un 65% de los insectos infectados sucumben a la enfermedad ámbar, mientras que el otro 35% permanecen saludables (Glare et al., 1993; Hurst, Becher, & O'Callaghan, 2011). Esto puede evidenciar que en esta instancia el patógeno es incapaz de establecerse en el subconjunto de larvas sanas.

Aislamientos patogénicos y no patogénicos de *S. entomophila* han sido descritos por Dodd, Hurst, Glare, O'Callaghan y Ronson (2006) y Glare et al. (1993); generalmente, estas bacterias se encuentran en niveles entre 1×10^3 y 1×10^5 bacterias/g de suelo de pasto (O'Callaghan, Young, Barlow & Jackson, 1999). En la evaluación de cepas de *Serratia* a partir de suelos relativamente desprovistos de larvas del gusano blanco de la hierba, se ha encontrado que la mayoría de los aislamientos no son patogénicos (O'Callaghan et al., 1999). En ausencia de patógenos o predación, las poblaciones del gusano blanco de la hierba se incrementarán año tras año, hasta que

eventualmente la enfermedad entre en el sistema. Este escenario es acorde con la epidemiología de las enfermedades, en la que las poblaciones de larvas de *C. zealandica* se incrementan por un período cercano a los 5 años antes de sufrir una disminución natural como resultado de la enfermedad. Durante este tiempo, hay un aumento simultáneo en el número de *S. entomophila* en campo (O'Callaghan et al., 1999). Por otra parte, la presencia de la enfermedad en un porcentaje mayor al 20% da como resultado una probabilidad mayor al 90% de su disminución (Jackson, Townsend, & Barlow, 1999). El impacto de las epizootias naturales de la enfermedad ámbar sobre las poblaciones del gusano blanco de la hierba estimuló la selección de una cepa y su desarrollo como un biocontrolador comercial (Jackson, Pearson, O'Callaghan, Mahanty, & Willcocks, 1992).

Yersinia entomophaga

En contraste con la naturaleza crónica y la especificidad del huésped de *S. entomophila*, el patógeno Gram-negativo *Yersinia entomophaga* puede actuar contra diversas especies de insectos y parece ser promisorio como un bioplaguicida. El género *Yersinia* es mejor conocido por *Yersinia pestis*, causante de la peste bubónica, y que coloniza el tracto alimenticio de la pulga de la rata, *Xenopsylla cheopis* (Jarrett et al., 2004). Las investigaciones más recientes sobre la actividad insecticida de *Yersinia* spp. se han focalizado en su posible papel en la virulencia cuando se administró oralmente a larvas neonatas o por inyección en el hemocele. Los resultados sugieren que estas cepas son solo débilmente patógenas. Por ejemplo, Champion et al. (2009) mostraron que 1×10^6 unidades formadoras de colonia (UFC) de *Y. pseudotuberculosis* IP32953 fueron requeridas para causar una mortalidad del 53% cuando se inyectaron en larvas de *G. mellonella*. La secuenciación de los genes ha revelado que genes homólogos del τC son comunes entre aislamientos de *Yersinia* (Fuchs, Bresolin, Marcinowski, Schachtner, & Scherer, 2008), pero estos expresan alta variabilidad en términos de la actividad insecticida.

La mayor letalidad oral de las larvas del gusano del tabaco (*Manduca sexta*) fue obtenida con cepas de

Yersinia, que contenían el determinante de patogenicidad de τC . Por su parte, Bresolin, Morgan, Ilgen, Scherer y Fuchs (2006) encontraron que la baja temperatura fue crítica para la inducción de la transcripción del gen τC y de la patogenicidad de extractos celulares completos de *Y. enterocolitica* hacia *M. sexta*.

La bacteria *Y. entomophaga*, aislada a partir del cadáver de *C. zealandica*, es patógena por vía oral sobre un amplio rango de especies de coleópteros y lepidópteros, incluyendo especies no endémicas al país de origen, como la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) (Hurst Becher, Young, Nelson, & Glare, 2011). La dosis letal media a los seis días por vía oral es aproximadamente 3×10^4 células bacterianas de *Y. entomophaga* por larva de *C. zealandica*. Durante el proceso de infección, las larvas vomitan, expulsando frágiles gránulos y cambiando su apariencia de grisácea en su estado saludable a color ámbar y ya moribundas a color marrón. Este proceso de enfermedad está acompañado por una disminución en la alimentación. Las bacterias entran a la cavidad hemocélica 48 horas después de su ingestión; paso seguido, causan la rápida muerte del insecto (Hurst, van Koten, & Jackson, 2014). El principal determinante de virulencia de *Y. entomophaga* es un τC derivado activo en el insecto denominado como Yen- τC . Los componentes de Yen- τC son codificados sobre aproximadamente 32-kb y designados como PAI_{Ye96}. La ausencia de algunos determinantes de movilidad sugieren que PAI_{Ye96} puede ser heredado de forma estable y solo se transmite verticalmente (Hurst, Jones, et al., 2011).

Estudios histológicos en los que se evalúa el efecto de la toxina Yen- τC purificada o la bacteria sobre larvas de *C. zealandica* mostraron que el intestino medio de las larvas se deterioró en un período cercano a las 96 horas (Marshall et al., 2012). En el estado inicial de la enfermedad, *Y. entomophaga* puede ser observada en la membrana peritrófica, en el sitio de unión entre el intestino posterior y el saco de fermentación. Se cree que en esta región es donde las quitinasas asociadas a Yen- τC degradan la membrana peritrófica, permitiendo que la bacteria ingrese a la cavidad hemocélica (Hurst et al., 2014). La producción de Yen- τC es dependiente de la temperatura, ya que grandes cantidades se liberan a 25 °C, pero no a

37 °C (Hurst, Jones, et al., 2011), una característica que afecta a la virulencia de la bacteria. La inyección de *Y. entomophaga* o un derivado en el que el grupo de genes Yen-TC ha sido eliminado reveló una dosis letal media a los 4 días de aproximadamente tres células bacterianas por larva. Este número de bacterias es similar al número que se requiere de *P. luminescens* para causar letalidad por inyección intra-hemocélica. El bajo valor requerido a nivel intra-hemocélico indica que la bacteria puede haber evolucionado para sobrevivir en la cavidad hemocélica del insecto (Hurst et al., 2015).

La rápida tasa de mortalidad de *Y. entomophaga* indica que la bacteria probablemente pueda ser usada como una medida curativa para el manejo de plagas de insectos. Investigaciones realizadas en campo sobre la eficacia y persistencia de la bacteria *Y. entomophaga*, aplicada como un cebo activo de porina (*Wiseana* spp.), han encontrado que el número de bacterias se reduce hasta ser indetectable, aproximadamente 160 días después de la aplicación en campo (Ferguson et al., 2012). Recientes ensayos de campo en los que se evaluó *Y. entomophaga* aplicada como un cebo presentaron un control entre el 70 y 80% sobre adultos del escarabajo negro (*Heteronychus arator*) (Hurst, datos sin publicar). Actualmente, la bacteria se encuentra en los estados finales de evaluación en campo y de su toxicidad, así como en pasos previos para su registro y comercialización. Sin embargo, el hecho de que algunas especies de *Yersinia* sean reconocidas como patógenos humanos, el uso de *Y. entomophaga* abre interrogantes sobre su uso como agente de control biológico (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012).

