

# **BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS COMO ALTERNATIVA PARA EL BIOCONTROL DE PLAGAS**

## **ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA AS AN ALTERNATIVE FOR THE BIOCONTROL OF PESTS**



**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**ANA DELIA JIMÉNEZ GARCÍA**

**Tutorizado por Ángel Manuel Gutiérrez Navarro**

**Grado en Biología. Julio 2019**

## ÍNDICE

---

1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT .....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Insecticidas químicos.....	3
2.2. Biopesticidas .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
4. METODOLOGÍA.....	5
5. DISCUSIÓN.....	5
5.1. BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS .....	5
5.1.1. Características, clasificación y plagas hospedadoras.....	5
5.1.2. Estructura intestinal de los insectos y estrategias bacterianas para superar sus defensas.....	8
5.1.3. Mecanismos de acción de las toxinas bacterianas .....	9
5.1.3.1. Ingestión y activación de las toxinas.....	9
5.1.3.2. Difusión de las toxinas y unión a receptores específicos .....	10
5.1.3.3. Formación de poros que desemboca en un desequilibrio osmótico ..	11
5.1.3.4. Muerte del insecto .....	12
6. <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .....	13
6.1. Características de <i>B. thuringiensis</i> .....	13
6.2. Descubrimiento.....	14
6.3. Uso de <i>B. thuringiensis</i> como bioinsecticida .....	14
6.4. Cepas de <i>Bt</i> .....	15
6.5. Otras toxinas producidas por <i>Bt</i> aparte de las toxinas Cry.....	15
6.5.1. Toxinas Cyt.....	16
6.5.2. Proteínas Vip.....	16
6.6. Generaciones de bioinsecticidas basados en <i>Bt</i> .....	17
7. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS BIOPLAGUICIDAS .....	18
8. CULTIVOS TRANSGÉNICOS BT .....	20
9. RESISTENCIA DE LOS INSECTOS A LAS TOXINAS DE <i>BT</i> .....	21
10. CONCLUSIONES.....	22
10. CONCLUDING REMARKS .....	23
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

## 1. RESUMEN

La agricultura ha supuesto un gran avance en el desarrollo social y económico del ser humano. Las plagas han constituido un gran problema en el mantenimiento de las cosechas y han tenido efectos negativos sobre la alimentación y la economía del planeta. Mediante el empleo de insecticidas químicos se han controlado eficazmente dichas plagas, pero, como resultado de su uso abusivo y consecuente contaminación, tienen un gran impacto en los ecosistemas y en la salud humana. Como alternativa ecológica se ha recurrido a la utilización de biopesticidas para sustituirlos. A nivel comercial destacan los bioplaguicidas de origen microbiano, en especial, aquellos basados en la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) por ser el patógeno más empleado en el biocontrol de insectos. En la presente revisión bibliográfica se tratarán distintas bacterias entomopatógenas y sus hospedadores, sus características y los mecanismos de acción de sus toxinas, entre otros, poniendo especial énfasis en *Bt*.

**Palabras clave:** bacterias entomopatógenas, plagas de insectos, *Bacillus thuringiensis*, bioplaguicidas, toxinas

## 1. ABSTRACT

Agriculture has represented a great advance in the social and economic development of the human being. Insect pests have been a major problem in the maintenance of crops and have had negative effects on food and the economy of the planet. Through the use of chemical insecticides, these pests have been effectively controlled, but as a result of their abusive use and contamination, they have a negative impact on ecosystems and human health. As a more ecological alternative biopesticides have been used with the objective of replacing them. In the world trade, biopesticides of microbial origin stand out, especially those based on the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), as it is the most used pathogen in insect biocontrol. In this review different aspects related to various entomopathogenic bacteria and their hosts, their characteristics and the mechanisms of action of their toxins will be treated, with special emphasis on *Bt*.

**Key words:** entomopathogenic bacteria, insect pests, *Bacillus thuringiensis*, biopesticides, toxins

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde que el ser humano desarrolló la agricultura ha tenido que hacer frente a diversos problemas y factores derivados de esta actividad, algunos de carácter abiótico como la disminución de la fertilidad de los suelos y su posterior erosión debido al cultivo intensivo y otros bióticos y antropogénicos como el ataque de plagas de insectos y enfermedades (Cruz & Cruz, 2018; Perez & Landeros, 2009).

Desde el punto de vista agrícola, los insectos se clasifican como plagas cuando ocasionan daños de manera directa sobre las cosechas (García et al., 2017). Las plagas de insectos y las enfermedades de las plantas causan un daño considerable y suponen pérdidas en el rendimiento de los cultivos que oscilan entre un 10 y un 30% (Kang, 2019). Aunque en el conjunto de especies que componen el filo *Arthropoda* solo un pequeño porcentaje de ellas son consideradas como plaga, estas son causantes de la destrucción del 18% de la producción agrícola anual en el mundo, suponiendo una pérdida económica estimada en 100 mil millones de dólares al año (Nicholson, 2007). Estas especies plaga pueden aparecer en nuevas zonas de manera natural o accidentalmente al introducir algunos individuos en un área y perder su control, viéndose esto último favorecido por el comercio a nivel mundial al llegar cada vez más especies no nativas del lugar que resultan ser muy destructivas (Mnif & Ghribi, 2015).

Al menos dos tercios de las especies de animales que existen en la Tierra pertenecen a la clase *Insecta* (Rai & Ingle, 2012). Los insectos son el grupo de herbívoros que más ataques produce en las plantas. A pesar de que a lo largo de la evolución se hayan establecido asociaciones entre las plantas y los insectos, como por ejemplo, la propagación de polen por parte de estos últimos, muchas de las especies de plantas que son cultivadas en el planeta son atacadas por dichos artrópodos en algún momento de su ciclo vital (Rao, Singh, & Day, 2000).

Los insectos no solo afectan a las plantas, sino que, además, muchos de ellos son huéspedes o portadores de enfermedades bacterianas, virales y parasitarias que afectan a la especie humana (Sarwar, 2015b). Se calcula que aproximadamente un 17% de las enfermedades infecciosas en humanos son transmitidas por ellos y se estima que más de la mitad de la población mundial total se encuentra en riesgo de infectarse al año, y que más de un millón de personas mueren debido a estas

infecciones (Shaw, Attardo, Aksoy, & Catteruccia, 2015). Entre estas enfermedades, aquellas que son transmitidas por mosquitos son uno de los principales problemas que afectan al ser humano debido a que se encuentran distribuidas ampliamente y generan un alto número de casos clínicos, afectando a más de mil millones de personas en el mundo (Potter, Jardine, & Neville, 2016; Sarwar, 2015b).

### **2.1. Insecticidas químicos**

Para luchar contra las plagas y sus consecuentes enfermedades se ha recurrido al empleo de pesticidas químicos (Mnif & Ghribi, 2015). El uso de estos insecticidas está muy extendido porque son fáciles de obtener y por su rapidez de acción, lo que los hace muy efectivos. También son relativamente baratos y presentan beneficios en la salud humana al eliminar algunos insectos vectores de enfermedades, permitiendo disminuir su prevalencia (Sarwar, 2015c). Pese a sus ventajas, su utilización también acarrea ciertos problemas como su acumulación y permanencia en el ambiente, causando la contaminación de los ecosistemas y aguas subterráneas (Mishra, Tewari, Singh, & Arora, 2015), y peligro para los seres vivos que estén expuestos a su potencial tóxico. En los seres humanos su exposición puede llegar a desarrollar diversas enfermedades como asma, hipersensibilidad, alergias, e incluso, cáncer (K. H. Kim, Kabir, & Jahan, 2017). Aunque se ha podido controlar ciertas plagas con insecticidas químicos, otras han desarrollado resistencia a dichos productos (Shea, Possingham, Murdoch, & Roush, 2002) por su uso inadecuado y excesivo. A pesar de esta estrategia de control de plagas mediante agentes químicos, las pérdidas de cultivos muestran una tendencia creciente (Dhaliwal, Jindal, & Dhawan, 2010).

### **2.2. Biopesticidas**

Con el paso del tiempo se han ido produciendo insecticidas cada vez más tóxicos y ha sido necesario recurrir a otros métodos de control más ecológicos como el empleo de productos de origen natural denominados bioinsecticidas (Cuevas, 2006). A pesar de que este tipo de plaguicida solo representa el 1% de las ventas de productos fitosanitarios en el mercado, en las últimas décadas ha aumentado su comercio, pudiéndose encontrar unos 700 productos registrados a nivel mundial (Kachhawa, 2017). Este crecimiento se ha visto influido positivamente por el aumento de la agricultura orgánica y su impacto en el mercado (Lacey et al., 2015). El éxito mercantil de los bioplaguicidas depende del tipo de plaga que se quiere controlar, de su

mecanismo de acción y consecuente respuesta y de la cantidad de aplicaciones que son necesarias para su erradicación (Mehrotra, Kumar, Zahid, & Garg, 2017).

