

CAPITULO 8

BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS

Sauka, D. y Benintende, G.

INTRODUCCIÓN

De los cinco grupos más importantes de microorganismos entomopatógenos que presentan potencial como agentes de control biológico (virus, bacterias, hongos, nematodos y microsporidios), las bacterias son de las más estudiadas y utilizadas a nivel mundial. Entre ellas, las especies que tienen mayor potencial para ser empleadas en el Control Microbiano de insectos plagas son las de bacilos formadores de esporas: *Bacillus* spp. y géneros relacionados.

Los primeros trabajos sobre el manejo de insectos plaga mediante la utilización de bacterias se remontan a 1914. Aparentemente los ensayos no fueron consistentes y el interés en estos entomopatógenos resurge cuando White y Dutky en 1940, demostraron exitosamente el control del escarabajo japonés *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) mediante la aplicación de esporas de *Paenibacillus popilliae* (antes *Bacillus popilliae*). Sin duda alguna, ello estimuló a otros investigadores a que publiquen numerosos trabajos sobre la efectividad de diferentes bacterias patógenas de diversos insectos.

Hacia la misma época, otra bacteria llamada *Bacillus thuringiensis*, comenzó a ser objeto de numerosos estudios, convirtiéndose varios años más tarde en el insecticida microbiano más comercializado en el mundo. Se ha estimado que casi el 90 % de los bioinsecticidas bacterianos actualmente disponibles en el mercado mundial está constituido por más de 200 productos comerciales sobre la base de esta bacteria entomopatógena (Damalas y Koutroubas, 2018). Este entomopatógeno posee todas las características requeridas para ser utilizado como insecticida biológico. El espectro de hospedantes está limitado a especies de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera, así como a algunas pocas especies de nematodos y ácaros. Los parasitoides o predadores no son afectados por la acción patogénica de esta bacteria. Tampoco se han detectado efectos tóxicos en vertebrados, siendo

segura su manipulación y utilización aun hasta la fecha de cosecha, lo cual los hace especialmente apropiados para el tratamiento de frutales y hortalizas. Por último, su producción en gran escala no presenta mayores inconvenientes, siendo multiplicadas a nivel industrial por cultivo sumergido en fermentadores.

BIODIVERSIDAD

La mayor relevancia a nivel mundial como agentes de biocontrol de insectos plaga la tienen las especies *B. thuringiensis* y *Lysinibacillus sphaericus* (antes *Bacillus sphaericus*), siendo la primera de relevancia en el sector hortícola. Ambos bacilos entomopatógenos son productores de toxinas y enzimas; habitantes naturales en diferentes fuentes acuíferas y suelos donde son muy persistentes y desde donde pueden ser aislados sin dificultad.

Lysinibacillus sphaericus abarca cepas que presentan actividad insecticida altamente específica, restringida a larvas de mosquitos especialmente de los géneros *Culex* (vector de encefalitis y filariasis), *Anopheles* (vector de filariasis, dengue y fiebre hemorrágica) y en menor grado a especies de *Aedes* (vector del dengue y fiebre chikunguña).

Bacillus thuringiensis, o popularmente conocida como “Bt”, abarca numerosas cepas con diferentes especies hospedantes. Un gran número de cepas presentan cristales bipiramidales y cúbicos, las cuales son tóxicas para la mayoría de las especies de lepidópteros, o cristales cuadrados aplanados, las cuales son tóxicas principalmente para crisomélidos y curculiónidos. Asimismo, hay cepas de *B. thuringiensis* con cristales ovoides que resultan tóxicas para mosquitos y jejenes. En menor medida, se han descrito cepas con cristales en forma de barra y bipiramidal delgado que resultan tóxicos para nematodos.

