

Universidad Pública de Navarra
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Nafarroako Unibertsitate Publikoa
NEKAZARITZAKOINGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa



Susceptibilidad de *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) y *Blaptica dubia* (Blattodea, Blaberidae) a proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Trabajo Final de Máster

Presentado por:

Juan José Galán Rodellar

Dirigido por:

Iñigo Ruiz de Escudero Fuentemilla

MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Pamplona, a febrero de 2021

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Íñigo, primero por su labor como profesor con la que despertó mi interés por esta especialidad y en segundo lugar por su dedicación y paciencia, amabilidad y apoyo en todo momento.

A Primitivo, por permitir mi incorporación en el proyecto y proporcionar los medios para acometerlo.

A Mena, por el privilegio que representa dejar semejante sucesor al mando del laboratorio, así como al resto de compañeros.

A mis amigos de siempre, Chisos, los que nunca fallan, y a las nuevas amistades, que han sido mi otra familia durante los casi seis años que he vivido en Pamplona y de los que guardaré un gran recuerdo.

A Ana, que como hermana mayor me ha entendido como nadie, has sido el mejor ejemplo e inspiración, pero todavía tenemos mayores ambiciones que alcanzar juntos.

A mi padre y a mi madre, me debo a vosotros en cuerpo y alma como vosotros lo habéis hecho antes por mí. Nada me produce mayor satisfacción que dedicarme a aquello que os haga sentir orgullosos de vuestro hijo.

A toda mi familia, a los más cercanos y a los que me faltan, haré honor. Por la vida que me habéis dado, la educación, valores, el cariño y la alegría que sin vosotros no conocería. Por cuidarme en la necesidad y porque seguís guiándome en el camino que me acerca a vosotros.

A todos ellos y otros que me han acompañado hasta donde estoy y que me han permitido cumplir mis metas y trabajar en lo que me gusta, gracias de corazón.

RESUMEN

La cucaracha alemana (*Blattella germanica*) es una especie distribuida por todo el mundo que habita en ambientes urbanos y es portadora de patógenos humanos. Por su gran capacidad para desarrollar resistencias frente a insecticidas químicos, las estrategias de control biológico, como el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, se han convertido en una potencial alternativa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad insecticida de varias proteínas Vip y Cry expresadas por diversos clones de *B. thuringiensis* y *E. coli*, sobre ninfas y adultos de *B. germanica* y *Blaptica dubia* en condiciones de laboratorio. Para ello, se desarrolló en primer lugar la puesta a punto de un método de bioensayo, que finalmente consistió en la individualización del insecto en blísteres y la contaminación superficial de la dieta con la proteína. La observación de cada bioensayo se prolongó durante 30 días, suministrándose la máxima concentración posible de proteína. Ninguna de las 24 proteínas ensayadas resultó efectiva contra ninguna de las especies de cucarachas. La actividad de las proteínas se había comprobado previamente sobre *Spodoptera littoralis*.

Palabras clave

Blatella germanica, *Bacillus thuringiensis*, control biológico, actividad insecticida

ABSTRACT

The German cockroach (*Blattella germanica*) is a species distributed worldwide that lives in urban environments and carries human pathogens. Due to its great ability to develop resistance to chemical insecticides, biological control strategies such as the use of the bacterium *Bacillus thuringiensis* have become a potential alternative. The aim of this work was to evaluate the insecticidal activity of several Vip and Cry proteins expressed by various *B. thuringiensis* and *E. coli* strains, on nymphs and adults of *B. germanica* and *Blaptica dubia* under laboratory conditions. Firstly, a bioassay method was developed, which finally consisted of the individualization of the insect in blisters and the superficial contamination of the diet with the protein. The observation of each bioassay lasted for 30 days and the maximum possible protein concentration was applied. None of the 24 proteins tested was effective against any of the cockroach species. The activity of the protein was previously checked on *Spodoptera littoralis*.