Los bioinsecticidas están formados por organismos vivos que se encuentran en medios naturales y entre ellos se incluyen microorganismos (pesticidas microbianos), extractos de plantas y sustancias derivadas de animales (pesticidas bioquímicos) (Kachhawa, 2017; Mehrotra et al., 2017). Entre las ventajas que muestran estos insecticidas con respecto a los plaguicidas convencionales destacan su menor contaminación de los ecosistemas, su acción contra especies plaga específicas, lo que implica que no son patógenos para el resto de seres vivos no relacionados con dichas plagas, su biodegradabilidad y la necesidad de una menor cantidad de aplicaciones para obtener resultados adecuados (Grijalba, Hurst, Ibarra, Jurat, & Jackson, 2018; Mehrotra et al., 2017).

Los plaguicidas bacterianos son los pesticidas microbianos más usados y suelen ser empleados para controlar plagas de polillas, mariposas, escarabajos, moscas y mosquitos, generalmente porque producen toxinas específicas contra ellos y les provocan enfermedades frecuentemente mortales (Kachhawa, 2017).

Las bacterias no solo son patógenas contra los insectos, sino que también pueden estar asociadas a ellos de manera simbiótica, facilitándoles la colonización de nuevas zonas y la especialización en determinadas dietas. Estas relaciones pueden llegar a ser obligadas (existentes en al menos un 10% de todas las especies de insectos (Henry, Maiden, Ferrari, & Godfray, 2015)) siendo clasificadas como mutualistas (se benefician ambos organismos), parasitarias (uno de los organismos se beneficia del otro causándole daño en el proceso) y comensales (uno de los organismos obtiene beneficio sin afectar al otro) (Feldhaar, 2011; Grijalva & Giraldo, 2006).

### **3. OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica que trate sobre bacterias entomopatógenas y sus principales características, mecanismos de acción y su potencial uso como bioinsecticidas amigables con el medio ambiente contra plagas de insectos, en detrimento de los insecticidas convencionales de origen químico. Además, se desarrollará una búsqueda de información relacionada específicamente con la caracterización y utilización de la bacteria *Bacillus*

*thuringiensis*, por ser esta la más empleada como insecticida de origen microbiano en el mundo.

#### **4. METODOLOGÍA**

El material bibliográfico recopilado para desarrollar los objetivos presentados se ha obtenido a través de los motores de búsqueda especializados como Google académico, Springer Link, National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Dialnet.

#### **5. DISCUSIÓN**

Es muy importante poder tener un mayor control de las plagas de insectos para evitar que invadan los nichos ecológicos y ocasionen daños en las poblaciones de insectos nativas que se encuentren donde ellas ataquen ya que podrían provocar una pérdida de diversidad ecológica de esos lugares. También su correcto manejo incrementaría la seguridad ambiental y sanitaria y, de esta forma, se mejoraría la calidad de vida humana y sería posible disminuir los gastos económicos derivados de los tratamientos médicos para tratar las enfermedades infecciosas generadas por ellas. En un futuro es probable que el uso de insecticidas químicos continúe decreciendo hasta que, prácticamente, se cese su empleo porque más especies de insectos acabarán desarrollando resistencia a estos y, aunque se utilice una mayor cantidad de insecticida, no se obtendrán los resultados de control de las plagas mínimamente esperados, además de la gran contaminación que se genera con ellos. En su lugar, es posible que los plaguicidas microbianos, entre ellos los bioinsecticidas bacterianos, ocupen su lugar en el mercado por sus características más ecológicas.

##### **5.1. BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS**

###### **5.1.1. Características, clasificación y plagas hospedadoras**

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares que no presentan membrana nuclear y otros orgánulos con membrana intracelular definida (Glare, Jurat-Fuentes, & O'Callaghan, 2017). Las bacterias Gram-positivas son ubicuas, con forma de coco y bacilo y pueden ser aerobias y anaerobias facultativas o estrictas. Algunas de ellas, en condiciones desfavorables son capaces de formar esporas de resistencia permitiéndole mantenerse más estable en procesos de producción, formulación y

almacenamiento. Las bacterias Gram-negativas también se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, tienen forma de coco y bacilo, son aerobias y anaerobias facultativas; sin embargo, no son formadoras de esporas, lo que las hace más inestables en los procesos anteriormente nombrados (Grijalba et al., 2018).

Las bacterias entomopatógenas que se comercializan producen toxinas que son empleadas para combatir las plagas. Algunas de estas bacterias completan sus ciclos vitales dentro del insecto hospedador mientras que otras pueden vivir y crecer fuera de este. Además, existen ciertas bacterias que producen toxinas que se pueden emplear contra las plagas sin necesidad de utilizar a la bacteria viva para ello.

Gran parte de las bacterias entomopatógenas pertenecen a las familias Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae y Micrococcaceae. Estas dos últimas familias también presentan actividad patógena contra insectos, pero en menor medida que las anteriores. Las bacterias con un mayor éxito comercial son las bacterias Gram-positivas del orden *Bacillales*, más concretamente los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Lysinibacillus*, que forman toxinas cuando esporulan en condiciones adversas y que pueden estar asociadas con cuerpos parasporales proteicos (cristales). Los bioplaguicidas basados en bacterias no formadoras de esporas no son tan comunes porque presentan problemas de inestabilidad al almacenarlos (Glare et al., 2017; Kachhawa, 2017; Mampallil, Faizal, & Anith, 2017).

Dentro de la familia Bacillaceae se encuentran, por ejemplo, las especies *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus* y *Paenibacillus popilliae* (Mampallil et al., 2017) y *Bacillus moritai* (EE.UU. Patente N° 3,632,747, 1972). En la familia Pseudomonadaceae están *Pseudomonas protegens* (Kupferschmied, Pèchy-Tarr, Imperiali, Maurhofer, & Keel, 2014), *Pseudomonas fluorescens* (Mampallil et al., 2017) y *Pseudomonas entomophila* (Dieppois, Opota, Lalucat, & Lemaitre, 2015), entre otras. Dentro de la familia Enterobacteriaceae se distinguen, por ejemplo, *Serratia marcescens*, *Serratia entomophila* (Ruiu, 2015), *Yersinia entomophaga* y *Yersinia enterocolitica* (Glare et al., 2017). Además, también destaca la familia Clostridiaceae pudiendo encontrarse en ella a la bacteria *Clostridium bifermentans* (Castagnola & Stock, 2014).

También se pueden encontrar otro grupo de bacterias entomopatógenas que viven en endosimbiosis con nemátodos insecticidas, en concreto pertenecientes a los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*. Dichas bacterias, junto con los nemátodos, generan ciertos metabolitos que les posibilitan la colonización y reproducción dentro del insecto huésped (Sindhu, Sehrawat, Sharma, & Khandelwal, 2017). En estos géneros se distinguen las bacterias *Photorhabdus luminescens* y *Xenorhabdus nematophila* (Kim, Ji, Cho, & Park, 2005).

Las toxinas que producen y los insectos diana sobre los que éstas actúan se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1).

	Toxinas más conocidas	Plagas diana	Referencias
<b>Familia Bacillaceae</b>			
<i>Bacillus thuringiensis</i>	$\delta$ -endotoxinas (toxinas Cry)	Etapas larvales de diferentes órdenes de insectos	(Mampallil et al., 2017)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Toxinas Bin y Mtx	Larvas de mosquitos	(de Maagd, 2015; Glare et al., 2017)
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Proteínas secretadas insecticidas	Coleópteros, lepidópteros y dípteros	(Glare et al., 2017; Mampallil et al., 2017)
<i>Paenibacillus popilliae</i>	Cristales parasporales	Larvas de coleópteros fitófagos <i>Popillia japónica</i> y <i>Amphimallon majalis</i>	(Park, Federici, & Sakano, 2006; Mampallil et al., 2017)
<i>Bacillus moritai</i>	Esporas	Larvas de mosca	(Patent No. 3,632,747, 1972)
<b>Familia Pseudomonadaceae</b>			
<i>Pseudomonas protegens</i>	Toxinas Fit	Larvas de insectos plaga agrícolas	(Kupferschmied et al., 2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Toxinas Fit	<i>Manduca sexta</i> y <i>Galleria mellonella</i> (lepidópteros)	(Castagnola & Stock, 2014)
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Toxina TccC	Dípteros, lepidópteros y coleópteros	(Dieppois et al., 2015)
<b>Familia Enterobacteriaceae</b>			
<i>Serratia marcescens</i>	Exoenzimas	Lepidópteros, coleópteros y dípteros	(Fly, Kenne, & Boman, 1980)
<i>Serratia entomophila</i>	Proteínas Sep	<i>Costelytra zealandica</i> (coleóptero)	(Ruiu, 2015)
<i>Yersinia entomophaga</i>	Complejo proteico (Yen-Tc)	Coleópteros, lepidópteros y ortópteros	(Glare et al., 2017)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Complejo de toxinas (Tc)	Larvas de <i>Manduca sexta</i> (lepidóptero)	(Pinheiro & Ellar, 2007)
<b>Familia Clostridiaceae</b>			
<i>Clostridium bifermentans</i>	Toxinas Cry	Mosquitos y moscas negras (dípteros)	(Glare et al., 2017)
<b>Otras</b>			
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Complejo de toxinas (Tc)	Lepidópteros, coleópteros y hemípteros	(Shawer, Donati, Cellini, Spinelli, & Mori, 2018)
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	Complejo de toxinas (Tc)	Coleópteros y lepidópteros	(Sheets & Aktories, 2016)