Bacterias simbiotas de nematodos

Las bacterias entomopatógenas simbiotas de nematodos pertenecen al género *Photorhabdus* o *Xenorhabdus*, y requieren ser transportadas por el nematodo con el que se asocian (*Heterorhabditis* o *Steinernema*, respectivamente) para tener un efecto en el hemocele del insecto (French-Constant, Dowling, & Waterfield, 2007; Owuama, 2001). Una vez que se establece el contacto con un insecto, el nematodo penetra físicamente la cutícula de este y regurgita la bacteria

simbionte directamente en su hemocele. El rápido cambio en el medio ambiente durante la transición desde el nematodo al insecto objetivo desencadena la liberación a gran escala de metabolitos bacterianos y toxinas, incluidos los miembros de la familia TC. A la fecha, el uso comercial de estas bacterias endosimbiontes está relacionado con el uso de las especies de nematodos con las que se asocian (Lacey & Georgis, 2012).

Chromobacterium spp.

Chromobacterium subtsugae es una bacteria Gram-negativa con forma de bacilo, que pertenece a las betaproteobacterias (Hoshino, 2011). Se ha encontrado que posee alta actividad insecticida contra especies de insectos de diversos órdenes (Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera), en las que se incluye el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), el gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*) y la chinche apestosa (*Nezara viridula* L.) (Martin, Hirose, & Aldrich, 2007; Martin, Gundersen-Rindal, Blackburn & Buyer, 2007). El modo de acción de *C. subtsugae* es complejo, ya que emplea diferentes metabolitos que tienen efecto insecticida (Asolkar, Huang, Koivunen, & Marrone, 2015). La cepa PRAA4-1T de *C. subtsugae* ha sido desarrollada como ingrediente activo del insecticida Grandevio® (Marrone BioInnovations Incorporated, Davis, CA, USA) para usar contra un amplio espectro de especies de insectos masticadores y chupadores, incluyendo el ácaro de dos manchas (*Tetranychus urticae*) (orden Trombidiformes).

Pseudomonas spp.

Se han identificado varias *Pseudomonas* spp. asociadas a las raíces de las plantas que son activas contra insectos, como *Pseudomonas protegens*, *P. chlororaphis* y *P. entomophila* (Kupferschmied, Maurhofer & Keel, 2013). La bacteria *P. protegens* Pf-5 (comúnmente *Pseudomonas fluorescens* Pf-5) y *P. protegens* CHA0 fueron aisladas a partir de los llamados “suelos supresivos”, en los que la enfermedad no ocurre bajo condiciones óptimas para el desarrollo de patógenos de las plantas (Kinkel, Bakker & Schlatter, 2011).

La cepa CHA0 de *P. protegens* es activa oralmente en numerosas especies de lepidópteros, tales como *S. littoralis*, el gusano del tabaco (*H. virescens*) y la polilla dorso de diamante (*P. xylostella*) (Ruffner et al., 2013). Ortólogos de la toxina activa contra insectos afectados por *Photorhabdus* se encuentran presentes en el genoma de *P. protegens* Pf-5 y *P. protegens* CHA0, incluyendo la toxina Mcf anteriormente mencionada de *Photorhabdus luminescens*. En el aislamiento CHA0 de *P. protegens*, un ortólogo de Mcf codificado por el gen *fitD* es parte de los componentes de un gran grupo de genes (*fitA-E*), que —según se ha propuesto— median en el transporte de FitD (Mcf) fuera de la célula bacteriana (Pechy-Tarr et al., 2013). Además, ortólogos de *fit* han sido identificados en los genomas de *P. protegens* Pf-5 y *P. chlororaphis* (Loper et al., 2012; Ruffner et al., 2013; Shen, Hu, Peng, Wang & Zhang, 2013). Tanto *P. protegens* como *P. chlororaphis* tienen actividad por vía oral contra *S. littoralis*, *H. virescens* y *P. xylostella*, mientras que las cepas de *P. protegens* CHA0 deficientes de *fit* no poseen actividad por vía oral (Ruffner et al., 2013).

La bacteria *P. protegens* CHA0 parece ser trasladada directamente dentro del hemocele del gusano de la col después de 24 horas de ingerirla por vía oral, mediante un mecanismo que aún no está definido (Kupferschmied et al., 2013). La bacteria es altamente letal aún en bajas dosis cuando se inyecta en el hemocele de larvas de *M. sexta* y *G. mellonella* (Péchy-Tarr et al., 2008). La capacidad de esta bacteria para sobrevivir dentro del hemocele sugiere que, al igual que las bacterias asociadas a nematodos *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* o a *Y. entomophaga*, *P. protegens* CHA0 tiene la capacidad de suprimir, evadir o sobreponerse al sistema inmune del insecto.

Otro miembro de las Pseudomonadaceae es *P. entomophila*, una bacteria ubicua que infecta por vía oral larvas de insectos de diferentes órdenes, causando grandes daños en las células intestinales. *P. entomophila* es patógena en larvas y adultos de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) cuando se aplica en altas dosis (Vodovar et al., 2005). La bacteria codifica numerosos determinantes de virulencia entomo-activos (Vodovar et al., 2006), como la toxina proteica formadora de poros monalisina, que causa un daño particularmente significativo en las células

intestinales de *D. melanogaster* (Opota et al., 2011). Además de la monalisina, *P. entomophila* también alberga toxinas relacionadas con τ c, incluyendo hemolisinas y lipopéptidos (Vodovar et al., 2006).

Burkholderia spp.

Otro miembro de las Betaproteobacteria, *Burkholderia* sp. (familia Burkholderiaceae), ha sido recientemente reportado por afectar la oviposición y la fecundidad del insecto del fríjol (*Riptortus pedestris*) (Hemiptera) (Kil et al., 2014). Una nueva cepa de *Burkholderia* aislada en el suelo de Japón e identificada como *Burkholderia rinojensis* sp. nov. cepa A396 se estableció como entomopatogénica (Cordova-Kreylos et al., 2013). Se ha encontrado que los sobrenadantes estables al calor de los caldos de cultivo de A396 tienen efecto tanto a nivel oral como por contacto contra el gusano común de la remolacha (*Spodoptera exigua*) y el ácaro de dos manchas (*Tetranychus urticae*).

Aunque los miembros de *Pseudomonas* y *Burkholderia* aún no han sido desarrollados como productos comerciales, las propiedades entomopatogénicas de estas bacterias sugieren su uso potencial como bioplaguicidas efectivos. No obstante, al no tener una etapa de reposo o dormancia, los patógenos Gram-negativos que no forman esporas son susceptibles a variables externas, limitando su uso en ambientes hostiles tales como aplicaciones foliares. La susceptibilidad a factores ambientales de las bacterias no formadoras de esporas afecta la persistencia y la eficacia de estos patógenos después de su aplicación en campo. Por lo tanto, el desarrollo de tecnologías mejoradas de formulación y aplicación podrían ayudar a superar dichos inconvenientes.

Recientemente, se han encontrado numerosas bacterias entomopatógenas Gram-negativas que pueden actuar como promotoras de crecimiento de plantas, con algunas cepas capaces de formar relaciones endosimbióticas con su planta de origen (Kergunteuil et al., 2016; Kupferschmied et al., 2013). Estas cepas, cuando se utilizan con el huésped apropiado y se aplican en el ambiente adecuado, deben mejorar a largo plazo la persistencia del microorganismo aplicado.

Historias de éxito y aplicación

El mejor ejemplo de éxito en el uso de bacterias entomopatógenas es *B. thuringiensis*, ya que aproximadamente el 95% de los bioplaguicidas a base de bacterias que se comercializan tienen como ingrediente activo Bt (Mnif & Ghribi, 2015); además, su mercado global estimado a finales del siglo sobrepasa los US\$110 millones por año (Whalon & Wingerd, 2003) y continúa con un crecimiento progresivo. Se han desarrollado diferentes tipos de formulaciones, la gran mayoría utilizando como ingrediente activo esporas y cristales Cry a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis* var. Kurstaki (Btk) cepa HD1, que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa; *B. thuringiensis* var. Aizawai cepa HD137, que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca y Cry1Da; *B. thuringiensis* subsp. *san diego* y *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, que contienen la toxina Cry3Aa, y *B. thuringiensis* var. *Israelensis* con las toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1Aa (Schünemann, Knaak, & Fiuza, 2014).