Keywords

Blatella germanica, *Bacillus thuringiensis*, biological control, insecticidal activity

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1- Distribución, hábitat, biología y problemática.....	1
2- Métodos de control	3
3- <i>Bacillus thuringiensis</i> y ciclo de desarrollo	5
4- Mecanismo de acción de las proteínas insecticidas	7
5- Resistencias frente a BT	8
6- Aplicaciones de BT.....	9
7- Susceptibilidad de Cucarachas a BT.....	9
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
1- Insectos. Origen y métodos de cría.....	12
2- Proteínas insecticidas y cepas bacterianas empleadas	13
3- Expresión de proteínas en <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
4- Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i>	14
5- Purificación de las proteínas	14
6- Precipitación por sulfato de amonio	15
7- Solubilización y activación de proteínas	15
8- Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE.....	16
9- Cuantificación de la proteína purificada.....	16
10- Diseño de un método de bioensayo	16
RESULTADOS	21
1- Producción de proteínas.....	21
2- Activación de proteínas	22
3- Método de bioensayo	23
4- Actividad de las proteínas de Bt frente a <i>B. germanica</i>	27
5- Actividad de las proteínas de Bt frente a <i>B. dubia</i>	29
6- Actividad de las proteínas de Bt frente a <i>Spodoptera littoralis</i>	29
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA	36

INTRODUCCIÓN

1- Distribución, hábitat, biología y problemática

Los insectos son numéricamente el grupo más abundante del reino animal. El número total de especies se estima entre unos 6 y 10 millones (Erwin et al., 1997) y algunas de ellas representan una amenaza para el ser humano como potenciales plagas.

Dentro de este inmenso grupo se conocen como cucarachas a aquellos insectos pertenecientes al orden *Blattodea*, familia *Blattidae*, de las que existen aproximadamente unas 4500 especies registradas (Portnoy et al., 2013). La mayoría de ellas, más del 99%, viven en hábitats naturales y apenas 12 de estas especies son consideradas como plagas domésticas según la Organización Mundial de la Salud. Los registros fósiles han demostrado que se trata de un grupo de extraordinaria capacidad adaptativa y uno de los más primitivos, pues ya habitaban la Tierra en el Carbonífero superior, hace unos 300 millones de años (Guzman & Vilcinskis, 2020). Su gran capacidad de reproducción y de colonización les ha permitido sobrevivir a épocas de extinción de otras especies, cambios climáticos o fenómenos geológicos, pudiendo sobrevivir hasta un mes sin agua ni comida (Willis & Lewis, 1957).

Entre las especies más comunes destacan *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis* y *Blaptica dubia* (O'Connor & Gold, 1999). Todas ellas son especies hemimetábolos, de cuerpo aplanado, con una estructura laminar (pronoto) que cubre la cabeza y el tórax, un par de largas antenas que utilizan como potentes órganos sensoriales y alas esclerotizadas con función protectora (Figura 1). Es también característica la presencia de una ooteca en las hembras, que transportan externamente hasta antes de su eclosión (Montada & Guerrero, 1996).



Figura 1. Detalle de una ooteca (izquierda), de una ninfa (centro) y de adultos (derecha) de *B. germanica* (CABI, 2021).

Es un insecto omnívoro que consume una gran variedad de alimentos y restos orgánicos propios de las viviendas o almacenes (V. Durier & Rivault, 2000). Los tiempos del ciclo de vida (desarrollo ninfal, duración de la etapa adulta y número de generaciones al año) están fuertemente influidos por factores externos como la temperatura, humedad o

abundancia de alimento (Mariño Pedraza, 2011). Como valores promedio en condiciones favorables (25°C y oscuridad total) para *B. germanica*, se estima un ciclo de desarrollo ninfal de 44 días con 6 estadios ninfales (6 mudas), 32 - 40 huevos por ooteca y 6 ootecas por hembra (Figuroa, 1964), con un periodo de incubación de unos 18 - 21 días. Por lo tanto, el ciclo completo tiene una duración de unos 65 días.

Todas estas especies se caracterizan por ser plagas urbanas que habitan en las cloacas o rendijas del interior de las edificaciones de condiciones higiénicas pobres, en zonas domésticas donde hallan un ambiente oscuro, húmedo y de temperaturas cálidas, por lo que su presencia es mayor en las regiones tropicales o subtropicales (Mariño Pedraza, 2011). Si bien la distribución geográfica de algunas de ellas está acotada a una determinada región, otras, como *B. germanica*, están extendidas por todo el mundo (Figura 2), especialmente desde la época del colonialismo a través del transporte marítimo (Oldenburg et al., 2008; Tang et al., 2019).