Tabla 1. Ejemplos de bacterias entomopatógenas y sus toxinas más conocidas contra insectos plaga

### 5.1.2. Estructura intestinal de los insectos y estrategias bacterianas para superar sus defensas

Es importante conocer la anatomía y la fisiología normal del intestino del insecto donde tiene lugar la toxicidad. Aunque pueda parecer un simple tubo largo y flexible que se extiende desde la boca hasta el ano, se trata de un órgano estructurado en regiones que cumplen determinadas funciones (Lee, Lee, & Lee, 2017; Whalon & Wingerd, 2003). El intestino está dividido en tres partes bien definidas (Figura 1): intestino anterior (estomodeo), intestino medio o mesenterón e intestino posterior (proctodeo) (Medel, Molina, Seguel, Rebolledo, & Quiroz, 2013). El intestino anterior y posterior están cubiertos por una cutícula mientras que el intestino medio no lo está y, en su lugar, presenta una capa epitelial rodeada de una membrana peritrófica que crea una barrera entre esta capa epitelial y el lumen del intestino medio (Vallet-Gely, Lemaitre, & Boccard, 2008). Entre esta membrana y el epitelio existe una capa de moco que contribuye a la protección del insecto frente a la entrada de patógenos y sustancias tóxicas (Lee et al., 2017).

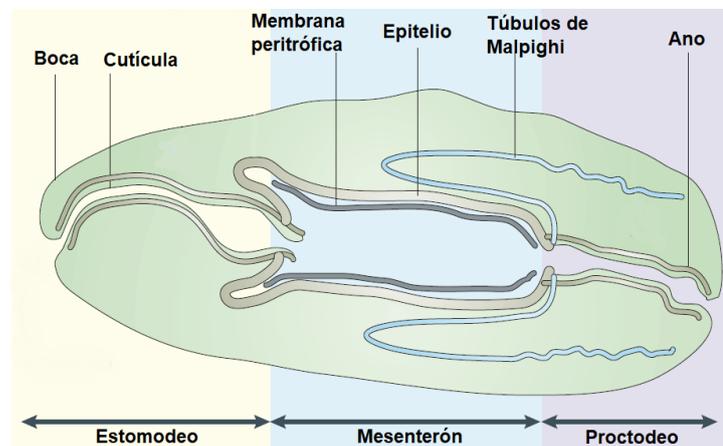


Figura 1. Representación gráfica del intestino de un insecto modelo en la que se muestran las partes en las que se divide. Imagen modificada (Vallet-Gely, Lemaitre y Boccard, 2008)

Las bacterias entomopatógenas han desarrollado diversas estrategias para interactuar y matar insectos. Gran parte de estas implican sistemas de secreción especializados que transportan proteínas desde el citoplasma de la bacteria hasta su superficie, al ambiente del insecto hospedador o a las propias células de este. Estas proteínas son las encargadas de impulsar la virulencia bacteriana permitiendo la evasión del propio sistema defensivo del insecto, su intoxicación y obtención de sus nutrientes. Estos sistemas de secreción pueden expresarse como respuesta al reconocimiento de ciertos receptores presentes en los insectos o a algunas señales provenientes del ambiente en el que se encuentra el hospedador (McQuade & Stock, 2018).

### 5.1.3. Mecanismos de acción de las toxinas bacterianas

Muchas de las especies de bacterias entomopatógenas comparten una forma de causar enfermedades y daños semejante, que se caracteriza por la producción de diversos factores de virulencia entre los cuales tienen una gran importancia las distintas toxinas producidas por cada especie. Las bacterias entomopatógenas comercializadas generan infección al introducirse por vía oral en los insectos (de Bortoli & Jurat-Fuentes, 2019).

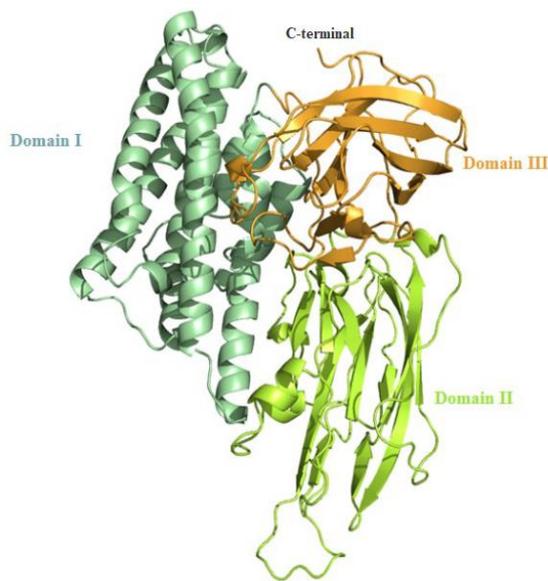


Figura 2 - Representación esquemática en 3D de una proteína Cry y sus 3 dominios. Figura modificada (Xu et al., 2014)

Las toxinas Cry son las toxinas insecticidas más estudiadas y caracterizadas (Glare et al., 2017). Se acumulan como inclusiones cristalinas (cristales parasporales), que se encuentran dentro del esporangio y, generalmente, fuera del exosporio de la espora, suponiendo el 20-30% del peso seco de la célula madre que esporula, sirviendo así de protección contra la degradación proteolítica prematura en el intestino del insecto hospedador. Aunque se pueden dividir en muchos grupos dependiendo de sus secuencias, existen cuatro clases principales de toxinas Cry denominadas Cry I (con especificidad para lepidópteros), Cry II (con especificidad para lepidópteros y dípteros), Cry III (con especificidad para coleópteros) y Cry IV (con especificidad para dípteros). Su estructura se basa en tres dominios (dominio I, dominio II y dominio III) conectados por uniones individuales, siendo la extensión C-terminal fundamental para la toxicidad (Figura 2) (Bravo, Gill, & Soberón, 2007; Chattopadhyay, Bhatnagar, & Bhatnagar, 2004; Sauka & Benintende, 2008).

El mecanismo de acción de este tipo de toxinas se ha explicado en lepidópteros y presenta varias etapas (Figura 3):

#### 5.1.3.1. Ingestión y activación de las toxinas

El insecto ingiere la toxina en forma de inclusión parasporal soluble que se disuelve en el intestino medio y se liberan las proteínas en forma de protoxinas

inactivas. Estas protoxinas están compuestas por la estructura de la toxina activa unida a una secuencia N-terminal corta y una secuencia C-terminal. Para que se produzca la toxicidad en el insecto, la protoxina tiene que ser procesada y activada por la acción de las proteasas (enzimas digestivas) del intestino medio, encargadas de digerir las secuencias N-terminal y C-terminal en sitios específicos y liberando, de esta

