

BIOINSECTICIDAS

DEL PLATO DE PETRI **AL CAMPO**

Caracterización microscópica y molecular de tres aislamientos colombianos de *Bacillus thuringiensis* Berliner

Nicolás Ancines R.¹ y Mauricio Pulido J.²

1. Estudiante 11° grado, Gimnasio Campestre. 2. Director Centro de Estudios en Biología Molecular, Gimnasio Campestre.

Correspondencia para el autor: centrobiomol@campestre.edu.co

Recibido: 1 de marzo de 2017

Aprobado: 22 de abril de 2017

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) se ha convertido en objeto de estudio de numerosas investigaciones dada su capacidad para producir proteínas cristalinas que actúan como insecticidas naturales, hecho que ha brindado una alternativa de naturaleza biotecnológica al control de plagas y el manejo de cultivos de interés agrícola. En este trabajo se presenta la caracterización microscópica y molecular de tres aislamientos colombianos de Bt. Los tres aislamientos estudiados producen esporas y cristales proteicos; de ellos, el que mostró la mayor producción de los mismos fue el aislamiento denominado Bt 3, mientras que el de más baja producción fue Bt1. Empleando temperaturas de 52°C y 58°C y concentraciones finales de MgCl₂ de 2 mM y 1,5 mM, se amplificaron por PCR fragmentos correspondientes a las regiones conservadas de los genes de la familia *cry1* y *cry1A* en los tres aislamientos estudiados.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), genes *cry*, proteínas Cry.

SUMMARY

Bacillus thuringiensis (Bt) has become the subject of numerous research studies due to its ability to produce crystal proteins that act as natural insecticides, a fact that has provided a biotechnological alternative for pest control and agricultural value crop care. In this paper, a microscopic and molecular characterization of three colombian isolates of *Bacillus thuringiensis* is performed. The three studied isolates produced both insecticidal crystals and spores, being Bt3 isolate the one that produced greater amount of crystals and Bt1 isolate the one that less produces. Using temperatures of 52°C and 58°C and final concentrations of 2 mM and 1,5 mM of MgCl₂, fragments corresponding to variant regions of *cry1* and *cry1A* family genes were PCR amplified in the three studied isolates.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Polymerase Chain Reaction (PCR), *cry* genes, Cry proteins.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, quimiorganótrofa y que tiene la capacidad de fermentar azúcares como maltosa, ribosa, trehalosa, fructosa y glucosa (Sauka y Benintende, 2008). De otro lado, se le considera ubicua, puesto que ha sido encontrada en ambientes tan diversos como suelos, rizósfera, filoplano e insectos (Travers *et al.*, 1987; Cinar *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2010). Uno de los rasgos característicos de esta especie es la capacidad de producir cristales proteicos durante la fase de esporulación de su ciclo de crecimiento. Estos cristales presentan actividad insecticida contra especies plaga pertenecientes a los órdenes Lepidóptera, Coleóptera y Díptera (Van Frankenhuisen, 2009; Salvatore *et al.*, 2014). Estas proteínas, comúnmente llamadas σ -endotoxinas, han sido asignadas a dos grandes grupos conocidos como familia Cry (del inglés Crystal) y familia Cyt (del inglés Cytolytic). Hasta el momento se han descrito más de un centenar de proteínas Cry diferentes, las cuales constituyen la base de los insecticidas biológicos más comercializados a nivel mundial (Sauka y Benintende, 2008). La esporulación, fase durante la cual ocurre la producción del cristal paraesporal, es un mecanismo de respuesta defensiva del organismo ante condiciones de vida desfavorables, cuya finalidad es la formación de la spora (Bulla *et al.*, 1980). Generalmente este proceso se inicia ante la deficiencia de nutrientes en el medio, tiene una duración que oscila entre 6-8 horas e implica una serie de cambios morfológicos y fisiológicos significativos para la bacteria. Tales cambios terminan en la formación de dos estructuras bien definidas: la spora y el esporangio (que encierra la spora). Para el final del proceso de maduración, el cristal alcanza su tamaño máximo y la etapa final permite la liberación

de la spora junto con el cristal, debido a la lisis del esporangio (Sauka y Benintende, 2008). Desde el punto de vista morfológico los cristales pueden ser clasificados en bipiramidales, cúbicos y esféricos, entre otros.