Federici (2007) consideró que la principal razón para el éxito de Bt como bioplaguicida comercial ha sido la facilidad de su producción, lo que junto con la capacidad para escalar el proceso de fermentación ha permitido la obtención de los volúmenes requeridos para el control de insectos plaga en la agricultura y la salud pública.

En Colombia, actualmente se encuentran aproximadamente 20 productos registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) a base de Bt (tabla 5.4), de los cuales tan solo el 15% corresponde a una formulación líquida, en tanto que el 85% restante corresponde a formulaciones de tipo sólido. Asimismo, ante la Environmental Protection Agency (EPA) el número de productos registrados a base de Bt sobrepasa los 90 (EPA, 2008). Para el cultivo de maíz, la formulación granulada había sido la forma más común de uso (Couch, 2000), hasta que fue reemplazado por el maíz Bt transgénico. Sin embargo, Bt sigue siendo ampliamente utilizado para plagas agrícolas, forestales y de plantación, pero principalmente como gránulos secos y dispersables, debido a sus mejores características de almacenamiento y distribución.

La bacteria *S. entomophila* tiene un único hospedero susceptible, el gusano blanco de la hierba de Nueva

Zelanda (*C. zealandica*), lo que limita su uso solo a Nueva Zelanda. A pesar de esto, este ha sido un modelo interesante para el desarrollo de nuevos bioplaguicidas y cumple un papel importante dentro del país (Jackson, 2007). En los primeros experimentos en los que se realizó la aplicación de *S. entomophila* para *C. zealandica*, se aplicó en el suelo una suspensión de la bacteria en un alto volumen de agua (Jackson, Pearson, & Stucki, 1986).

Si bien estos ensayos fueron una buena “prueba de concepto” para la aplicación de las bacterias, inicio de la enfermedad y control de la población, los métodos de aplicación evidentemente no se podían llevar a la práctica y exponían a la bacteria al estrés ocasionado por la radiación ultravioleta y su desecación sobre la superficie del suelo. Como solución a este inconveniente, se aplicó una suspensión bacteriana directamente dentro del suelo a medida que el agua caía en el surco producido por una sembradora de semillas modificada. Este método fue adoptado comercialmente y *S. entomophila* fue aplicada como el producto biocontrolador de *C. zealandica* *Invade*TM entre 1990 y el 2002. Las limitaciones ocasionadas por la necesidad de usar un alto volumen de agua y la necesidad de utilizar un equipo especializado llevaron al desarrollo de una formulación a base de la bacteria correspondiente a un granulado seco, *Bioshield*TM (Johnson, Pearson, & Jackson, 2001), que ha sido utilizado en los años subsiguientes (Townsend et al., 2004).

Como un nuevo organismo, *S. entomophila* fue sometida a evaluaciones completas para determinar su seguridad y registro (Jackson et al., 1992) y ha sido comercializada por diferentes empresas en Nueva Zelanda. El éxito de *S. entomophila* se ha dado por su capacidad para establecerse en el suelo e iniciar el ciclo de la enfermedad en la población blanco, después de lo cual la bacteria patogénica persistirá en el suelo. Asimismo, se ha facilitado por la capacidad de convertir las bacterias en un producto estable a través de la fermentación y la formulación microbianas (Johnson et al., 2001; Visnovsky, Smalley, O'Callaghan, & Jackson, 2008). El producto *Bioshield*[®] en forma líquida o granular es ahora comercializado por *Biostart*TM (Bio-Start Limited, Auckland, New Zealand) como un control preventivo (Biostart, 2017).

Tabla 5.4. Productos a base de *Bacillus thuringiensis* registrados en Colombia

Nombre comercial	Ingrediente activo	Tipo de formulación	Actividad biológica
Dipel WP	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	No registra
Thuricide HP WP	Bt var. Kurstaki serotipo 3a3b	Polvo mojable	<i>Trichoplusia ni</i> (oruga de la col o gusano falso medidor), <i>Pseudoplusia (Chrysodeixis) includens</i> (gusano medidor), <i>Alabama argillacea</i> (gusano del algodón), <i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero del maíz)
Dipel Se	Bt var. Kurstaki	Suspoemulsión	<i>Heliothis virescens</i> (gusano bellotero), <i>Alabama argillacea</i> (gusano del algodón), <i>Plutella xylostella</i> (palomilla dorso de diamante), <i>Ceramidia viridis</i> (gusano peludo de la hoja del banano)
Dipel 10G	Bt var. Kurstaki	Granulado	No registra
Dipel WG	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	<i>Alabama argillacea</i> (gusano del algodón), <i>Trichoplusia ni</i> (oruga de la col o gusano falso medidor), <i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero del maíz), <i>Pseudoplusia (Chrysodeixis) includens</i> (gusano medidor)
Turilav WP	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	<i>Heliothis virescens</i> (gusano bellotero), <i>Alabama argillacea</i> (gusano del algodón)
Ecotech Bio WP	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	<i>Alabama argillacea</i> (gusano del algodón), <i>Anticarsia gemmatalis</i> (gusano de las leguminosas)
Agree 50 WP	Bt var. Aizawai	Polvo mojable	No registra
Ecotech Pro	Bt var. Kurstaki	Suspoemulsión	<i>Alabama argillacea</i> (gusano del algodón), <i>Anticarsia gemmatalis</i> (gusano de las leguminosas)
Baton SC	Bt var. Kurstaki	Suspensión concentrada	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (gusano de las leguminosas), <i>Trichoplusia ni</i> (oruga de la col o gusano falso medidor), <i>Omiodes indicata</i> (pegador de hojas)
Javelin WG	Bt var. Kurstaki serotipo 3a3b	Polvo mojable	<i>Plutella xylostella</i> (palomilla dorso de diamante)
Xentari WG	Bt var. Aizawai	Gránulos dispersables WP	<i>Alabama argillacea</i> (gusano de algodón) y <i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero del maíz)
Bacillus agrogen WP	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	<i>Heliothis tergeminus</i> (gusano cogollero), <i>Manduca sexta</i> (gusano del tabaco)
Turivec	Bt var. Kurstaki cepa CIB-172-0451	Concentrado emulsionable	<i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero del maíz)
Bassar WP	<i>Beauveria bassiana</i> y Bt	Polvo mojable WP	Larvas de <i>Copitarsia</i> sp. (copitarsia)
Bitoxibacillin WP	Bt var. Thuringiensis	Polvo mojable	<i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero del maíz) y <i>Tetranychus urticae</i> (araña roja)
Bak-tur WP	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	<i>Heliothis virescens</i> (gusano bellotero)
BT-NOVA WP	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	Gusano peludo o defoliador
Bt-biox	Bt var. Kurstaki	Polvo mojable	<i>Spodoptera frugiperda</i> (gusano cogollero del maíz)

Fuente: Adaptada de Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2017)

Limitaciones en el uso de bacterias entomopatógenas

De acuerdo con Van der Pas, Waddington y Ravensberg (2000), los factores limitantes en el uso de bioplaguicidas se pueden dividir en tres tipos: 1) biológicos (modo de acción y efecto de factores ambientales), 2) técnicos (producción, formulación y vida útil) y 3) económicos o relacionados con el mercado (competencia con productos químicos, eficacia, costos, potencial de ventas). Para el caso de los bioplaguicidas a base de bacterias entomopatógenas, y principalmente para el caso de las que carecen de estructuras de resistencia como las esporas, quizás unas de sus principales limitantes son de tipo biológico y técnico, encontrándose en su obtención y estabilidad para ser distribuidas a nivel comercial.