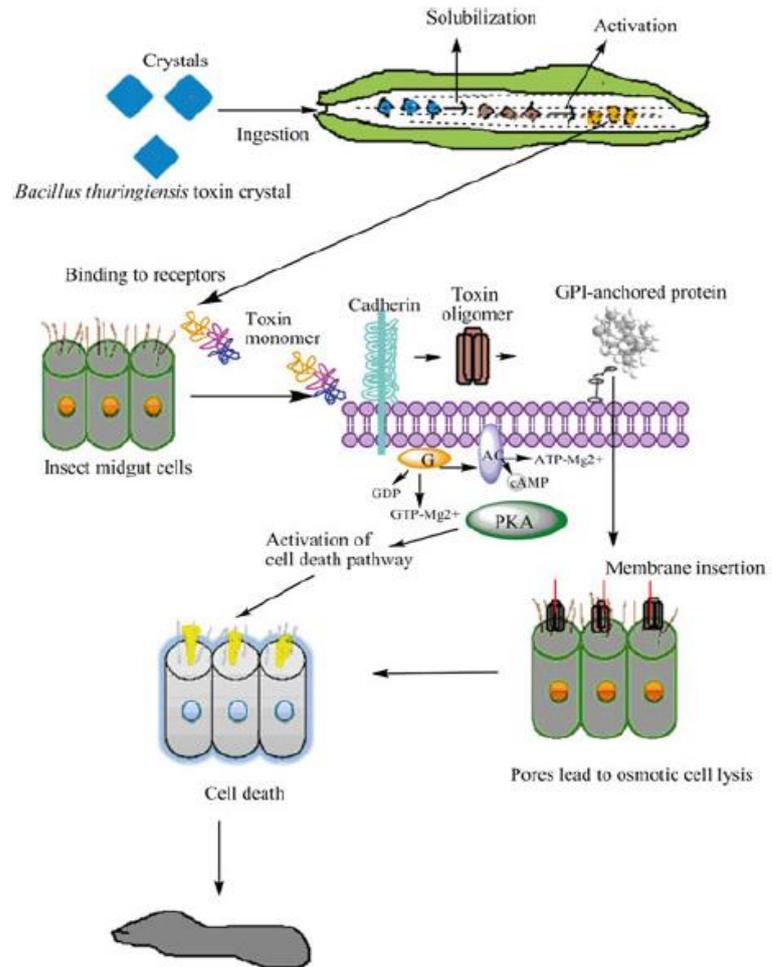


Figura 3 – Mecanismos de acción de las toxinas Cry de *Bt* en lepidópteros. (Figura tomada de Senthil-Nathan, 2015)

forma, las proteínas activas de la toxina Cry que, además, son resistentes a dichas enzimas (Chattopadhyay et al., 2004; Whalon & Wingerd, 2003). La solubilización de estos cristales también se ve afectada por el grado de acidez del intestino ya que para que se puedan disolver, el pH tiene que ser alcalino (Sanchis, 2011). Este proceso se ve favorecido porque el intestino medio en los lepidópteros es un entorno bastante alcalino, alcanzando valores entre 10 y 11 en la escala de pH (Whalon & Wingerd, 2003).

### 5.1.3.2. Difusión de las toxinas y unión a receptores específicos

Cuando ya están activadas las toxinas se difunden desde el lumen intestinal de la membrana periplasmática hacia el espacio endoperiplasmático donde pueden acceder a la membrana epitelial (Whalon & Wingerd, 2003). En las vesículas de membrana de las microvellosidades apicales de las células intestinales se encuentran receptores específicos que son reconocidos por las

toxinas y donde terminan uniéndose. Entre los receptores se distinguen cadherinas, aminopeptidasas N (APN), fosfatasa alcalina y proteínas de 210 kDa (Portela-Dusán, Chaparro-Giraldo, & López-Pazos, 2007).

La unión entre la toxina activada y los receptores se realiza en dos fases:

- Fase reversible: Se produce cuando interaccionan la toxina con el sitio de unión del receptor. En este proceso actúan los dominios II y III.
- Fase irreversible: La proteína se une a la proteína receptora del insecto y se insertan en la membrana. Las hélices que conforman el dominio I se abren, se insertan en la membrana y el dominio III se coloca en la superficie de la membrana sobre las hélices (Portela-Dusán, Chaparro-Giraldo, & López-Pazos, 2007; Whalon & Wingerd, 2003).

#### **5.1.3.3. Formación de poros que desemboca en un desequilibrio osmótico**

Tras la unión, se produce una cascada de señalización dependiente de  $Mg^{2+}$  que promueve la exocitosis de cadherina desde vesículas intracelulares que se dirigen hacia la membrana apical celular, incrementándose así la cantidad de receptores específicos de la toxinas, y generando una amplificación de la señal inicial. Esto propicia la agregación de las proteínas Cry insertadas y se crean poros citolíticos o canales de fuga en el epitelio del intestino medio (Chattopadhyay et al., 2004; Sauka & Benintende, 2008). Estos poros forman un canal iónico selectivo de  $K^+$  que provoca en el insecto dos cambios fisiológicos negativos para su organismo. En primer lugar, se rompe el gradiente de  $K^+$  en el epitelio intestinal y, con ello, aumenta la concentración de dicho ion en la hemolinfa del artrópodo. En segundo lugar, en el lumen del intestino medio el pH desciende mientras que en la hemolinfa aumenta al detenerse el gradiente iónico (Whalon & Wingerd, 2003). Al final, la permeabilidad selectiva de la membrana se pierde y comienza a entrar agua, aniones, cationes y moléculas con un mayor peso molecular, resultando en una turgencia celular e incapacidad para regular la presión osmótica (Chattopadhyay et al., 2004; Portela-Dusán et al., 2007). En consecuencia, los órganos celulares como los núcleos, los ribosomas, las mitocondrias y el

retículo endoplasmático se alteran y las células que conforman el epitelio se destruyen tras un proceso de lisis osmótica coloidal dejando salir todo su contenido (Chattopadhyay et al., 2004).

#### **5.1.3.4. Muerte del insecto**

Tras la lisis celular las esporas pueden germinar en el medio casi neutral que se ha generado y que contiene todos los nutrientes provenientes de las células rotas (Whalon & Wingerd, 2003). Además, el intestino medio se paraliza y las esporas invaden los tejidos adyacentes, lo que conlleva que el insecto cese su alimentación y muera en un intervalo entre 12 horas y 5 días tras la ingestión de los cristales parasporales.

Los poros y los canales iónicos dejan pasar a las nuevas células vegetativas, que se han desarrollado tras la migración de las esporas, hacia la hemolinfa, lo que termina empeorando la intoxicación. Se produce una bacteriemia y septicemia aguda porque al dañarse el epitelio intestinal, las bacterias propias del intestino del insecto pueden trasladarse hacia el hemocele y contaminar la hemolinfa, acelerándose el proceso de muerte (Chattopadhyay et al., 2004; Sauka & Benintende, 2008).

En el caso de las bacterias que conviven simbióticamente con nemátodos entomopatógenos en el interior de su intestino, pertenecientes a los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, son empleadas por dichos animales para invadir las larvas de algunos insectos tanto por vía oral, anal o traqueal. En el interior del hospedador, los nemátodos liberan a las bacterias y estas se encargan de matarlo en aproximadamente 48 horas (Sheets & Aktories, 2016).

Para elaborar un insecticida bacteriano comercialmente deseable es importante que este detenga rápidamente la ingestión de cultivos por parte del insecto y cause su muerte en un periodo de tiempo muy breve para que haya una menor pérdida de cosechas. El crecimiento bacteriano durante la infección del insecto hospedador presenta las tres fases características de un cultivo bacteriano. La fase de latencia tiene lugar cuando las células vegetativas se adecuan a las condiciones del hospedador y proliferan por fisión binaria. La fase exponencial o logarítmica se da en el hemocele al generarse la septicemia y posterior muerte del insecto. Por último, la fase estacionaria ocurre cuando se empiezan a acumular metabolitos secundarios de

las nuevas células vegetativas y al ir agotándose los nutrientes. Esto puede conducir a un nuevo proceso de esporulación (Glare et al., 2017).

## **6. BACILLUS THURINGIENSIS**

El género *Bacillus* se vende abundantemente como bioplaguicida en el comercio mundial por su amplia capacidad para generar productos útiles y demandados por las industrias alimentarias, farmacéuticas, ambientales y agrícolas porque son muy necesarios en ciertas actividades antrópicas. Los individuos de este género son considerados como pequeñas fábricas capaces de producir muchas moléculas biológicamente activas (Sansinenea, 2019).

*Bacillus thuringiensis* es la bacteria entomopatógena más conocida y mejor estudiada (Sansinenea, 2019) y, además, se presenta como el insecticida de origen biológico con mayor cuota en el mercado (Soberón & Bravo, 2008), representando aproximadamente el 90% de los pesticidas microbianos disponibles (de Bortoli & Jurat-Fuentes, 2019).

### **6.1. Características de *B. thuringiensis***

*B. thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, con forma de bacilo, con un tamaño de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 1-1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y ubicua, puesto que puede encontrarse en cualquier lugar del planeta y en distintos ambientes como el suelo, el agua, las hojas de las plantas, etc. Presenta dos fases diferentes en su ciclo vital: crecimiento vegetativo, en el cual las bacterias se duplican mediante bipartición, y esporulación, donde ocurre una diferenciación de la bacteria a espora (Castañet & Moreno, 2016; Hollensteiner et al., 2017; Soberón & Bravo, 2008).

*Bt* posee ciertas características particulares que la hacen diferente a otras bacterias de su género como son su capacidad para vivir en el medio ambiente de forma libre e independiente de otros bacilos Gram-positivos formadores de esporas, la formación de cristales parasporales compuestos por proteínas insecticidas y su capacidad para sobrevivir en un nicho ambiental único como son el intestino medio y el hemocele de los insectos (Ibrahim, Griko, Junker, & Bulla, 2010).