Taxonómicamente la especie *B. thuringiensis* se ubica dentro del género *Bacillus*, formando parte del grupo *Bacillus cereus*, que incluye seis especies aprobadas (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis*) y dos especies propuestas (*B. cytotoxicus* y *B. gaemokensis*). Se encuentra estrechamente relacionado a *B. anthracis* y *B. cereus*, de los que no logra distinguirse completamente debido a que no existen suficientes diferencias en sus características morfológicas y bioquímicas, por lo que la designación de *B. thuringiensis* como especie ha estado sometida a

discusión. A pesar de esto, el *Bergey's Manual of Systematics of Archae and Bacteria* reconoce la individualidad de estas especies, basándose principalmente para la de *B. thuringiensis*, en dos características diferenciales: la presencia de la inclusión o cristal parasporal, y que con frecuencia estos pueden ser tóxicos para insectos y otros invertebrados.

Bacillus thuringiensis se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H, técnica que es discutida por varias razones, principalmente por la existencia de aislamientos no flagelados y fundamentalmente por la imposibilidad de distinguir, en ciertos casos, cepas con distintos espectros de actividad usando esta metodología. A pesar de las limitaciones de esta técnica, han adquirido fundamental relevancia algunos serovares que abarcan cepas reconocidas por su alta toxicidad para insectos. Un ejemplo de ello lo constituye la cepa HD-1 perteneciente al serovar *kurstaki*, cepa utilizada mundialmente desde 1970 como ingrediente activo de bioinsecticidas para el manejo de larvas de lepidópteros (Sauka y Benintende, 2008).

Una inmensa diversidad de aislamientos y cepas productoras de cientos de combinaciones de proteínas Cry y de otras también específicas para insectos plagas, se constituyen entonces, como las mejores opciones para el desarrollo de bioinsecticidas efectivos y muy específicos.

En el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CNIA, INTA se conformó y se mantiene un importante número de cepas exóticas provenientes de varias colecciones internacionales; así como la más importante colección de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* provenientes de muestras ambientales de diferentes sistemas agroecológicos de nuestro país.

Uno de dichos aislamientos, identificado como *B. thuringiensis* INTA 7-3 y obtenido de una muestra de suelo con cultivo de cebada de la provincia de Buenos Aires, presenta un cristal bipiramidal grande y uno cuadrado aplanado más pequeño correspondientes a proteínas Cry1 y Cry2, respectivamente. El perfil proteico de los cristales muestra dos bandas principales de 130 y 65 kDa. Los mismos disuelven, por la acción de álcali y tripsina, para formar un fragmento resistente de unos 65 kDa. La caracterización de los genes codificantes de proteínas Cry1 presentes mediante la amplificación de secuencias nucleotídicas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reveló genes de tipo *cry1*. El fragmento amplificado fue secuenciado y comparado con secuencias de genes

cry1Ac, estableciéndose identidades de hasta un 91 %. Toxicológicamente el aislado presentó gran actividad lepidopterida, habiendo sido activo en larvas neonatas de *Manduca sexta* (Linnaeus), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Rachiplusia nu* (Guenée), *Cydia pomonella* (Linnaeus), *Tuta absoluta* (Meyrick) y *Epinotia aporema* (Walsingham). En ensayos de laboratorio utilizando larvas de la polilla del tomate *T. absoluta*, provocó niveles de toxicidad significativamente superiores a los índices causados por la cepa más difundida entre los bioinsecticidas comerciales (HD-1) (Polack y Benintende, 2002). Por otro lado, otras cepas de esta misma colección, generaron mortalidades de hasta el 30 % cuando se evaluaron sobre larvas de segundo estadio de un coleóptero de relevancia en horticultura como es la “vaquita de los melones” [(*Epilachna paenulata* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae)] (Sauka *et al.*, 2010).

Además del IMYZA, varias otras instituciones sudamericanas de investigación han realizado estudios sobre la biodiversidad de *B. thuringiensis* con el objeto de controlar plagas en horticultura. Distintos laboratorios de Brasil y Colombia han caracterizado y seleccionado con éxito, cepas nativas que controlan larvas de *Tuta absoluta* en tomate (García, 1992; Marques y Alves, 1996) y *Plutella xylostella* en distintas crucíferas (Ruiz, 1998; Silva *et al.*, 2015).