Tal como se mencionó anteriormente, las σ -endotoxinas están formadas por uno o más cuerpos cristalinos denominadas Cry y Cyt. Los genes que controlan la producción de las proteínas cristalinas del tipo Cry se encuentran contenidos en plásmidos, porción de material genético bacteriano que se replica y se transcribe de forma autónoma. Debido a su independencia frente al ADN central de la bacteria, los plásmidos permiten una amplia variedad de combinaciones que dan lugar a una gran diversidad de cepas diferentes (Salvatore *et al.*, 2014). Existen alrededor de 72 tipos de proteínas Cry, cada uno de ellos está constituido a su vez por varios subtipos. El grupo más diversos es el de las proteínas Cry1, formado por 256 subtipos definidos; el grupo Cry2 tiene 72 subtipos, mientras que los grupos Cry7 y Cry8 cuentan con 31 y 49 subtipos respectivamente (García, 2014). El rango de acción de las toxinas Cry depende del tipo y el subtipo al que pertenezcan. Por ejemplo, las proteínas que hacen parte de los tipos Cry1, Cry2 y Cry9 son particularmente lesivas para los lepidópteros, las de los tipos Cry3, Cry7 y Cry8 afectan a los coleópteros y aquellas pertenecientes a los tipos Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17 y Cry19 son específicas para dípteros (Bravo *et al.*, 1998). Los síntomas que las larvas de insectos susceptibles muestran a partir del momento en que ingieren los cristales y esporas de Bt son el cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Soberón y Bravo, 2014; Whalon & Wingerd, 2003).

El uso de insecticidas (muchos de ellos categorizados como ligera o moderadamente

tóxicos) en las actividades de producción agrícola representa un riesgo no sólo en términos de salud pública sino también de impacto ambiental. En esta última década la intoxicación y muerte por envenenamiento en zonas rurales del país, principalmente en la población infantil y de trabajadores que han tenido contacto directo con las fumigaciones de cultivos, se ha vuelto constante. El uso prolongado de este tipo de productos incide directamente en el daño a aguas subterráneas, flora y entomofauna, hecho que reduce de forma sustancial la biodiversidad de las zonas afectadas (Benítez, 2012). El uso de pesticidas, además de contribuir a la rápida destrucción de diversos tipos de hábitats, amenaza a especies en peligro de extinción, y con el tiempo y con un uso descuidado, puede provocar la aparición de resistencia a los pesticidas en las plagas, lo que conllevaría al uso de nuevos pesticidas que continuarían degradando el ambiente. Por otro lado, la aplicación prolongada y con frecuencia desmedida de insumos químicos en cultivos alimenticios ha conducido a la aparición de serios problemas de salud entre los consumidores. Frente a esta problemática, los gobiernos han establecido leyes y reglamentaciones de uso moderado de estos productos, sin embargo el problema está lejos de ser solucionado del todo (Benítez, 2012).

Dadas las circunstancias anteriormente descritas, surge la necesidad de buscar métodos alternos de control de plagas que no tengan repercusiones en el ambiente ni en la salud humana. La solución podría encontrarse en la exploración de la diversidad de microorganismos en los suelos colombianos. Debido a que está localizada en el trópico, Colombia es un país con una amplia biodiversidad. Esta diversidad se evidencia también en términos de poblaciones de microorganismos (Rangel, 2010). Resulta de capital importancia para

los sectores agrícola y pecuario la exploración de esta diversidad microbiológica en los suelos colombianos. Si se logra identificar la presencia de genes que codifiquen proteínas cristalinas insecticidas en aislamientos colombianos de Bt, es posible abrir la puerta a futuras investigaciones orientadas a determinar el alcance de la aplicación de este nuevo método alternativo. El propósito de esta investigación es determinar la presencia de genes *cry1* y *cry1A* en tres aislamientos colombianos de Bt.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de Bt: Los aislamientos de Bt analizados en la investigación fueron amablemente cedidos por el cepario del departamento de biología de la Universidad Pedagógica Nacional. Para efectos del estudio, los aislamientos recibidos del cepario fueron denominados Bt1, Bt2 y Bt3. Como control positivo se utilizó *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Dipel).