Los microorganismos utilizados como ingrediente activo de los bioplaguicidas son sensibles a condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y la radiación ultravioleta, lo que puede reducir su viabilidad y eficacia durante la etapa de almacenamiento y después de su aplicación en campo, teniendo una baja persistencia y actividad residual (Walker, Mendelsohn, Matten, Alphin & Ave, 2003). En este sentido, el desarrollo de estrategias adecuadas de formulación y aplicación son claves para el buen desempeño de algunos productos (Chandler et al., 2011). Cobra aquí especial importancia la selección de los excipientes de la formulación, con el fin de que puedan reducir el efecto de algunas condiciones ambientales, sin afectar la viabilidad y eficacia del microorganismo. Es el caso de reductores de actividad de agua, protectores solares y protectores de secado, entre otros. No obstante, es importante tener en cuenta que los sistemas de producción y formulación desarrollados deben tener bajos costos, que les permitan ser competitivos en el mercado. Asimismo, en relación con el tipo de formulación seleccionado, otro factor limitante puede ser la ubicación del organismo diana o blanco a controlar, pues es más difícil controlar de manera eficaz aquellas plagas que se encuentran bajo el suelo, alimentándose, por ejemplo, de las raíces de las plantas o los tubérculos

(Jurat-Fuentes & Jackson, 2012), o en el interior de los órganos de la planta. En este caso, como alternativa se pueden plantear sistemas de liberación controlada que permitan obtener mayor persistencia y toxicidad.

Otro de los inconvenientes de tipo biológico relacionado con el uso de bacterias entomopatógenas no formadoras de esporas es que algunas especies son reconocidas como patógenos humanos, lo que crea interrogantes sobre su uso como agentes de control biológico (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). En este sentido, cepas de *S. marcescens*, *P. aeruginosa* y *Yersinia* spp. han sido aisladas de infecciones humanas, principalmente infecciones nosocomiales adquiridas en los hospitales y, aunque no haya necesariamente una relación entre las cepas que son patógenos de insectos y las que se han encontrado a partir de las infecciones hospitalarias, es importante seguir los protocolos de pruebas de seguridad como parte del proceso de registro (Dacheux, Attree, Schneider, & Toussaint, 1999; Haddy et al., 1996; McNally et al., 2004; Saraka et al., 2017; Snitkin & Segre, 2014).

Otro factor biológico de las bacterias entomopatógenas es que suelen presentar alta especificidad para un grupo reducido de huéspedes, lo que es una ventaja desde el punto de vista de seguridad medioambiental y sobre insectos benéficos, pero puede ser una desventaja en el momento de su comercialización (Chandler et al., 2011).

Finalmente, una de las principales preocupaciones con el uso de bacterias entomopatógenas es el desarrollo de resistencia. Se conocen episodios de resistencia de campo a productos basados en las toxinas Cry, sobre todo en *P. xylostella*, que involucran la alteración de los receptores de membrana (Ballester, Granero, Tabashnik, Malvar, & Ferré, 1999; Ocelotl et al., 2017). Es crucial identificar el mecanismo de acción y sus alteraciones en insectos resistentes para mantener la utilidad de esta tecnología, así como la de las plantas transgénicas que producen toxinas Cry (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012).

Conclusiones y perspectivas

En general, los bioplaguicidas bacterianos han tenido éxito, ya que han encontrado nichos en los mercados de control de plagas agrícolas y de salud pública, pues como agentes seguros tienen la flexibilidad de ser utilizados en los cultivos alimentarios, incluso justo antes de la recolección y en el ambiente doméstico. Es importante resaltar que, como agentes específicos de un huésped, tienen que incorporarse a los programas de manejo integrado de plagas (MIP). Estos bioproductos son una valiosa alternativa que complementa los esfuerzos para reducir el uso de plaguicidas químicos y la contaminación del medio ambiente, y permiten prever un futuro positivo en los programas de control de plagas y enfermedades.

Que continúe el éxito de los bioinsecticidas a base de bacterias y se incremente su comercialización es un reto que dependerá del desarrollo de productos que presenten mayor eficacia, menores costos de producción, amplio rango de actividad y una mayor persistencia (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). Diversos programas tienen como objetivo identificar nuevos aislamientos bacterianos y toxinas con mayores o nuevos rangos de actividad. En este sentido las nuevas técnicas moleculares son imprescindibles, así como la investigación que permita la obtención de procesos de producción y formulación que sean novedosos, y eficaces, de acuerdo con las características de la bacteria utilizada como ingrediente activo.

Agradecimientos

A las doctoras Laura Villamizar y Gloria Barrera por su oportuno apoyo.



Referencias

- Adang, M. J., Crickmore, N., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Chapter two - diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. En T. S. Dhadialla & S. S. Gill (Eds.), *Advances in Insect Physiology* (pp. 39-87). Vol. 47. Cambridge, Inglaterra: Academic Press.
- Angus, T. A. (1954). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*, 173, 545-546. doi:10.1038/173545a0.
- Aronson, A. I., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological reviews*, 50(1), 1-24.
- Asolkar, R., Huang, H., Koivunen, M., & Marrone, P. (2015). Patente EUA 8715754 *Chromobacterium* bioactive compositions and metabolites, Marrone Bio Innovations, I. Washington: Oficina de Patentes y Marcas de EUA.
- Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B. E., Malvar, T., & Ferré, J. (1999). Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1413-1419.
- Baum, J. A., & Gonzalez, J. M. (1992). Mode of replication, size and distribution of naturally occurring plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 96(2-3), 143-148. doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05407.x.
- Beegle, C. C., & Yamamoto, T., (1992). Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *The Canadian Entomologist*, 124(4), 587-616. doi:10.4039/Ent124587-4.
- Benoit, T. G., Wilson, G. R., Bull, D. L., & Aronson, A. I. (1990). Plasmid-associated sensitivity of *Bacillus thuringiensis* to uv light. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2282-2286.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7.
- Berry, C. (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 1-10. doi:10.1016/j.jip.2011.11.008.
- Biostart. (2017). *The safe, effective way to control NZ grass grub*. Recuperado de <http://www.biostart.co.nz/products/bio-insecticides/bioshield-grass-grub/>.
- Bone, L. W., & Tinelli, R. (1987). *Trichostrongylus colubriformis*: larvicidal activity of toxic extracts from *Bacillus sphaericus* (strain 1593) spores. *Experimental Parasitology*, 64(3), 514-516. doi:10.1016/0014-4894(87)90066-X.
- Bönemann, G., Pietrosiuk, A., & Mogk, A. (2010). Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Molecular Microbiology*, 76(4), 815-821. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07171.x.
- Bowen, D., Rocheleau, T. A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., & Ffrench-Constant, R. H. (1998). Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens*. *Science*, 280(5372), 2129-2132. doi:10.1126/science.280.5372.2129.
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal Microbiology*, 47(1), 86-98. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.005.
- Bravo, A. (2004). Familia de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo, A., Cerón, J. (Eds.), *Bacillus thuringiensis* en el control biológico (pp 49-68). Bogotá, Colombia: Editorial Buena Semilla.
- Bresolin, G., Morgan, J. A. W., Ilgen, D., Scherer, S., & Fuchs, T. M. (2006). Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology*, 59(2), 503-512. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04916.x.
- Bretschneider, A., Heckel, D. G., & Pauchet, Y. (2016). Three toxins, two receptors, one mechanism: Mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76, 109-117. doi:10.1016/j.ibmb.2016.07.008.
- Bucher, G. (1981). Identification of bacteria found in insects. En H. D. Burges (Ed.), *Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980* (pp. 7-33). Londres, Reino: Academic Press.
- Cordova-Kreylos, A. L., Fernandez, L. E., Koivunen, M., Yang, A., Flor-Weiler, & L., Marrone, P. G. (2013).