MECANISMO DE ACCIÓN

Las bacterias entomopatógenas tienen en común que la mayoría de ellas producen la mortalidad de los insectos por un mecanismo de acción general que incluye la ingestión de alimento contaminado. Sin embargo, unas pocas especies se comportan como patógenos oportunistas accediendo al cuerpo del insecto a través de lesiones mecánicas o causadas por otros controladores biológicos (parasitoides y predadores u otros entomopatógenos, como los hongos).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry, constituyentes principales de los cristales de *B. thuringiensis*, se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas (Sauka y Benintende, 2008). Dichos cristales son ingeridos y posteriormente solubilizados en el intestino medio del insecto liberando las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño *per se*, sino que deberán ser procesadas por enzimas proteasas del intestino para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva.

Bajo su forma monomérica, las toxinas se unen a dos receptores (fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa N (APN)) mediante una interacción de baja afinidad (Pardo-López *et al.*, 2013). Estos receptores son proteínas muy abundantes en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio (Upadhyay y Singh, 2011). La unión a ALP y APN permite la concentración de una gran cantidad de toxinas en dicha zona, para unirse posterior y fuertemente a otro receptor (proteínas similares a caderina (CAD)) (Pardo-López *et al.*, 2013). Luego, se induce un cambio conformacional en la proteína Cry monomérica que favorece una escisión en un extremo específico de la toxina por una proteasa de membrana. Este clivaje facilita la formación de una estructura oligomérica pre-poro, en la que varias moléculas de la proteína Cry interactúan para su formación (Pardo-López *et al.*, 2013). Esta estructura se une a una molécula de APN y ALP, a través de una interacción de alta afinidad, que la transportaría hacia zonas específicas de la membrana donde se inserta formando un poro, provocando desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Figura 1). De esta forma, el tejido intestinal es dañado severamente, impidiendo la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva, lo que lleva a la muerte del insecto. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele.

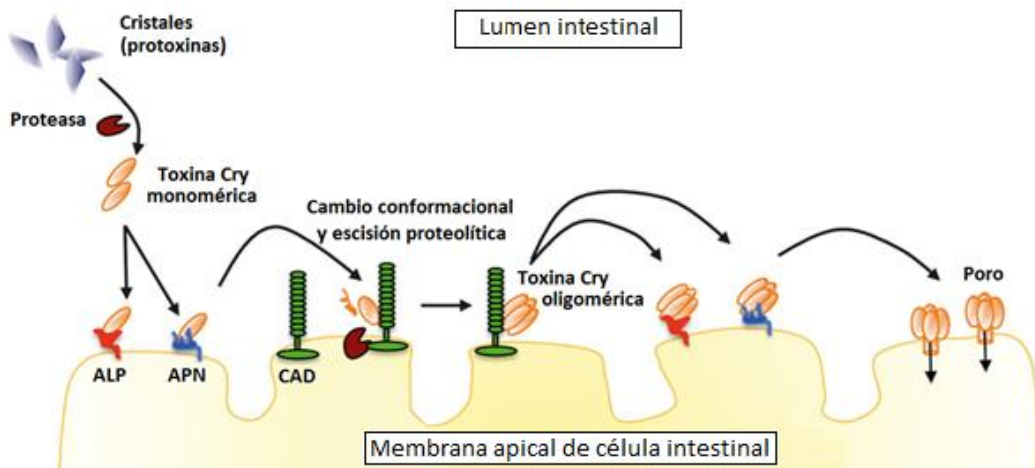


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry en lepidópteros. Adaptado de Pardo-López *et al.* (2013).