Cultivo de los aislamientos de Bt: Los aislamientos de Bt fueron cultivados en medio Luria Bertani líquido durante 18-24 horas a temperatura constante de 28.5°C.

Caracterización microscópica de los aislamientos: Colonias de cada aislamiento fueron sometidas a la tinción verde de malaquita-safranina (coloración de Shaeffer-Fulton) y posteriormente observadas en un microscopio Olympus CX21 (1000X).

Extracción y purificación de plásmidos de Bt: La extracción del DNA plasmídico se realizó utilizando el protocolo descrito por He y colaboradores (1990).

Caracterización genética de aislamientos de Bt: La caracterización genética de los aislamientos de Bt se realizó mediante PCR.

Para determinar la presencia de genes de la familia *cry 1* se utilizaron los iniciadores Cry1-F (5' GTA GAA GAG GAA GTC TAT CCA A 3') y Cry1-R (5' TAT CGG TTT CTG GGA AGT A 3') (Cerón *et al.*, 1996). La presencia de genes de la subfamilia *cry 1A* se verificó mediante el uso de los iniciadores Cry1A-F (5' CCG GTG CTG GAT TTG TGT TA 3') y Cry1A-R (5' AAT CCC GTA TTG TAC CAG CG 3') (Carozzi *et al.*, 1991). Para el caso de los iniciadores Cry1-F y Cry1-R se evaluaron temperaturas de anillaje entre 47°C y 54°C y concentraciones de MgCl₂ entre 1 mM y 3 mM final. Para el caso de los iniciadores Cry1A-F y Cry1A-R se evaluaron temperaturas de anillaje entre 55°C y 60°C y concentraciones de MgCl₂ entre 1 mM y 3 mM. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (90 V, 40 min). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización microscópica de los aislamientos de Bt

Tal como se señala en la literatura, la presencia de esporas y la producción de cristales son rasgos característicos de Bt (Sauka y Benintende, 2008). La tinción verde de malaquita-safranina reveló que los tres aislamientos estudiados (Bt1, Bt2 y Bt3) producen esporas y cristales. El aislamiento que mostró la mayor producción de cristales fue Bt3, seguido por Bt2 y Bt1. En las figuras 1a y 1b se observan las tinciones correspondientes al aislamiento Bt3 y al control positivo (Dipel).

Extracción y aislamiento de plásmidos de Bt

El protocolo reportado por He y colaboradores (1990) ha sido ampliamente utilizado en virtud de la cantidad y calidad de los plásmidos que permite obtener. Sin embargo, la cantidad de plásmido extraída del aisla-

miento Bt3 fue sustancialmente más baja que las cantidades obtenidas a partir de los otros dos aislamientos (figura 2).

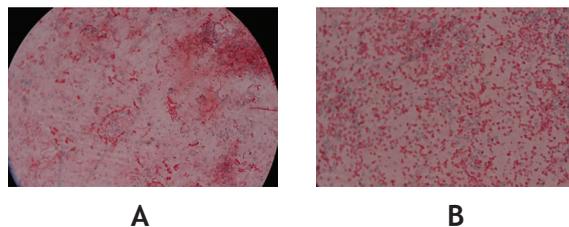


Figura 1. Colonias de *Bacillus thuringiensis* teñidas con verde de malaquita-safranina. Se observan esporas (puntos verdes), bacilos (bastones rojos) y cristales (puntos rojos pequeños e intensos). **A:** aislamiento Bt3; **B:** control positivo (Dipel).

Esta diferencia se puede explicar en función de las variaciones en el crecimiento de los cultivos bacterianos. Al final del período de incubación, el cultivo correspondiente al aislamiento Bt3 presentó una densidad óptica considerablemente menor a la que mostraron los otros. Tomando en consideración que las condiciones de mantenimiento y cultivo empleadas para los aislamientos estudiados fueron las mismas, es probable que la viabilidad de las células pertenecientes a Bt3 resultara afectada durante la conservación previa a la realización de este estudio (Fernández-Larrea, 2002).