- Isolation and Characterization of *Burkholderia rinojensis* sp. nov., a Non-*Burkholderia cepacia* Complex Soil Bacterium with Insecticidal and Miticidal Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7669-7678. doi:10.1128/aem.02365-13.
- Couch, T. L. (2000). Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. En J. F. Charles, A. Delécluse & C. N. Roux (Eds.), *Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application* (pp. 297-316). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., ... Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 807-813.
- Chakoosari, M. M. D. (2013). Efficacy of various biological and microbial insecticides. *Journal of biology and today's world*, 2, 249-254.
- Champion, O. L., Cooper, I. A., James, S. L., Ford, D., Karlyshev, A., Wren, B. W., ... Titball R. W. (2009). *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*, 155(5), 1516-1522. doi:10.1099/mic.0.026823-0.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998. doi:10.1098/rstb.2010.0390.
- Chattopadhyay, P., Chatterjee, S., Gorthi, S., & Sen, S. K. (2012). Exploring Agricultural Potentiality of *Serratia entomophila* AB2: Dual Property of Biopesticide and Biofertilizer. *British Biotechnology Journal*, 2(1), 1-12. doi:10.9734/BBJ/2012/778.
- Chattopadhyay, P., Gorthi, S., Chatterjee, S., & Sen, S. K. (2011). Characterization of bacterial isolates as natural biocontrol agents of bollworm from an epizootic pest (*Heliothis armigera*). *Pest Technology*, 5(1), 81-85.
- d'Herelle, F. (1911). Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 152, 1413-1415.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., & Toussaint, B. (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional Type III secretion system. *Infection and Immunity*, 67(11), 6164-6167.
- De Barjac, H., & Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. Thuringiensis*. *Entomophaga*, 7(1), 5-31. doi:10.1007/BF02375988.
- De Maagd, R. A., Bosch, D., & Stiekema, W. (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 4(1), 9-13. doi:10.1016/S1360-1385(98)01356-9.
- Dingman, D. W. (2009). DNA fingerprinting of *Paenibacillus popilliae* and *Paenibacillus lentimorbus* using PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(1), 16-21. doi:10.1016/j.jip.2008.09.006.
- Dodd, S. J., Hurst, M. R. H., Glare, T. R., O'Callaghan, M., & Ronson, C. W. (2006). Occurrence of sep insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6584-6592. doi:10.1128/aem.00954-06.
- Dutky, S. (1963). The milky diseases. En E. Steinhaus (Ed.), *Insect Pathology: An Advanced Treatise* (pp. 75-115). Nueva York, EE. UU.: Academic press.
- Dutta, S. (2015). Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(6), 250-265.
- Endo, H., Azuma, M., Adegawa, S., Kikuta, S., & Sato, R. (2017). Water influx via aquaporin directly determines necrotic cell death induced by the *Bacillus thuringiensis* Cry toxin. *FEBS Lett*, 591(1), 56-64. doi:10.1002/1873-3468.12506.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2008). *Biopesticide active ingredients and products containing them*. Recuperado de http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists.
- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J.-Z., Shelton, A.M., Cheng, J., ... Sheng, Z. (2007). Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. *Applied Environmental Microbiology*, 73(3), 956-961. doi:10.1128/AEM.02079-06.
- Federici, B. A. (2007). Bacteria as biological control agents for insects: Economics, engineering, and environmental safety. En M. Vurro & J. Gressel (Eds.), *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management* (pp. 25-51). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Ferguson, C. M., Barton, D. M., Harper L. A., Swaminathan, J., Van Koten, C., & Hurst, M. R. H. (2012). Survival of *Yersinia entomophaga* MH96 in a pasture ecosystem and effects on pest and non-target invertebrate populations. *New Zealand Plant Protection*, 65: 166-173.
- Ferré, J., & Rie, J. V. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Reviews of Entomology*, 47, 501-533. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145234.
- Ffrench-Constant, R. H., Dowling, A., & Waterfield, N. R. (2007). Insecticidal toxins from *Photobacterium* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*, 49(4), 436-451. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.019.
- Ffrench-Constant, R., & Waterfield, N. (2005). An ABC guide to the bacterial toxin complexes. *Advances in Applied Microbiology*, 58, 169-183. doi:10.1016/S0065-2164(05)58005-5.
- Fuchs, T. M., Bresolin, G., Marcinowski, L., Schachtner, J., & Scherer, S. (2008). Insecticidal genes of *Yersinia* spp.:

- Taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiology*, 8, 214. doi:10.1186/1471-2180-8-214.
- Ge, Y., Hu, X., Zheng, D., Wu, Y., & Yuan, Z. (2011). Allelic diversity and population structure of *Bacillus sphaericus* as revealed by multilocus sequence typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5553-5556. doi:10.1128/AEM.00207-11.
- Glare, T. R., Corbett, G. E., & Sadler, T. J. (1993). Association of a large plasmid with amber disease of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*, caused by *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(2), 165-170. doi:10.1006/jipa.1993.1091.
- Gómez-Garzón, C., Hernández-Santana, A., & Dussán, J. (2016). Comparative genomics reveals *Lysinibacillus sphaericus* group comprises a novel species. *BMC Genomics*, 17, 1-10. doi:10.1186/s12864-016-3056-9.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., & Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*, 513(2-3), 242-246. doi:10.1016/S0014-5793(02)02321-9.
- Gonzalez, J. M., & Carlton, B. C. (1980). Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 3(1), 92-98. doi:10.1016/S0147-619X(80)90038-4.
- Grimont, P., & Grimont, F. (1978). The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology*, 32, 221-248. doi:10.1146/annurev.mi.32.100178.001253.
- Grimont, P. A. D., Jackson, T. A., Ageron, E., & Noonan, M. J. (1988). *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38, 1-6. doi:10.1099/00207713-38-1-1.
- Grkovic, S., Glare, T. R., Jackson, T. A., & Corbett, G. E. (1995). Genes essential for amber disease in grass grubs are located on the large plasmid found in *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2218-2223.
- Gupta, B. L., Dow, J. A., Hall, T. A., & Harvey, W. R. (1985). Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, in vitro. *Journal of Cell Science*, 74, 137-152.
- Haddy, R. I., Mann, B. L., Nadkarni, D. D., Cruz, R. F., Elshoff, D. J., Buendia, F. C., ... Oberheu, A. M. (1996). Nosocomial infection in the community hospital: severe infection due to *Serratia* species. *The Journal of Family Practice*, 42(3), 273-278.
- Harrison, H., Patel, R., & Yousten, A. A. (2000). *Paenibacillus* associated with milky disease in Central and South American scarabs. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(3), 169-175. doi:10.1006/jipa.2000.4969.
- Heckel, D. G. (2012). Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 103-110. doi:10.1016/j.pestbp.2012.05.007.
- Hejazi, A., & Falkiner, F. R. (1997). *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, 46, 903-912. doi:10.1099/00222615-46-11-903.
- Hire, R. S., Hadapad, A. B., Vijayalakshmi, N., & Dongre, T. K. (2010). Characterization of highly toxic indigenous strains of mosquitocidal organism *Bacillus sphaericus*. *FEMS Microbiology Letters*, 305(2), 155-161. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01927.x.
- Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255.
- Hoshino, T. (2011). Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1463. doi:10.1007/s00253-011-3468-z.
- Hurst, M. R., Glare, T. R., & Jackson, T. A. (2004). Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes—a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. *Journal of Bacteriology*, 186(15), 5116-5128. doi: 10.1128/JB.186.15.5116-5128.2004.
- Hurst, M. R., Glare, T. R., Jackson, T. A., & Ronson, C. W. (2000). Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*. *Journal of Bacteriology*, 182(18), 5127-5138. doi:10.1128/JB.182.18.5127-5138.2000.
- Hurst, M. R. H., Beattie, A. K., Jones, S. A., Hsu, P.-C., Calder, J., & Van Koten, C. (2015). Temperature-dependent *Galleria mellonella* mortality as a result of *Yersinia entomophaga* infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6404-6414. doi:10.1128/aem.00790-15.
- Hurst, M. R. H., Becher, S. A., & O'Callaghan, M. (2011). Nucleotide sequence of the *Serratia entomophila* plasmid pADAP and the *Serratia proteamaculans* pU143 plasmid virulence associated region. *Plasmid*, 65(1), 32-41. doi:10.1016/j.plasmid.2010.10.001.
- Hurst, M. R. H., Becher, S. A., Young, S. D., Nelson, T. L., Glare, T. R. (2011). *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 844-849. doi:10.1099/ijs.0.024406-0.
- Hurst, M. R. H., Jones, S. A., Binglin, T., Harper, L. A., Jackson, T. A., & Glare, T. R., (2011). The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-