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE BIOINSECTICIDAS BACTERIANOS

Las etapas básicas de la investigación y desarrollo de los bioinsecticidas sobre la base de bacterias, como la de otros bioinsumos de origen microbiano, se esquematiza en la Figura 2.

La I+D de bioinsecticidas bacterianos se inicia con el interés de controlar determinadas plagas. Entre las primeras etapas, la prospección, caracterización y selección de cepas con actividad insecticida diferencial frente a plagas de interés resulta de fundamental importancia pues al ser más específicas, permitirán reducir las dosis de uso, incrementando la eficacia de los bioinsecticidas.

Estas etapas suelen en general ser más simples que etapas posteriores que involucran la producción masiva y la formulación. Dada su ubicuidad, nuevos aislamientos de *B. thuringiensis* son fácilmente obtenidos de una variedad de muestras ambientales. Su caracterización fenotípica y genotípica se basa en una serie de estudios morfológicos, bioquímicos, genéticos y toxicológicos. Los ensayos de toxicidad, comúnmente bioensayos de virulencia, pondrán de manifiesto las bondades del nuevo candidato para controlar más eficazmente alguna plaga de interés.

Considerando que los requisitos nutricionales de diferentes cepas y sero-variedades de *B. thuringiensis* suelen variar sustancialmente, los estudios prosiguen a nivel de laboratorio, mediante la selección de la adecuada combinación de componentes del medio de cultivo que permita maximizar la producción de lo que será el ingrediente activo del bioinsecticida.

En una escala experimental o piloto, se ajustan y seleccionan las condiciones óptimas del proceso fermentativo (pH, temperatura, requerimientos de oxígeno, porcentaje de inóculo, recuperación y disposición del ingrediente activo), acompañando todo el proceso mediante ensayos biológicos para determinar la actividad insecticida de los productos obtenidos (caldos, biomasas).

Resultan limitantes del desarrollo y empleo de estos bioinsumos, los problemas relacionados a la estabilidad de la actividad tóxica durante el almacenamiento, así como la adecuada residualidad en condiciones de campo. De allí que la etapa de formulación, que es un requisito obligatorio en la producción de todo plaguicida biológico, sea el enlace entre el proceso de fermentación, la aplicación y determinante en gran parte del costo, de la vida media, de la facilidad de

dispersión y de la eficacia del producto. La formulación se realiza de acuerdo a su presentación comercial (polvo humectable, suspensión, gránulos, etc.) mediante la adecuada combinación de ingredientes activos e inertes.

Estos formulados normalmente permiten el uso del equipo convencional de pulverizaciones para su aplicación.



Figura 2. Etapas en la I+D de bioinsumos de origen microbiano.

A pesar del éxito demostrado por los bioinsecticidas *Bt*, ellos representan aún, una fracción muy pequeña en el mercado global de insecticidas. La principal causa radica, fundamentalmente, en el alto costo de los productos, mayoritariamente producidos en países desarrollados. La producción local o regional de bioinsecticidas competitivos, en cuanto a eficacia y calidad con los productos disponibles en el mercado internacional, podría impactar fuertemente reduciendo sus costos generando, además, un importante desarrollo de las industrias locales de la fermentación y un mejor aprovechamiento de algunos de los productos o subproductos de la agroindustria regional que pudieran utilizarse como insumos primarios.

Un número elevado de formulaciones sobre la base de *B. thuringiensis* se encuentran registradas en todo el mundo.