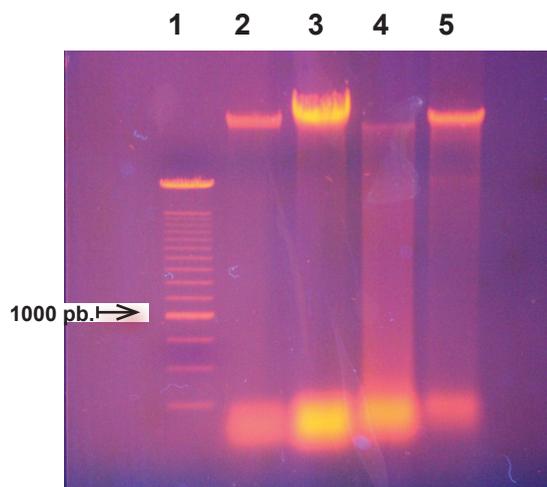


Figura 2. Plásmidos extraídos mediante el método de He (1990) a partir de los aislamientos estudiados. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: aislamiento Bt1; carril 3: aislamiento Bt2; carril 4: aislamiento Bt3; carril 5: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (control positivo).

Amplificación de genes *cry 1* y *cry 1A* en los aislamientos colombianos de *Bt*

El ADN plasmídico de los aislamientos colombianos de *Bt* se sometió a PCR con el fin de determinar la presencia de genes de la familia *cry1* y de la subfamilia *cry1A* mediante la amplificación de fragmentos correspondientes a regiones conservadas de los mismos. Para tal fin se evaluaron diferentes condiciones de reacción y programas de amplificación. Las condiciones que reportaron los mejores resultados para la identificación de los genes *cry1* se presentan en las tablas 1 y 2. Las mejores condiciones para la identificación de los genes *cry1A* se presentan en las tablas 3 y 4.

Para el caso de la identificación de los genes *cry1*, la evaluación inicial se hizo empleando una temperatura de anillaje de 52 °C y una concentración final de cloruro de magnesio

(MgCl₂) de 1,5 mM. La mejor amplificación se logró empleando una concentración final de MgCl₂ de 2 mM. En cuanto a la amplificación de los genes de la subfamilia *cry1A*, se hizo una evaluación inicial con temperatura de anillaje de 58 °C y concentración final de 2 mM de MgCl₂. Sin embargo, utilizando una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM se logró un incremento considerable en la cantidad de producto amplificado.

Las condiciones empleadas para la identificación de las regiones conservadas de los genes de la familia *cry1* y de la subfamilia *cry1A* permitieron amplificar dos fragmentos únicos en los tres aislamientos estudiados: el primero de ellos de aproximadamente 270 pares de bases (figura 3) y el segundo de alrededor de 500 pares de bases (figura 4). La intensidad de las bandas observadas tras el análisis de electroforesis es un claro reflejo de la cantidad de producto que se logró

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol/reacción
Agua	-	-	10.56 µl
PCR Buffer	5X	1X	5.0 µl
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	2.0 µl
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 µl
Cry1-F	10 µM	0.25 µM	0.62 µl
Cry1-R	10 µM	0.25 µM	0.62 µl
Taq Pol.	5 u/ µl	1 unid/reac.	0.2 µl

Tabla 1. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR de regiones conservadas en los genes pertenecientes a la familia *cry1*.

Etapa	Temperatura / Tiempo	Número de ciclos
Denaturación Inicial	94 °C X 4 min.	1
Amplificación		45
• Denaturación	94 °C X 30 seg.	
• Anillaje	52 °C X 20 seg.	
• Extensión	72 °C X 20 seg.	
Extensión final	72 °C X 5 min.	1

Tabla 2. Programa para la amplificación por PCR de regiones conservadas en los genes pertenecientes a la familia *cry1*.

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol/reacción
Agua	-	-	11.06 μ l
PCR Buffer	5X	1X	5.0 μ l
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 μ l
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 μ l
Cry1A-F	10 μ M	0.25 μ M	0.62 μ l
Cry1A-R	10 μ M	0.25 μ M	0.62 μ l
Taq Pol.	5 u/ μ l	1 unid/reac.	0.2 μ l

Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR de regiones conservadas en los genes pertenecientes a la subfamilia *cry1A*.