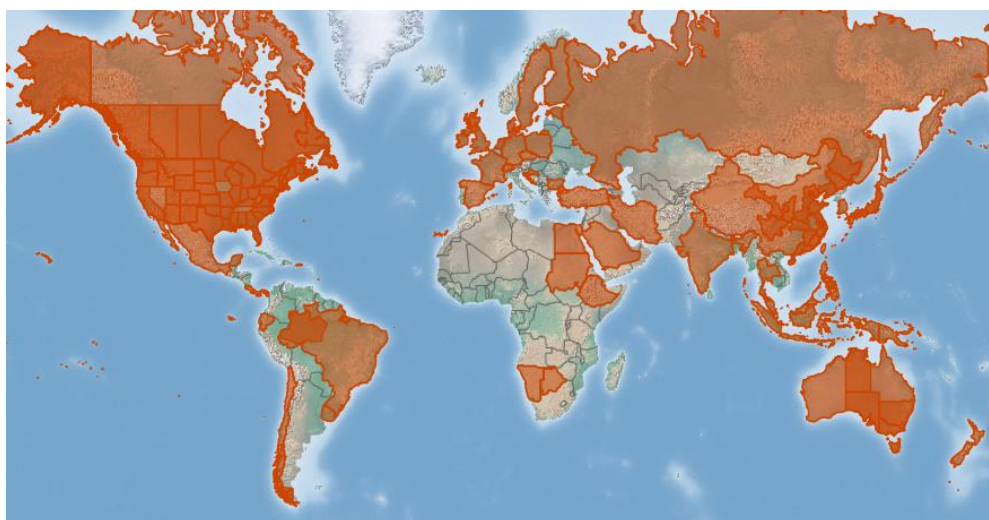


Figura 2. Mapa de distribución de *B. germanica*. En naranja, solo localizaciones registradas en la base de datos (CABI, 2021)

Desde el punto de vista económico, las cucarachas representan un gran problema en la actualidad ya que los daños que ocasionan en productos almacenados son cuantiosos. Dichos insectos, al regurgitar la comida parcialmente digerida o al depositar sus excrementos sobre los alimentos almacenados, originan malos olores y contaminaciones. En consecuencia, los productos deben ser eliminados, ya que, de lo contrario, la presencia de microorganismos patógenos en ellos podría provocar graves enfermedades para el ser humano, ganado u otros vertebrados (Mariño Pedraza, 2011).

En el aspecto sanitario, suponen una plaga preocupante desde hace muchos años. Como ya sospechaba Toda, T. (1923), las cucarachas pueden ser las responsables de la transmisión de enfermedades infecciosas como el cólera. A partir de entonces, muchas otras investigaciones centradas en los microorganismos asociados a este insecto han revelado que las cucarachas son vectores de patógenos (Strand & Brooks, 1977; Willis & Lewis, 1957). Entre ellos se encuentran más de 40 especies de bacterias patógenas (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), virus, hongos (e.g. *Candida* spp., *Aspergillus* spp.) y parásitos (e.g. *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*) que

provocan una gran variedad de enfermedades como lepra, peste bubónica, disentería, hepatitis, tuberculosis o neumonía (Graczyk et al., 2005; Kassiri et al., 2018; Leshan Wannigama et al., 2013; Saitou et al., 2009; Salehzadeh et al., 2007). El hecho de habitar en muchas ocasiones en la red de saneamiento y alimentarse de basuras y excrementos hace que sean portadoras de gran cantidad de estos patógenos (Allen, 1987). Además, las cucarachas diseminan los patógenos a través de secreciones de su cutícula (Mpuchane et al., 2011), una potente fuente de alérgenos que puede también provocar graves reacciones alérgicas, rinitis o asma (Sheih et al., 2017).

Sin embargo, también pueden aportar beneficios. Por sus propiedades antibióticas han sido utilizadas como remedios caseros en las culturas china y griega para tratar ciertas enfermedades (Feng et al., 2018; Gao et al., 2018; Mariño Pedraza, 2011). En la actualidad también se utilizan comercialmente como fuente de alimento para mascotas y, en cuanto a la alimentación humana, podrían llegar a ser una interesante fuente de proteínas alternativa en el futuro. Además, estudios recientes han demostrado que sus bacterias simbiotas aportan propiedades que pueden ser de gran utilidad en los campos de la biotecnología, medicina, agricultura e industria (Guzman & Vilcinskis, 2020).