En nuestro país, desde la década del '80 se han efectuado estudios sobre producción de esta clase de bioinsecticidas empleando distintas cepas de *B. thuringiensis*, focalizándose en el diseño y formulación de medios de cultivo y

optimización de procesos fermentativos. Algunas empresas privadas locales registraron productos de origen nacional destinados al control de orugas defoliadoras y también de larvas de mosquitos, los que se suman a productos de importación. Con la ya mencionada cepa nativa de *B. thuringiensis* INTA 7-3 se preparó un bioinsecticida formulado como polvo humectable y cuya potencia fue de 26.000 U.I./mg. Dicha formulación fue evaluada en condiciones de invernáculos de producción en la EEA San Pedro, donde se condujo un ensayo para evaluar el efecto de diversos insecticidas sobre el nivel de daño provocado por la polilla del tomate en hojas y frutos (Polack y Benintende, 2002). El producto INTA 7-3 fue evaluado en una única dosis de 310 g/hl. Como referencia se utilizaron formulados comerciales, Dipel® de 17.600 U.I./mg, a base de la cepa HD-1, en dos dosis 450 y 640 cc/hl. El comportamiento del bioinsecticida INTA 7-3, determinado como protección de daño en hojas y frutos, fue equivalente al del producto comercial Dipel® que había sido aplicado en una dosis 40 % mayor. Estos resultados confirmaron los obtenidos en ensayos de laboratorio: la mayor eficacia de la cepa INTA 7-3 para el control de la polilla del tomate.

Como ya se mencionó, la utilización de bioinsecticidas a base de cepas específicas, sean estas silvestres, transconjugantes o recombinantes, permite claramente aumentar la eficiencia de *B. thuringiensis* como controlador; incrementando los niveles de toxicidad con el consecuente aumento de la potencia y la reducción de los costos de producción.

Además, de la eficacia de los productos *Bt* para el control de *T. absoluta*, una enorme ventaja adicional es la completa inocuidad de la bacteria sobre la supervivencia y acción de los enemigos naturales de la plaga (Riquelme *et al.*, 2006). Esto posibilita la utilización complementaria de estrategias de control sin riesgo agroecotoxicológico, en programas de Manejo Integrado de Plagas.

No debe perderse de vista la potencialidad de *B. thuringiensis* para el biocontrol de numerosas especies de plagas artrópodas en cultivos hortícolas sobre las cuales aún no ha sido evaluado, considerando como se mencionó, la enorme variedad de aislamientos y cepas de la bacteria que portan muy diversas combinaciones de proteínas insecticidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Damalas, C. & Koutroubas, S. (2018). Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture*, 8(1), 13-18.
- Garcia, F. (1992). Manejo integrado de plagas em cultivos del Valle del Cauca. *ICA informa*, 26, 11-12.
- Marques, I. & Alves, S. (1996). Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berl. var. *kurstaki* sobre *Scrobipalpus loides absoluta* Meyer. (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 25(1), 39-45.
- Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3-22.
- Polack, L. & Benintende, G. (2002). Bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* como alternativa para el control de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick). Presentación oral. XXV Congreso Argentino de Horticultura y I Encuentro Virtual de las Ciencias Hortícolas. 25/11 al 06/12/2002. Encuentro Virtual, Argentina.
- Riquelme Virgala, M., Botto, E. & Lafalce, C. (2006). Evaluación de algunos insecticidas para el control de la "polilla del tomate", *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) y su efecto residual sobre el parasitoide *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Rev. Soc. Entomol. Arg.*, 65(3-4), 57-65.
- Ruiz, R. (1998). El control biológico de insectos plagas en hortalizas. (pp. 269-294). En: Barreto Campodónico, U., Hollands, J. & Lizárraga Travagliani, A (Eds.). Nuevos aportes del control biológico en la agricultura sostenible. Bogotá, Colombia: Editora Nacional. 397 p.
- Sauka, D. & Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pest. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124-140.
- Sauka, D., Monella, R. & Benintende, G. (2010). Induced-feeding bioassays for detection of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity against *Epilachna paenulata* (Coleoptera). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(4), 430-432.
- Silva, M., Siqueira, H., Silva, L., Marques, E. & Barros, R. (2015). Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* active against diamondback moth and fall armyworm. *Neotropical Entomology*, 44(4), 392-401.
- Upadhyay, S. & Singh, P. (2011). Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnology Letters*, 33(10), 2027-2036.