- host-range toxin complex active against insects. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 1966-1980. doi:10.1128/JB.01044-10.
- Hurst, M. R. H., Jones, S. M., Tan, B., & Jackson, T. A. (2007). Induced expression of the *Serratia entomophila* Sep proteins shows activity towards the larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *FEMS Microbiology Letters*, 275(1), 160-167. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00886.x.
- Hurst, M. R. H., van Koten, C., & Jackson, T. A. (2014). Pathology of *Yersinia entomophaga* MH96 towards *Costelytra zealandica* (Coleoptera; Scarabaeidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115, 102-107. doi:10.1016/j.jip.2013.11.004.
- Ibarra, J. E., & Federici, B. A. (1986). Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 34(1), 79-84. doi:10.1111/j.1574-6968.1986.tb01353.x.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2017). *Productos registrados bioinsumos*. Recuperado de <http://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358b8a9e6ee6dcc8132/PRODUCTOSBIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx>.
- Inglis, G. D., & Lawrence, A. M. (2001). Effects of *Serratia marcescens* on the F1 generation of laboratory-reared *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(2), 362-366. doi:10.1603/0022-0493-94.2.362.
- Jackson, T. A. (2007). A novel bacterium for control of grass grub. En C. Vincent, M. S. Goettel, & G. Lazarovits (Eds.), *Biological control: a global perspective* (pp. 160-168). Wallingford, Inglaterra: CABI.
- Jackson, T. A., Boucias, D. G., & Thaler, J. O. (2001). Pathobiology of amber disease, caused by *Serratia* spp., in the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(4), 232-243. doi:10.1006/jipa.2002.5078.
- Jackson, T. A., Huger, A. M., & Glare, T. R. (1993). Pathology of Amber Disease in the New Zealand Grass Grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(2), 123-130. doi:10.1006/jipa.1993.1024.
- Jackson, T. A., Pearson, J. F., O'Callaghan, M., Mahanty, H. K., & Willcocks, M. J. (1992). Pathogen to product - Development of *Serratia entomophila* (Enterobacteriaceae) as a commercial biological agent for the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*). En T. A. Jackson, & T. R. Glare, (Eds.), *Use of Pathogens in Scarab Pest Management* (pp. 191-198). Andover, EE. UU.: Intercept.
- Jackson, T. A., Pearson, J. F., & Stucki, G. (1986). Control of the grass grub, *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae), by application of the bacteria *Serratia* spp. causing honey disease. *Bulletin of Entomological Research*, 76(1), 69-76. doi:10.1017/S0007485300015297.
- Jackson, T. A., Townsend, R. J., & Barlow, N. D. (1999). Predicting grass grub population change in Canterbury. En: J. N. Matthiessen (Ed.) *Proceedings of the 7th Australasian conference on grassland invertebrate ecology*. Wembley, Australia. pp. 21-26.
- Jackson, T. A., & Zimmermann, G. (1996). Is there a role for *Serratia* spp. in the biocontrol of *Melolontha* spp.? *Bulletin OILB/SROP*, 19(2), 47-53.
- James, R. R. & Li, Z. (2012). From silkworms to bees: diseases of beneficial insects. En F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect Pathology* (pp. 425-459). Nueva York, EE. UU.: Elsevier.
- Jarrett, C. O., Deak, E., Isherwood, K. E., Oyston, P. C., Fischer, E. R., Whitney, A. R., ... Hinnebusch, B. J. (2004). Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *The journal of infectious diseases*, 190(4), 782-792. doi:10.1086/422695.
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., & Benjamin, S. (2013). An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in microbiology*, 3, 462-472. doi:10.4236/aim.2013.35062.
- Johnson, V. W., Pearson, J. F., & Jackson, T. A. (2001). Formulation of *Serratia entomophila* for biological control of grass grub. *New Zealand Plant Protection*, 54, 125-127.
- Jolley, K. A., Chan, M.-S., & Maiden, M. C. (2004). mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics*, 5, 86. doi:10.1186/1471-2105-5-86.
- Jurat-Fuentes, J., & Jackson, T. (2012). Bacterial entomopathogens. *Insect pathology*, 2, 265-349. doi:10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7.
- Jurat-Fuentes, J. L., & Crickmore, N., (2017). Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. *Journal of Invertebrate Pathology*, 142, 5-10. doi:10.1016/j.jip.2016.07.018.
- Kain, W., & Atkinson, D. (1970). Rational approach to grass grub control. *Proceedings of the 23rd NZ Weed and Pest Control Conference*, pp. 180-183. Palmerston North, Nueva Zelanda: New Zealand Plant Protection Society.
- Kaška, M. (1976). The toxicity of extracellular proteases of the bacterium *Serratia marcescens* for larvae of greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(2), 271. doi:10.1016/0022-2011(76)90158-0.
- Kellen, W. R., Clark, T. B., Lindgren, J. E., Ho, B. C., Rogoff, M. H., & Singer, S. (1965). *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7(4), 442-448. doi:10.1016/0022-2011(65)90120-5.
- Kergunteuil, A., Bakhtiari, M., Formenti, L., Xiao, Z., Defosse, E., & Rasmann, S. (2016). Biological control