## 6.2. Descubrimiento

*Bt* fue aislada por primera vez en el año 1901 por el bacteriólogo japonés Ishawata Shigetane cuando se encontraba investigando la causa de la enfermedad que producía una muerte súbita en larvas de gusano de seda (*Bombyx mori*). Observó que los cultivos de bacterias en crecimiento activo no resultaban patógenos para las larvas mientras que los cultivos sometidos a un proceso de esporulación sí eran dañinos para ellas. No fue hasta 1915 cuando fue totalmente descrita por el científico alemán Ernst Berliner al investigar larvas de polilla mediterránea enfermas (*Ephestia kuehniella*). El nombre “thuringiensis” se debe a que estas larvas se encontraron en Turingia (estado de Alemania). Este científico advirtió un cuerpo presente en las bacterias esporuladas formado por cristales, pero no lo relacionó con la intoxicación de los insectos (Osman et al., 2015).

En 1953 Thomas Angus atribuyó la presencia de estos cristales a la patogenicidad en los insectos y se estableció el nombre de “cristales parasporales” por Christopher Hannay. Finalmente, en 1955, Hannay y Philip Fitz-James descubrieron que dichos cristales están formados por proteínas (Ibrahim et al., 2010).

## 6.3. Uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida

En los años 50 del pasado siglo se estudió la obtención de cultivos de *Bt* a gran escala y se vio que su costo era bastante bajo. Debido a esto ha sido empleado como insecticida en Estados Unidos desde 1958, aunque ya en 1938, en Francia, se comercializaba el primer insecticida, llamado Sporoine, basado en *Bt* para controlar las polillas de la harina. Fue en 1961 cuando se registró por primera vez por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (Ibrahim et al., 2010; Osman et al., 2015).

A partir de ahí, los estudios se han centrado en aumentar la eficacia de los productos comercializados y basados en esta bacteria y en aumentar su toxicidad intrínseca (Osman et al., 2015).

#### 6.4. Cepas de *Bt*

En 1970, De Barjac y Lemille analizaron los cultivos de una bacteria que había aislado Edouard Kurstak en 1962 cuando estudiaba la enfermedad en unas larvas de la polilla de la harina (*E. kuehniella*) provenientes de Francia y encontraron que se trataba de una nueva subespecie de *Bt* a la que denominaron *kurstaki*. Esta nueva bacteria se empleó como insecticida contra plagas de lepidópteros. Hasta mediados de los años 70 todos los bioinsecticidas creados se basaban en esta bacteria y se utilizaban bastante en la agricultura porque presentaba una toxicidad 200 veces superior que otras cepas empleadas en otros productos en aquella época (Sauka & Benintende, 2008), pero con el auge de los insecticidas de origen sintético su comercio disminuyó. También en el año 1962 se descubrió una nueva subespecie en Japón. El científico responsable fue Keio Aizawa y la llamó *aizawai*. Se observó que era muy tóxica contra plagas de larvas del lepidóptero *Galleria mellonella*, polilla de la cera que llega a ser una plaga en las colmenas de abejas melíferas (Sansinenea, 2012).

Más tarde, en 1976, Goldberg y Margalit descubrieron otra subespecie en el desierto de Negev en Israel que era eficaz contra las larvas de una amplia gama de especies de mosquitos, aunque más recientemente se ha demostrado que también es activa contra moscas negras. Por su alta eficacia y su limitado espectro de acción sustituyó a otros productos de amplio espectro comercializados (Sansinenea, 2012).

En 1983, Krieg *et al.* descubrieron otra subespecie en Alemania muy tóxica tanto para las larvas como los individuos adultos de coleópteros importantes, entre ellos la especie *Tenebrio molitor*, conocida vulgarmente como gusano de la harina, por lo que fue bautizada como *tenebrionis*. Aunque era muy efectiva contra los escarabajos, los insecticidas basados en ella no lo eran y en el mercado mundial se prefería la venta de insecticidas químicos (Sansinenea, 2012).

Aparte de estas subespecies nombradas, se han aislado decenas de miles de cepas de *Bt* activas que actúan contra las fases larvarias de distintos insectos (Adang, Crickmore, & Jurat-fuentes, 2014).

#### 6.5. Otras toxinas producidas por *Bt* distintas de las toxinas Cry

Cada cepa de *B. thuringiensis* puede producir una o más toxinas, siendo estas las que determinan la especificidad por el insecto hospedador (de Maagd, 2015). Mediante el

empleo de distintas técnicas de detección e identificación se han clasificado aproximadamente 950 genes diferentes de toxinas que se dividen en 74 grupos Cry, 3 grupos Cyt y 4 grupos de proteínas Vip (Bravo et al., 2017; Chakroun, Banyuls, Bel, Escriche, & Ferré, 2016).

### **6.5.1. Toxinas Cyt**

Al igual que las toxinas Cry, las toxinas Cyt son formadoras de poros, se secretan como proteínas solubles en agua y cambian de conformación al insertarse en la membrana intestinal de los insectos hospedadores (Bravo, Likitvivatanavong, Gill, & Soberón, 2011). Son un subconjunto de toxinas cristalinas que se llaman de esta forma porque tienen actividad citolítica (de Maagd, Bravo, Berry, Crickmore, & Schnepf, 2003). De los tres grupos de toxinas Cyt que se han establecido, los grupos Cyt 1 y Cyt 2 presentan actividad específica contra las larvas de los dípteros mientras que del grupo Cyt 3 se desconoce su especificidad (Bravo et al., 2017). Se ha demostrado que estas toxinas son importantes en la toxicidad de los mosquitos ya que colaboran en la actividad de algunas toxinas Cry (Soberón, López-díaz, & Bravo, 2013).

Con respecto a su mecanismo de acción, se han propuesto dos diferentes: (1) el conjunto de subunidades proteicas que conforman la toxina forma un poro en la membrana (de Maagd et al., 2003) y (2) Cyt afecta al insecto mediante su acción detergente generando una agregación inespecífica de esta toxina en la superficie de la bicapa lipídica, lo que genera una rotura de la membrana y la consiguiente muerte celular (Soberón et al., 2013).

### **6.5.2. Proteínas Vip**

Durante el crecimiento vegetativo de muchas cepas de *Bt* se segregan ciertas toxinas, llamadas proteínas Vip, que no forman cristales ni presentan homología con las toxinas Cry (de Maagd et al., 2003). Estas proteínas se dividen en cuatro familias, tres de ellas activas contra insectos. Por un lado, se encuentran las proteínas Vip1 y Vip2, tóxicas para ciertos individuos de los órdenes *Coleoptera* y *Hemiptera* y que actúan como toxinas binarias de tipo A+B, donde Vip 2 es el dominio A citotóxico (entra en la célula) y Vip1 es el dominio de unión al receptor responsable de la translocación de Vip2 a las células del insecto hospedador (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, & Caballero, 2014). Su modo de acción es el

siguiente: al ser ingeridas, la protoxina Vip1 sufre la acción de las proteasas del intestino medio del insecto, se convierte en una toxina activa y se une a receptores específicos de membrana. Tras esto, se oligomeriza y se le une la proteína Vip2 y, esta, a continuación, se introduce en la célula mediante un proceso de endocitosis que afecta, bien a todo el complejo formado o bien individualmente a través del poro creado por Vip1 (Chakroun et al., 2016).

Por otro lado, están las proteínas Vip 3 (no binarias) que son tóxicas para muchos lepidópteros (Palma et al., 2014) y cuyo mecanismo de acción es semejante al de las proteínas Cry, es decir, sufren una activación proteolítica al ser ingeridas, se unen a la membrana del epitelio del intestino medio y forman poros en sitios de unión que son diferentes de los de las proteínas Cry (Chakroun et al., 2016).

#### **6.6. Generaciones de bioinsecticidas basados en *Bt***

Se han llevado a cabo muchas investigaciones con el objetivo de desarrollar y mejorar los productos basados en este agente de biocontrol. A causa de su alta especificidad se necesita estudiar y seleccionar los mejores ingredientes para optimizar la formulación de dichos bioinsecticidas y, con ello, aumentar el éxito del control. Estos productos se basan principalmente en una mezcla de cristales y esporas obtenidos de los cultivos de bacterias (Rosas-García, 2008) y se pueden clasificar en:

- a) **Productos de primera generación:** son todos aquellos bioinsecticidas que incluyen cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Representan la mayor parte de los productos insecticidas comercializados en el mercado mundial porque su uso presenta un menor riesgo de desarrollo de resistencia en insectos en comparación con los insecticidas químicos; además, las políticas nacionales referentes al empleo de estos plaguicidas convencionales y el elevado costo en la creación de nuevos insecticidas químicos han motivado el uso de estos bioplaguicidas (Sauka & Benintende, 2008).