Etapa	Temperatura / Tiempo	Número de ciclos
Denaturación Inicial	94 °C X 4 min.	1
Amplificación		45
• Denaturación	94 °C X 30 seg.	
• Anillaje	58 °C X 20 seg.	
• Extensión	72 °C X 20 seg.	
Extensión final	72 °C X 5 min.	1

Tabla 4. Programa para la amplificación por PCR de regiones conservadas en los genes pertenecientes a la subfamilia *cry1A*

generar bajo las condiciones anteriormente referidas. Sin embargo, se observó que las cantidades de los productos de amplificación obtenidas para cada aislamiento variaron entre sí. Tal como se observa en las figuras 3 y 4 los fragmentos de 270 y 500 pares de bases amplificados a partir de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, cepa utilizada como control positivo (carril 2), mostraron la mayor concentración, seguidos por los productos amplificados a partir de los aislamientos Bt2 y Bt3 (carriles 4 y 5 en ambas figuras). Los productos de Bt1 (carril 3 en las dos figuras) fueron los menos concentrados. Esta variación en la cantidad de producto amplificado se debe a que la cantidad de ADN utilizado de cada aislamiento para la reacción de PCR no fue equivalente. De otro lado, es importante resaltar que en Bt los genes de la familia *cry1* son los más abundantes (Cerón *et al.*, 1994); esta investigación demuestra que los aislamientos colombianos estudiados, así como los analizados en otros trabajos, son

portadores de genes pertenecientes a esta familia.

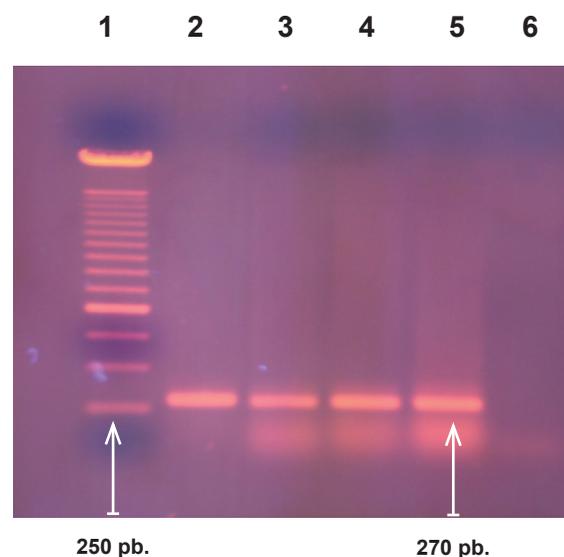


Figura 3. Amplificación del fragmento de 270 pares de bases (aprox.) a partir de la región conservada de los genes *cry1* en los aislamientos colombianos de Bt. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (control positivo); carril 3: aislamiento Bt1; carril 4: aislamiento Bt2; carril 5: aislamiento Bt3; carril 6: blanco.

Mientras que Hernández y colaboradores (1997) establecen las temperaturas de hibridación de los iniciadores para PCR con base en los rangos empleados anteriormente por otros investigadores, en este caso se utilizó una fórmula que permite determinar las temperaturas óptimas con base en factores como la cantidad de nucleótidos del iniciador, su secuencia y la concentración de sodio. La consecuencia del uso de temperaturas óptimas para la amplificación de los fragmentos es la obtención de productos de PCR únicos.

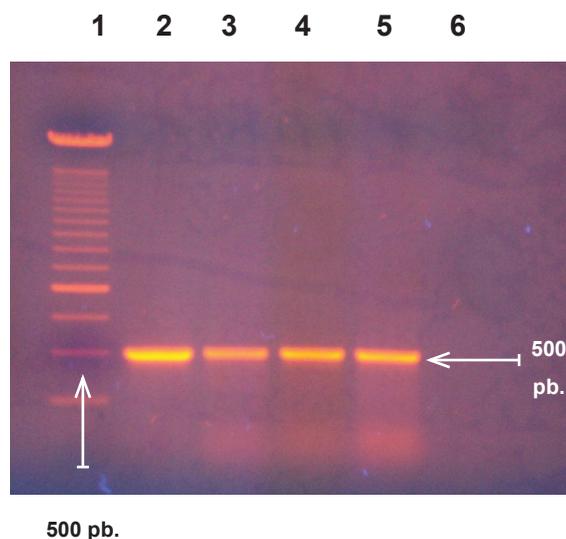


Figura 4. Amplificación del fragmento de 500 pares de bases (aprox.) a partir de la región conservada de los genes *cry1A* en los aislamientos colombianos de Bt. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (control positivo); carril 3: aislamiento Bt1; carril 4: aislamiento Bt2; carril 5: aislamiento Bt3; carril 6: blanco.