- beneath the feet: A review of crop protection against insect root herbivores. *Insects*, 7(4), 70. doi:10.3390/insects7040070.
- Key, P. B., & Scott, G. I. (1992). Acute toxicity of the mosquito larvicide, *Bacillus sphaericus*, to the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, and mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(3), 425-430. doi:10.1007/BF01239647.
- Khetan, S. (2001). *Microbial pest control*. Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.
- Khyami-Horani, H., Hajaj, M., & Charles, J.-F. (2003). Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *jordanica* (Serotype H71), a novel serovariety isolated in Jordan. *Current Microbiology*, 47(1), 0026-0031. doi:10.1007/s00284-002-3940-1.
- Kil, Y. J., Seo, M. J., Kang, D. K., Oh, S. N., Cho, H. S., Youn, Y. N., ... Yu, Y. M. (2014). Effects of enterobacteria (*Burkholderia* sp.) on development of *Riptortus pedestris*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 59(1), 77-84.
- Kinkel, L. L., Bakker, M. G., & Schlatter, D. C. (2011). A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 47-67. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095232.
- Klein, M. G. (1988). Pest management of soil-inhabiting insects with microorganisms. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 24(1-3), 337-349. doi:10.1016/0167-8809(88)90077-1.
- Klein, M. G., & Jackson, T. A. (1992). Bacterial diseases of scarabs. En J. Trevor & G. Travis (Eds.), *Use of pathogens in scarab pest management* (pp.43-61). Andover, EE. UU.: Intercept.
- Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V. A., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2014). Insect gut microbiome - An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl. 1), S16-S21. doi:10.12980/APJTB.4.2014C95.
- Krych, V. K., Johnson, J. L., & Yousten, A. A. (1980). Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 476-484. doi:10.1099/00207713-30-2-476.
- Kupferschmied, P., Maurhofer, M., & Keel, C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Frontiers in Plant Science*, 4, 287. doi:10.3389/fpls.2013.00287.
- Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2), 218-225.
- Lambert, B., & Peferoen, M. (1992). Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience*, 42(2), 112-122. doi:10.2307/1311652.
- Lecadet, M. M. (1998). *Collection of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus (Classified by H Serotypes)*. Paris, Francia: Institut Pasteur.
- Lecadet, M. M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., & Thiéry, I. (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 660-672. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00710.x.
- Lee, D.-W., Akao, T., Yamashita, S., Katayama, H., Maeda, M., Saitoh, H., ... Ohba, M. (2000). Noninsecticidal Parasporal Proteins of a *Bacillus thuringiensis* Serovar *shandongensis* Isolate Exhibit a Preferential Cytotoxicity against Human Leukemic T Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 218-223. doi:10.1006/bbrc.2000.2765.
- Lereclus, D., Lecadet, M.-M., Ribier, J., & Dedonder, R. (1982). Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *Molecular and general genetics MGG*, 186(3), 391-398. doi:10.1007/BF00729459.
- LifeSci. (2017). "*Bacillus thuringiensis*" Toxin Nomenclature. Recuperado de http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Lisansky, S., & Coombs, J. (1994). Developments in the market for biopesticides. En *Brighton crop protection conference: pests and diseases* (pp. 1049-1049). Brighton, Inglaterra: Brit Crop Protection Council.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., ... Darnell, J. (2006). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis II, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., ... Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002784. doi:10.1371/journal.pgen.1002784.
- López-Meza, J. E., Barboza-Corona, J. E., Del Rincón-Castro, M. C., & Ibarra, J. E. (2003). Sequencing and characterization of plasmid pUIBI-1 from *Bacillus thuringiensis* serovar *entomocidus* LBIT-113. *Current Microbiology*, 47(5), 395-399. doi:10.1007/s00284-003-4041-5.
- Lord, J. C. (2005). From metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(1), 19-29. doi:10.1016/j.jip.2005.04.006.
- Lysenko, O. (1976). Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27, 385-386.
- Marshall, S. D. G., Hares, M. C., Jones, S. A., Harper, L. A., Vernon, J. R., Harland, D. P., ... Hursta M. R. H. (2012).

- Histopathological effects of the Yen-Tc toxin complex from *Yersinia entomophaga* MH96 (*Enterobacteriaceae*) on the *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larval midgut. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4835-4847. doi:10.1128/aem.00431-12.
- Martin, P. A., Hirose, E., & Aldrich, J. R. (2007). Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 680-684.
- Martin, P. A. W., Gundersen-Rindal, D., Blackburn, M., & Buyer, J. (2007). *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 993-999. doi:10.1099/ijs.0.64611-0.
- McNally, A., Cheasty, T., Fearnley, C., Dalziel, R. W., Paiba, G. A., Manning, G., Newell, D. G. (2004). Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 103-108. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01548.x.
- Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(4), 625-634.
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77, 52-64. doi:10.1016/j.cropro.2015.07.017.
- Monnerat, R., De Silva, S. F., Dias, D. S., Martins, E. S., Praça, L. B., Jones, G. W., ... Berry, C. (2004). Screening of Brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Applied Entomology*, 128(7), 469-473. doi:10.1111/j.1439-0418.2004.00874.x.
- Monnerat, R., Nicolas, L., Frachon, E., & Hamon, S. (1992). Characterization and toxicity to mosquito larvae of four *Bacillus sphaericus* strains isolated from Brazilian soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(1), 10-14. doi:10.1016/0022-2011(92)90147-V.
- Murray, P., Rosentahl, K., & Pfaller, M., (2009). *Microbiología médica*. (7.ª ed.). Barcelona, España, Elsevier.
- Núñez-Valdez, M. E., Calderón, M. A., Aranda, E., Hernández, L., Ramírez-Gama, R. M., Lina, L., ... Villalobos, F. J. (2008). Identification of a putative mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 802-810. doi:10.1128/AEM.01074-07.
- O'Callaghan, M., Garnham, M. L., Nelson, T. L., Baird, D., & Jackson, T. A. (1996). The pathogenicity of *Serratia* strains to *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 68(1), 22-27. doi:10.1006/jipa.1996.0054.
- O'Callaghan, M., Young, S., Barlow, N., & Jackson, T. (1999). The ecology of grass grub pathogenic *Serratia* spp. New Zealand pastures. En J. N. Mathiessen (Ed.). *Proceedings of the 7th australasian conference on grassland invertebrate ecology*, (pp. 85-91). Perth, Australia: CSIRO Entomology.
- Ocelotl, J., Sánchez, J., Gómez, I., Tabashnik, B. E., Bravo, A., & Soberón, M. (2017). ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth. *Scientific Reports*, 7, 2386. doi:10.1038/s41598-017-02545-y.
- Opoa, O., Vallet-Gély, I., Vincentelli, R., Kellenberger, C., Iacovache, I., Gonzalez, M. R., ... Lemaitre, B. (2011) Monalysin, a novel β -pore-forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality. *PLoS Pathogens*, 7(9): e1002259. doi:10.1371/journal.ppat.1002259.
- Owuama, C. I. (2001). Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. *World journal of microbiology and biotechnology*, 17(5), 505-515. doi:10.1023/A:1011916021378.
- Park, H.-W., Mangum, C. M., Zhong, H. E., & Hayes, S. R. (2007). Isolation of *Bacillus sphaericus* with improved efficacy against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(4), 478-480. doi:10.2987/5663.1.
- Pechy-Tarr, M., Borel, N., Kupferschmied, P., Turner, V., Binggeli, O., Radovanovic, D., ... Keel, C. (2013). Control and host-dependent activation of insect toxin expression in a root-associated biocontrol pseudomonad. *Environmental Microbiology*, 15(3), 736-750. doi:10.1111/1462-2920.12050.
- Péchy-Tarr, M., Bruck, D. J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M. D., ... Keel, C. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2368-2386. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01662.x.
- Pérez-García, G., Basurto-Ríos, R., & Ibarra, J. E. (2010). Potential effect of a putative σ H-driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2), 140-146. doi:10.1016/j.jip.2010.02.010.
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255-281. doi:10.1128/mmbr.00034-06.
- Podgwaite, J. D., & Cosenza, B. J. (1976). A strain of *Serratia marcescens* pathogenic for larvae of *Lymantria dispar*:

- Infectivity and mechanisms of pathogenicity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(2), 199-208. doi:10.1016/0022-2011(76)90146-4.
- Poinar, G. O., Jr., Wassink, H. J., Leegwater-van der Linden, M. E., & van der Geest, L. P. (1979). *Serratia marcescens* as a pathogen of tsetse flies. *Acta Tropica*, 36(3), 223-227.
- Ravensberg, W. J. (2011). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*. Berlín, Alemania: Springer Science & Business Media.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends of Microbioly*, 18(5), 189-194. doi:10.1016/j.tim.2010.02.006.
- Reyes-Ramírez, A., & Ibarra, J. E. (2008). Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 125-129. doi:10.1128/AEM.02133-07.
- Rippere, K. E., Tran, M. T., Yousten, A. A., Hilu, K. H., & Klein, M. G. (1998). *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus*, bacteria causing milky disease in Japanese beetles and related scarab larvae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 395-402. doi:10.1099/00207713-48-2-395.
- Robert, L. L., Perich, M. J., Schlein, Y., Jacobson, R. L., Wirtz, R. A., Lawyer, P. G., & Githure, J. I. (1997). Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(12), 140-144.
- Robert, R., Farrar, J., Phyllis, A., Martin, W., & Ridgway, R. (2001). A strain of *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae) with high virulence per os to larvae of a laboratory colony of the Corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological Science*, 36(4), 380-390. doi:10.18474/0749-8004-36.4.380.
- Ruffner, B., Pechy-Tarr, M., Ryffel, F., Hoegger, P., Obrist, C., Rindlisbacher, A., ... Maurhofer, M. (2013). Oral insecticidal activity of plant-associated *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 15(3), 751-763. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02884.x.
- Santos-Mendoza, M., Ibarra, J. E., Delecluse, A., & Juárez-Pérez, A. (2002). Phylogenetic relationship between the *Bacillus thuringiensis* type strains, based on the sequence of the flagellin gene. En J. E. Ibarra (Chair) *Annual meeting of the society for invertebrate pathology* (p. 110). Foz do Iguaçu, Brasil: Society for Invertebrate Pathology.
- Saraka, D., Savin, C., Kouassi, S., Cissé, B., Koffi, E., Cabanel, N., ... Carniel, E. (2017). *Yersinia enterocolitica*, a neglected cause of human enteric infections in Côte d'Ivoire. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005216. doi:10.1371/journal.pntd.0005216.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., ... Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806.
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *International Scholarly Research Notices Microbiology*, 2014(2014), Article ID 135675, 1-12. doi:10.1155/2014/135675.
- Sergeant, M., Jarrett, P., Ousley, M., & Morgan, J. A. W. (2003). Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Applied, and Environmental Microbiology*, 69(6), 3344-3349. doi:10.1128/aem.69.6.3344-3349.2003.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X. (2013). Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, 14, 1-20. doi:10.1186/1471-2164-14-271.
- Shingote, P. R., Moharil, M. P., Dhumale, D. R., Deshmukh, A. G., Jadhav, P. V., Dudhare, M. S., & Satpute, N. S. (2013). Distribution of vip genes, protein profiling and determination of entomopathogenic potential of local isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Bt Research*, 4(3), 14-20. doi:10.5376/bt.2013.04.0003.
- Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., & Jean-François, C. (1999). Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(8), 711-721. doi:10.1016/S0965-1748(99)00047-8.
- Singh, G. J. P., & Gill, S. S. (1988). An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), 237-247. doi:10.1016/0022-2011(88)90131-0.
- Snitkin, E. S., & Segre, J. A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation to human hosts. *Nature Genetics*, 47, 2. doi:10.1038/ng.3172.
- Soufiane, B., & Côté, J.-C. (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 341(2), 127-137. doi:10.1111/1574-6968.12106.
- Splittstoesser, C. M., Tashiro, H., Lin, S. L., Steinkraus, K. H., & Fiori, B. J. (1973). Histopathology of the European chafer, *Amphimallon majalis*, infected with *Bacillus popilliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 22(2), 161-167. doi:10.1016/0022-2011(73)90128-6.
- Steinhaus, E. A. (1941). A study of the bacteria associated with thirty species of insects. *Journal of Bacteriology*, 42(6), 757-790.
- Steinhaus, E. A. (1975). *Disease in a minor chord: being a semihistorical and semibiographical account of a period in*

- science when one could be happily yet seriously concerned with the diseases of lowly animals without backbones, especially the insects. Columbus, EE. UU.: Ohio State University Press.
- Stucki, G., Jackson, T. A., & Noonan, M. J. (1984). Isolation and characterisation of *Serratia* strains pathogenic for larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *New Zealand Journal of Science*, 27, 255-260.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208. doi:10.1089/ind.2006.2.194.
- Townsend, R. J., Ferguson, C. M., Proffitt, J. R., Slay, M. W. A., Swaminathan, J., Day, S., ... Jackson T. A. (2004). Establishment of *Serratia entomophila* after application of a new formulation for grass grub control. *New Zealand Plant Protection*, 57, 10-12.
- Trought, T. E. T., Jackson, T. A., & French, R. A. (1982). Incidence and transmission of a disease of grass grub (*Costelytra zealandica*) in Canterbury. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 10(1), 79-82. doi:10.1080/03015521.1982.10427847.
- Van der Pas, R., Waddington, C., & Ravensberg, W. (2000). Commercialisation of a microbial pesticide "challenges and constraints". *Bulletin IOBC/WPRS*, 23(2), 15-18.
- Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101(1), 1-16. doi:10.1016/j.jip.2009.02.009.
- Van Frankenhuyzen, K., & Nystrom, C. (2011). *The Bacillus thuringiensis toxin specificity database*. Calgary, Canadá: Natural Resources Canada.
- Visnovsky, G. A., Smalley, D. J., O'Callaghan, M., & Jackson, T. A. (2008). Influence of culture medium composition, dissolved oxygen concentration and harvesting time on the production of *Serratia entomophila*, a microbial control agent of the New Zealand grass grub. *Biocontrol Science and Technology*, 18(1), 87-100. doi:10.1080/09583150701760513.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., ... Boccard, F. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature Biotechnology*, 24, 673-679. doi:10.1038/nbt1212.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., ... Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 102(32), 11414-11419. doi:10.1073/pnas.0502240102.
- Wahba, M. M. (2000). The influence of *Bacillus sphaericus* on the biology and histology of *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, 30(1), 315-323.
- Walker, K., Mendelsohn, M., Matten, S., Alphin, M., & Ave, D. (2003). The role of microbial Bt products in U.S. Crop protection. *Journal of New Seeds*, 5(1), 31-51. doi:10.1300/J153v05n01_03.
- Waterfield, N., Hares, M., Yang, G., Dowling, A., & Ffrench-Constant, R. (2005). Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal Toxin complexes of *Photorhabdus bacteria*. *Cellular Microbiology*, 7(3), 373-382. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00467.x.
- Wermelinger, E. D., Zanuncio, J. C., Rangel, E. F., Cecon, P. R., & Rabinovitch, L. (2000). Toxicity of *Bacillus* Species to Larvae of *Lutzomyia longipalpis* (L. & N.) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(3), 609-614. doi:10.1590/S0301-80592000000300025.
- Whalon, M. E., & Wingerd, B. A. (2003). Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4), 200-211. doi:10.1002/arch.10117.
- Xu, D., & Côté, J.-C. (2008). Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level. *Applied Environmental Microbiology*, 74(17), 5524-5532. doi:10.1128/aem.00951-08.
- Yang, G., Dowling, A. J., Gerike, U., Ffrench-Constant, R. H., & Waterfield, N. R. (2006). *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2254-2261. doi:10.1128/JB.188.6.2254-2261.2006.
- Yousten, A. A., Fretz, S. B., & Jelley, S. A. (1985). Selective medium for mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1532-1533.
- Yu, X., Zheng, A., Zhu, J., Wang, S., Wang, L., Deng, Q., ... Li, P. (2011). Characterization of Vegetative Insecticidal Protein vip Genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Current Microbiology*, 62(3), 752-757. doi:10.1007/s00284-010-9782-3.
- Zalunin, I. A., Elpidina, E. N., & Oppert, B. (2015). The role of proteolysis in the biological activity of Bt insecticidal crystal proteins. En M. Soberón, A. Gao & A. Bravo (Eds.), *Bt Resistance: Characterization and Strategies for GM Crops Producing Bacillus thuringiensis Toxins* (pp. 107-118). Wallingford, Inglaterra: Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). doi:10.1079/9781780644370.0107.
- Zhang, D., De Souza, R. F., Anantharaman, V., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2012). Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biology Direct*, 7, 18. doi:10.1186/1745-6150-7-18.
- Zhang, J., Hodgman, T. C., Krieger, L., Schnetter, W., & Schairer, H. U. (1997). Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4336-4341. doi:10.1128/jb.179.13.4336-4341.