Sin embargo, se presentan algunos inconvenientes como: un estrecho rango de actividad cuando hay más de una plaga sobre la que actuar, debilidad frente a la radiación solar cuando se encuentran en el medio ambiente e inexistente alcance cuando se trata de insectos que atacan raíces o partes internas de la planta (Portela-Dusán et al., 2007).

- b) **Productos de segunda generación:** estos bioplaguicidas están compuestos también por esporas y cristales, pero se emplea una cepa de *B. thuringiensis* modificada genéticamente mediante la transferencia de genes *cry* propios de otras cepas ampliando de esta forma el espectro de acción y/o aumentando la toxicidad inherente en la cepa de manera aditiva y, también, reduciendo las probabilidades de generar resistencia en el hospedador. Esta manipulación genética se consigue a través de la transformación, transducción, conjugación, recombinación o creación de proteínas Cry híbridas, entre otros (Sauka & Benintende, 2008).
- c) **Productos de tercera generación:** estos productos están constituidos por bacterias recombinantes, como *Pseudomonas fluorescens*, que es capaz de llegar hasta los tejidos de la planta y crecer en las raíces, modificadas genéticamente con genes *cry*, o por cepas de *Bt* modificadas con otros genes que codifican factores de virulencia diferentes de las proteínas Cry. (Portela-Dusán et al., 2007; Sauka & Benintende, 2008)

Con estos nuevos bioinsecticidas se mejorarían los productos de las primeras generaciones y se obtendrían insecticidas más ecológicos para que dañen menos los ecosistemas que podrían competir de manera óptima en el mercado con los de origen químico.

## 7. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS BIOPLAGUICIDAS

Ayudar a proteger los cultivos de una manera más sostenible requiere de alternativas más amigables con el medio ambiente. Para ello se han ido empleando cada vez más los bioinsecticidas microbianos puesto que ofrecen numerosas ventajas con respecto a los insecticidas convencionales, aunque también presentan algunas desventajas como se muestra en la Tabla 2.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Eficaz aun en pequeñas cantidades</li> <li>✓ Alta biodegradabilidad (rápida descomposición)</li> <li>✓ Menor generación de residuos</li> <li>✓ Menor riesgo de toxicidad para la salud del ser humano y el medio ambiente</li> <li>✓ Rango objetivo específico</li> <li>✓ Posible uso combinado con pesticidas convencionales</li> <li>✓ Especificidad del hospedador, modo de acción y propiedades biodegradables conocidas</li> <li>✓ Menor costo de desarrollo que los insecticidas químicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X Comparado con los pesticidas químicos, su forma de actuar es más lenta</li> <li>X A veces, baja estabilidad</li> <li>X Menor vida útil</li> <li>X Problemas legales en algunos países</li> <li>X Bajo potencial de beneficio por su naturaleza altamente selectiva</li> </ul>

Tabla 2 - Ventajas y desventajas de los biopesticidas (Manchikanti, 2019)

La ventaja más destacada es la seguridad que ofrecen. Debido a que su toxicidad es específica sobre solo un grupo o especie de insectos, no afectan directamente a otros posibles insectos beneficiosos, entre ellos, depredadores o parásitos de las plagas, que se encuentren en la misma zona que ha sido expuesta a la acción de dichos bioinsecticidas.

No ocurre lo mismo en el caso de los insecticidas químicos donde su uso llega a ser perjudicial, no solo para la plaga diana, sino también para el ser humano al quedar expuestos a ellos de forma involuntaria tanto en el propio hogar, al ingerir alimentos que contienen residuos de estos pesticidas, como al entrar en contacto o inhalar aire que se encuentre contaminado por ellos, incluso aunque el nivel de exposición sea muy bajo, siendo los niños los más vulnerables a sus efectos.

Entre los inconvenientes más notables del uso de bioplaguicidas se encuentra su capacidad limitada para afectar solo a ciertas plagas. Con su uso, otros tipos de plagas no afectadas por la toxicidad del plaguicida podrán sobrevivir y seguir dañando y destruyendo las cosechas. A esto también se suma la baja tolerancia a temperaturas altas, desecación y exposición a radiación UV que reducen, en ciertos bioinsecticidas, considerablemente su eficacia. Como consecuencia de ambas desventajas, es muy

importante tener en cuenta el procedimiento para aplicar el producto adecuadamente y en el momento oportuno (K. H. Kim et al., 2017; Mnif & Ghribi, 2015).

## **8. CULTIVOS TRANSGÉNICOS *Bt***

Hasta los años 80, los productos insecticidas basados en *Bt* presentaban poca eficacia contra algunas plagas y suponía un problema porque no eran capaces de actuar sobre los insectos dentro del tallo o la raíz. Entre algunas de las soluciones que se han llevado a cabo es la modificación genética de las plantas (Sanchis, 2011) mediante la introducción de un gen que codifica una proteína pesticida específica de *Bt* (proteínas Cry y Vip, exclusivamente (Lacey et al., 2015)) en el ADN del vegetal, que será fabricada por la planta e ingerida por la plaga de insectos que se alimente de ella (Sarwar, 2015a).

La primera compañía en realizar modificaciones de esta índole, concretamente una planta de tabaco con genes *cry* en su material genético, fue la compañía belga Plant Genetic Systems en 1985, año en el que también otros científicos insertaron genes de *Bt* en plantas de algodón y tomate. En un principio se obtenían plantas que expresaban poca cantidad de proteínas Cry y, en consecuencia, eran susceptibles a los ataques de insectos y, por ello, fue necesaria la mejora en la protección de estas. En 1995, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos registró por primera vez productos (papa, maíz y algodón) con niveles comercialmente aceptables de proteínas de *Bt* (Sanchis, 2011).

Desde 1996 se han sembrado más de 560 millones de hectáreas con esta clase de cultivos en todo el mundo (Carrière, Crickmore, & Tabashnik, 2015), perteneciendo a Europa un total de 131535 hectáreas de dicha extensión, distribuidas en España y Portugal (Ichim, 2018) y siendo España el país europeo con más producción, con un 92% del total de cosechas de maíz transgénico (Sousa et al., 2018). Además, desde ese mismo año se han desarrollado 198 variedades de plantas modificadas genéticamente y se han aprobado ocho tipos de vegetales para uso comercial (maíz, algodón, papa, soja, tomate, álamo, arroz y berenjena) (Jouzani, Valijanian, & Sharafi, 2017), aunque no están totalmente aceptados en todo el mundo ya que en la Unión Europea se ha generado controversia con su seguridad y eficacia (Lacey et al., 2015; Sousa et al., 2018). Entre estos problemas se encuentran los posibles riesgos y efectos negativos para la salud humana, animal y medioambiental, la generación de

resistencia en los insectos plaga y la expresión de genes en un organismo diferente (Jouzani et al., 2017). A nivel gubernamental, ciertos organismos han implantado normas de etiquetado obligatorio para los alimentos con modificaciones en su genoma (Sousa et al., 2018).

A pesar de esta desconfianza, se ha demostrado, mediante estudios sobre los supuestos efectos en la salud y medio ambiente, que los productos comerciales transgénicos son seguros y manifiestan resultados beneficiosos a nivel medioambiental por permitir un menor empleo de insecticidas químicos y la ausencia de secuelas en otros organismos distintos de las plagas diana (Lacey et al., 2015).

A medida que pase el tiempo, se mejoren aún más los bioplaguicidas para que no se genere resistencia en los insectos plaga y no se den casos de toxicidad en otros organismos que no sean diana de estos, es posible que se lleguen a emplear en todo el mundo sin prohibiciones y siguiendo rigurosamente pautas para evitar un uso inadecuado de estos.

## **9. RESISTENCIA DE LOS INSECTOS A LAS TOXINAS DE *Bt***

Se produce resistencia a las toxinas de *Bt* cuando en algunos individuos de las plagas diana se generan ciertas variaciones genéticas que los hacen resistentes a ellas (Chattopadhyay et al., 2004). La utilización de *Bt* como agente de biocontrol ha generado un proceso de presión evolutiva que ha fomentado la aparición de resistencia en los insectos.

En 1985 se dio a conocer el primer caso de resistencia contra *Bt* en la especie *Plodia interpunctella* (polilla India de la harina) (Lacey et al., 2015; Sanchis, 2011). A partir de ese momento se han informado de más casos de resistencia, tanto contra bioinsecticidas como cultivos basados en *Bt*, en algunos países de Centroamérica, España, Australia y Sudáfrica (Melo, Soccol, & Soccol, 2014).