CONCLUSIONES

Los estudios de microscopía y análisis genético realizados en este trabajo permitieron identificar los rasgos morfológicos y bioquímicos (reflejados en la producción de proteínas cristalinas y esporas) típicos de *Bacillus thuringiensis*, así como verificar la presencia de genes de la familia *cry1* y la subfamilia *cry1A* en los tres aislamientos colombianos analizados. De acuerdo con Cerón y colaboradores (1994) y otros estudios previos

realizados sobre genes *cry1*, el fragmento amplificado mediante PCR con los iniciadores empleados en este trabajo muestra un tamaño que oscila entre 270-290 pares de bases, mientras que en el caso de los genes *cry1A* el tamaño es cercano a 500 pares de bases. Los resultados de esta investigación coinciden con los reportes anteriormente referidos.

Los genes *cry* son muy numerosos y para facilitar su estudio han sido organizados en familias, algunas de ellas muy poco frecuentes como el caso de *cry5*, *cry12* y *cry21*, entre otras (Schnepf *et al.*, 1998). De manera contrastante, hay algunas familias que están conformadas por una significativa cantidad de genes, como el caso de *cry1* y *cry3*, entre las cuales se encuentran los genes *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry3A*, *cry3B* y *cry3D*, entre otros (Cerón *et al.*, 1994; Cerón *et al.*, 1996). Dada la abundancia de los genes *cry* presentes en esta especie bacteriana y su notable variabilidad genética, resultaría valioso profundizar en la caracterización molecular de los tres aislamientos estudiados en esta investigación con el propósito de aislar y secuenciar las regiones variables e hipervariables y establecer la relación de tal condición respecto del nivel de toxicidad de las proteínas codificadas por dichos genes frente a insectos plaga.

BIBLIOGRAFÍA

- Benítez, R. S. (Ed.) (2012). *Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: un estado del arte*. Recuperado de <http://www.serpajpy.org.py/wp-content/uploads/2014/03/Plaguicidas-y-efectos-sobre-la-salud-humana1.pdf>
- Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., and Quintero, R. (1998). Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (12), 4965-4972.

- Bulla, L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I., and Fitz-James, P.C. (1980). Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 8 (2), 147 - 204.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. and Koziel, M.G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3057-3061.
- Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., and Bravo, A. (1994). PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (1), 353-356.
- Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R., Güereca, L., and Bravo, A. (1995). Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (11), 3826-3831.
- Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A.F., Harsa, S., and Gunes, H. (2008). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. *J. Appl. Microbiol.*, 104 (2), 515-525.
- Fernández-Larrea, O. (2002). Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 64, 110- 115.
- García, A. (Ed.) (2014). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con miras al desarrollo de un bioinsecticida. Recuperado de <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-16913.pdf>
- He, M., Wilde, A., and Kaderbhai, M.A. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 18 (6), 1660.
- Hernández, J., Mariño, L., Orozco, M., y Narváez, J. (1997). Uso de la reacción en cadena de la polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Corpoica*, 2 (1), 1-9.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.*, 18 (5), 189-194.
- Rangel, O. (2010). *Colombia: Diversidad biótica* (1º Ed.) Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Sauka, D.H., y Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol.*, 40 (2), 124-140.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3), 775-806.
- Scioscia, N. (Ed.) (2014). Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con potencial biopesticida. Recuperado de <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-16914.pdf>
- Soberón, M., y Bravo, A. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. López-Munguía, A., *Una ventana al quehacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM*, 25, 303-314.
- Travers, R.S., Martin, P.A., and Reichelderfer, C.F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (6), 1263-1266.
- Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.*, 101(1), 1-16.
- Whalon, M.E. & Wingerd, B.A. (2003). Bt: mode of action and use. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 54 (4), 200 - 211.