La resistencia se puede adquirir a través de mutaciones en los insectos que influyen en el modo de acción de las toxinas y se han demostrado diversos mecanismos que la desarrollan, entre los cuales se destacan el secuestro de las toxinas Cry por esterases o lipoforinas debido a una fuerte respuesta inmune y la alteración tanto en la activación de las toxinas Cry como de los receptores de estas, lo que provoca una

menor cantidad de uniones en la membrana epitelial del intestino medio de los insectos.

Las posibles estrategias para combatir este problema son:

- La plantación de cultivos no transgénicos cerca de las cosechas modificadas con genes de *Bt*, permitiéndose así la prevalencia de insectos sensibles a los efectos de las toxinas. De esta forma, se posibilita la reproducción entre individuos resistentes y sensibles generando una descendencia susceptible debido a la recesividad de los alelos que generan resistencia.
- El empleo de un conjunto de genes que codifican distintas toxinas Cry con mecanismos diferentes en un mismo pie de planta (Bravo et al., 2011).

## 10. CONCLUSIONES

1. La aparición de plagas supone un impacto negativo tanto en la agricultura como en la economía y la salud humana. Para combatir dichas plagas se ha recurrido al empleo de insecticidas químicos que, a pesar de contar con ciertas ventajas como su bajo coste económico y su fácil elaboración, han acabado generando con el paso del tiempo problemas de toxicidad y contaminación del medio ambiente.
2. Como alternativa ecológica se ha optado por el desarrollo de bioinsecticidas, cuyos beneficios más destacables con respecto a los insecticidas convencionales son su biodegradabilidad y la acción específica contra plagas diana.
3. Entre los bioinsecticidas predominan aquellos de origen microbiano, generalmente basados en bacterias entomopatógenas formadoras de esporas que generan proteínas tóxicas contra ciertos órdenes de insectos hospedadores de estas y que, tras ser ingeridas normalmente por vía oral, son activadas en su intestino medio gracias al pH alcalino de su interior donde, tras la unión específica con receptores presentes en su membrana epitelial, terminan generando poros y causando, en última instancia, la muerte por septicemia y bacteriemia.
4. La bacterias Gram-positivas pertenecientes al orden *Bacillales*, y en especial la especie *Bacillus thuringiensis*, también conocida como *Bt*, son las más empleadas en el mundo. Desde el descubrimiento de *Bt* se han realizado muchos estudios sobre su mecanismo de acción y sus diferentes toxinas, por lo que se trata de una bacteria bien caracterizada, con los que se ha logrado generar mejoras en los

productos basados en ella. Además, a partir de 1970, se han ido descubriendo distintas cepas de *Bt* que han permitido ampliar el rango de insectos hospedadores.

5. Aunque el empleo de esta bacteria presenta enormes ventajas, entre ellas, la inserción de genes *cry* de *Bt* en plantas para cosechar cultivos transgénicos resistentes a las plagas, también presenta ciertos problemas como la posible generación de resistencia en algunos insectos que pueden seguir dañando las cosechas y ocasionar importantes problemas agrícolas y económicos.
6. Si bien es cierto que los bioinsecticidas y los cultivos transgénicos se comercializan en todo el mundo, no están del todo aceptados en ciertas zonas, como en el caso de Europa, por presuntos riesgos con su uso. Ha sido necesario realizar estudios para corroborar su seguridad y eficacia con los que se ha pretendido aumentar su aceptación a nivel global.

## 10. CONCLUDING REMARKS

1. The appearance of pests has a negative impact on agriculture, the economy and human health. To combat these pests, humans have resorted to the use of chemical insecticides that, despite having certain advantages such as low economic cost and easy processing, have ended up generating over time problems of toxicity and environmental pollution.
2. As an ecological alternative, it has opted for the development of bioinsecticides, whose most outstanding benefits with regard to conventional insecticides are their biodegradability and the specific action against target pests.
3. Among the bioinsecticides, those of microbial origin predominate, generally based on entomopathogenic spore-forming bacteria that generate toxic proteins against certain orders of insect hosts that, after being ingested normally by oral route, are activated in their midgut thanks to the alkaline pH of its interior and, after specific binding with receptors present in its epithelial membrane, end up generating pores and causing, ultimately, death by septicemia and bacteremia.
4. The Gram-positive bacteria belonging to the order Bacillales, and especially the species *Bacillus thuringiensis*, also known as *Bt*, are the most widely used in the world. Since the discovery of *Bt* there have been many studies on its mechanism of action

and its different toxins, so it is a well characterized bacteria, with which it has been able to generate improvements in the products based on it. In addition, since 1970, different strains of Bt have been discovered that have allowed to expand the range of insect hosts.

5. Although the use of this bacterium has enormous advantages, including the insertion of *Bt cry* genes in plants to harvest transgenic crops resistant to pests, it also has certain disadvantages such as the generation of resistance in some insects that can continue to damage harvests and cause important agricultural and economic problems.

6. Although bioinsecticides and transgenic crops are sold worldwide, they are not fully accepted in certain areas, as in the case of Europe for alleged risks with their use. It has been necessary to carry out studies to corroborate its safety and efficacy with which it is intended to increase its acceptance globally.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adang, M. J., Crickmore, N., & Jurat-fuentes, J. L. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. En T. S. Dhadialla & S. Gill (Eds.), *Advances in Insects Physiology* (pp. 39–87). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 423–431. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Bravo, A., Pacheco, S., Gómez, I., García-Gómez, B., Onofre, J., & Soberón, M. (2017). Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action. En L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk, & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus* (pp. 1–288). Springer. doi: 10.1007/978-3-319-56678-8
- Carrière, Y., Crickmore, N., & Tabashnik, B. E. (2015). Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology*, 33, 161–168. doi: 10.1038/nbt.3099
- Castagnola, A., & Stock, S. P. (2014). Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests. *Insects*, 5, 139–166. doi: 10.3390/insects5010139
- Castañet, C., & Moreno, S. (2016). *Bacillus thuringiensis*: Características y uso en el control de *Aedes aegypti*. *Icidca*, 50(0138–6204), 37–42.
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., & Ferré, J. (2016). Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(2), 329–350. doi: 10.1128/MMBR.00060-15.Address
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N. B., & Bhatnagar, R. (2004). Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(1), 33–54. doi: 10.1080/10408410490270712
- Cruz, R., & Cruz, J. (2018). Diagnóstico y evolución del problema de plagas originada por *Dendroctonus adjunctus* BLF., en el predio comunal Pueblos Mancomunados, Ixtlán, Oaxaca; Periodo 2002-2010. *Ciencia e Innovación*, 1(1), 105–134.
- Cuevas, M. (2006). Insecticidas alternativos para el control de plagas en granos almacenados. *Inventio*, 3, 55–60.
- de Bortoli, C. P., & Jurat-Fuentes, J. L. (2019). Mechanisms of resistance to commercially relevant entomopathogenic bacteria. *Current Opinion in Insect Science*, 33, 56–62. doi: 10.1016/j.cois.2019.03.007
- de Maagd, R. A. (2015). *Bacillus thuringiensis*-Based Products for Insect Pest Control. En B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 185–192). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-08575-3
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 409–433. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143042

- Dhaliwal, G. S., Jindal, V., & Dhawan, A. K. (2010). Insect Pest Problems and Crop Losses : Changing Trends. *Indian Journal of Ecology*, 37(1), 1–7. doi: 10.13140/RG.2.2.25753.47201
- Dieppois, G., Opota, O., Lalucat, J., & Lemaitre, B. (2015). *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties. In J. Ramos (Ed.), *Pseudomonas* (pp. 25–49). Springer, Dordecht. doi: 10.1007/978-94-017-9555-5
- Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*, 36, 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x
- Flyg, C., Kenne, K., & Boman, H. (1980). Phage resistant Mutants with a Decreased Resistance to Cecropia Immunity and a Decreased Virulence to *Drosophila*. *Journal of General Microbiology*, 120, 173–181.
- García, F., Gutiérrez, G., Iturriaga, G., Raya, J., Blanco, A., Ramírez, J., Aguirre, C. (2017). Biocontrol De Insectos Plaga: Origen De Las Estrategias Y Tendencias Actuales. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México*, 5(2), 1–10.
- Glare, T. R., Jurat-Fuentes, J. L., & O’Callaghan, M. (2017). Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice* (pp. 47–67). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803527-6.00004-4
- Grijalba, E., Hurst, M., Ibarra, J. E., Jurat, J. L., & Jackson, T. (2018). Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. En *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico*. (pp. 298–333). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Bogotá.
- Grijalva, O., & Giraldo, G. I. (2006). Simbiosis bacteriana en insectos. *Boletín Del Museo de Entomología de La Universidad Del Valle*, 7(2), 24–40.
- Henry, L. M., Maiden, M. C. J., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2015). Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. *Ecology Letters*, 18(6), 516–525. doi: 10.1111/ele.12425
- Hollensteiner, J., Poehlein, A., Spröer, C., Bunk, B., Sheppard, A. E., Rosentstiel, P., Liesegang, H. (2017). Complete Genome sequence of the nematocidal *Bacillus thuringiensis* MYBT18246. *Standards in Genomic Sciences*, 12(48), 1–10. doi: 10.1186/s40793-017-0259-x
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50.
- Ibuki, S., & Fujiyoshi, N. (1972). *Patent No. 3,632,747*. doi: 10.1111/j.1559-3584.1927.tb04229.x
- Ichim, M. C. (2018). The Romanian experience and perspective on the commercial cultivation of genetically modified crops in Europe. *Transgenic Research*, 28(1). doi: 10.1007/s11248-018-0095-9
- Jouzani, G. S., Valijanian, E., & Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2691–2711. doi: 10.1007/s00253-017-8175-y
- Kachhawa, D. (2017). Microorganisms as a biopesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 468–473.
- Kang, L. (2019). Overview: Biotic signalling for smart pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374, 1–5. doi: 10.1098/rstb.2018.0306

- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525–535. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009
- Kim, Y., Ji, D., Cho, S., & Park, Y. (2005). Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 258–264. doi: 10.1016/j.jip.2005.05.001
- Kupferschmied, P., Pèchy-Tarr, M., Imperiali, N., Maurhofer, M., & Keel, C. (2014). Domain Shuffling in a Sensor Protein Contributed to the Evolution of Insect Pathogenicity in Plant-Beneficial *Pseudomonas protegens*. *PLOS Pathogens*, 10(2), 1–16. doi: 10.1371/journal.ppat.1003964
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009
- Lee, J., Lee, K., & Lee, W. (2017). Microbiota, Gut Physiology, and Insect Immunity. En *Advances in Insect Physiology* (pp. 111–138). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.11.001>
- Mampallil, L. J., Faizal, M. H., & Anith, K. N. (2017). Bacterial bioagents for insect pest management. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(6), 2237–2244.
- Manchikanti, P. (2019). Bioavailability and environmental safety of nanobiopesticides. En *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives* (pp. 207–222). Elsevier. doi: 10.1016/b978-0-12-815829-6.00008-5
- McQuade, R., & Stock, S. P. (2018). Secretion Systems and Secreted Proteins in Gram-Negative Entomopathogenic Bacteria: Their Roles in Insect Virulence and Beyond. *Insects*, 9(68), 1–16. doi: 10.3390/insects9020068
- Medel, V., Molina, B., Seguel, J., Rebolledo, R., & Quiroz, A. (2013). Morfología e histología del sistema digestivo del burrito del frambueso *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera : Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(2), 260–266.
- Mehrotra, S., Kumar, S., Zahid, M., & Garg, M. (2017). Biopesticides. En R. L. Singh (Ed.), *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future* (pp. 274–292). Springer, Lucknow. doi: 10.1007/978-981-10-1866-4
- Melo, A. L. de A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action , resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2), 1–10. doi: 10.3109/07388551.2014.960793
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Arora, N. K. (2015). Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. En N. Arora (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, India. doi: 10.1007/978-81-322-2068-8
- 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
- Nicholson, G. M. (2007). Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 49, 413–422. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.028
- Osman, G. E. H., Already, R., Assaedi, A. S. ., Organji, S. ., El-ghareeb, D., Abulreesh, H. H., & Althubiani, A. S. (2015). Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis*: a Comprehensive Review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(1), 271–288.

- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6, 3296–3325. doi: 10.3390/toxins6123296
- Park, H., Federici, B., & Sakano, Y. (2006). Inclusion Proteins from other Insecticidal Bacteria. En J. M. Shively (Ed.), *Inclusions in Prokaryotes. Microbiology Monographs* (pp. 321–330). Springer, Heidelberg. doi: 10.1007/7171
- Perez, A., & Landeros, C. (2009). Agricultura y deterioro ambiental. *Elementos*, 73, 19–25.
- Pinheiro, V. B., & Ellar, D. J. (2007). Expression and insecticidal activity of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Photobacterium luminescens* toxin complex proteins. *Cellular Microbiology*, 9(10), 2372–2380. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00966.x
- Portela-Dusán, D. D., Chaparro-Giraldo, A., & López-Pazos, S. A. (2007). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA*, 11(20), 87–96. doi: 10.1002/9780470173381
- Potter, A., Jardine, A., & Neville, P. J. (2016). A Survey of Knowledge, Attitudes, and Practices in Relation to Mosquitoes and Mosquito-Borne Disease in Western Australia. *Frontiers in Public Health*, 4(32), 1–13. doi: 10.3389/fpubh.2016.00032
- Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 287–293. doi: 10.1007/s00253-012-3969-4
- Rao, M. R., Singh, M. P., & Day, R. (2000). Insect pest problems in tropical agroforestry systems: Contributory factors and strategies for management. *Agroforestry Systems*, 50, 243–277. doi: 10.1023/A:1006421701772
- Rosas-García, N. M. (2008). Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 49–63.
- Ruiu, L. (2015). Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. *Insects*, 6, 352–367. doi: 10.3390/insects6020352
- Sanchis, V. (2011). From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31, 217–231. doi: 10.1051/agro/2010027
- Sansinenea, E. (2012). Discovery and description of *Bacillus thuringiensis*. En E. Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (pp. 1–392). Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-007-3021-2
- Sansinenea, E. (2019). *Bacillus* spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria. In H. Singh, C. Keswani, M. Reddy, E. Sansinenea, & C. García-Estrada (Eds.), *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms* (pp. 225–237). Springer, Singapur.
- Sarwar, M. (2015a). Biopesticides: An effective and environmental friendly insect-pests inhibitor line of action. *International Journal of Engineering and Advanced Research Technology*, 1(2), 10–15.
- Sarwar, M. (2015b). Insect borne diseases transmitted by some important vectors of class insecta hurting public health. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1(3), 311–317.
- Sarwar, M. (2015c). The Killer Chemicals as Controller of Agriculture Insect Pests: The Conventional Insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(3), 141–147.

- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40, 124–140. doi: 00.09.52.12.C
- Senthil-Nathan, S. (2015). A Review of Biopesticides and their Mode of Action Against Insect Pests. En P. Thangavel & G. Sridevi (Eds.), *Environmental Sustainability* (pp. 49–63). Springer, India. doi: 10.1007/978-81-322-2056-5
- Shaw, W. R., Attardo, G. M., Aksoy, S., & Catteruccia, F. (2015). A comparative analysis of reproductive biology of insect vectors of human disease. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 142–148. doi: 10.1016/j.cois.2015.05.001
- Shawer, R., Donati, I., Cellini, A., Spinelli, F., & Mori, N. (2018). Insecticidal Activity of *Photorhabdus luminescens* against *Drosophila suzukii*. *Insects*, 9(148), 1–14. doi: 10.3390/insects9040148
- Shea, K., Possingham, H. P., Murdoch, W. W., & Roush, R. (2002). Active Adaptive Management in Insect Pest and Weed Control: Intervention With a Plan for Learning. *Ecological Applications*, 12(3), 927–936.
- Sheets, J., & Aktories, K. (2016). Insecticidal Toxin Complexes from *Photorhabdus luminescens*. En R. French-Constant (Ed.), *The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Freiburg. doi: 10.1007/82\_2016\_55
- Sindhu, S. S., Sehrawat, A., Sharma, R., & Khandelwal, A. (2017). Biological Control of Insect Pests in Sustainable Agriculture. En T. Adhya, B. Mishra, K. Annapurna, D. Verma, & U. Kumar (Eds.), *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. Microorganisms for Sustainability* (pp. 189–218). Springer, Singapur.
- Soberón, M., & Bravo, A. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En F. Rebolledo & A. López (Eds.), *Una ventana al quehacer científico* (pp. 303–314). UNAM, Méjico.
- Soberón, M., López-díaz, J. A., & Bravo, A. (2013). Peptides Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41, 87–93. doi: 10.1016/j.peptides.2012.05.023
- Sousa, J. B., Ramos-Jesus, J., Fonseca, R. A. S., Delerue-Matos, C., Barroso, M. F., & Santos, Jr., J. R. (2018). Biosensors as Advanced Device for the Transgenic Plants and Food and Detection. En A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds.), *Genetically Engineered Foods* (pp. 221–245). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-811519-0/00009-1
- Vallet-Gely, I., Lemaitre, B., & Bocard, F. (2008). Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 302–313. doi: 10.1038/nrmicro1870
- Whalon, M. E., & Wingerd, B. A. (2003). *Bt*: Mode of Action and Use. *Archives of Insects Biochemistry and Physiology*, 54, 200–211. doi: 10.1002/arch.10117
- Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. In *Toxins* (Vol. 6). doi: 10.3390/toxins6092732