2- Métodos de control

Al igual que en la agricultura, el protocolo para combatir las cucarachas debería estar basado en planes de gestión integrada de plagas (GIP), cobrando mayor importancia por tratarse de plagas en zonas domésticas. Estos planes incluyen la identificación y seguimiento de la plaga y actuaciones de control preventivo, control mecánico, control biológico y control químico. Gordon (2020) propone la higiene y limpieza de sustancias atractivas para las cucarachas como un método de control preventivo efectivo, así como la colocación de trampas pegajosas como ejemplo de control mecánico. A pesar de la disponibilidad de otros métodos de lucha contra las plagas urbanas, el control químico mediante materias activas como clorpirifos, diclorvos, betacipermetrina, piretroides, carbamatos u organofosforados sigue siendo el sistema más comúnmente utilizado y el más efectivo (Chang et al., 2009; Gordon, 2020; Wu & Appel, 2017; C. L. Yang et al., 2019). Estos productos se aplican habitualmente sobre las zonas donde se refugian en un formato espolvoreando o en spray (Sharawi et al., 2019), y al ser ingeridos, inhalados o al entrar en contacto con las cucarachas, causan su muerte a través de varias vías de acción. Inicialmente, la efectividad de estos insecticidas fue muy elevada, pero al cabo de un tiempo surgieron problemas derivados de su aplicación masiva. La resistencia a estas sustancias por parte de las plagas objetivo fue uno de los primeros problemas que se percibió como consecuencia a una exposición continuada (Germanica & Díez, 2013; Tsai & Lee, 2001). Las resistencias se desarrollan principalmente a causa de tres mecanismos: i) Por cambios en los hábitos alimentarios y en el comportamiento de la especie plaga, ii) por modificación de los receptores o de las células diana con los que interacciona la sustancia insecticida, o iii) por una mayor metabolización y degradación de las materias activas por la acción de nuevas enzimas (Nasirian et al., 2011; Pietri et al., 2018).

Por otro lado, se ha observado en muchas especies de insectos una fuerte correlación entre la aparición de resistencias y la comunidad microbiana que alberga en su organismo. Particularmente, hay evidencias de que ciertas bacterias presentes en el tubo digestivo son las responsables de la detoxificación de xenobióticos, incluidos los insecticidas de origen sintético (Cheng et al., 2017; Kikuchi et al., 2012; Soltani et al., 2017). Esto ocurre también en *B. germanica*, que presenta una rica comunidad de bacterias simbiotes en su sistema digestivo, con más de 100 especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas pertenecientes a 37 géneros (Ayayee et al., 2018; Carrasco et al., 2014; Mpuchane et al., 2011) que participan en la eliminación de productos insecticidas. Evidencia de ello es el efecto sinérgico observado por Jensen et al., (2016) y Pietri et al. (2018) en la aplicación del insecticida junto con antibióticos frente a individuos resistentes, que tiene como resultado una efectividad semejante a la observada frente a individuos no resistentes. Algunos estudios sugieren que este mecanismo está detrás de la gran capacidad de adaptación y la rápida generación de resistencias propias de las cucarachas (Bracke et al., 1978; Pietri & Liang, 2018).

En los últimos años, ha ido en aumento la opinión pública y científica que pone en tela de juicio la aplicación generalizada de los insecticidas químicos. Además de los peligros de desarrollo de resistencias ya descritos que comprometen su efectividad, son numerosos los problemas que se les atribuyen tanto para la salud humana, debido a sus propiedades tóxicas y mutagénicas, como para la protección ambiental (Pan & Zhang, 2020). Los insecticidas químicos ponen en peligro el medio ambiente contaminando los ecosistemas, pues muchos de ellos son persistentes y no se degradan fácilmente. Por estos motivos, las restricciones legales son cada vez mayores tanto para los productos ya existentes como para los nuevos, lo que obliga a incorporar prácticas y soluciones alternativas (M. Sarwar, 2010).

Una de estas soluciones son los denominados agentes de control biológico (BCA, Biological Control Agents), ya que presentan ningún riesgo para el ser humano, los ecosistemas, ni para ningún organismo que no esté relacionado con la plaga objetivo (Muhammad Sarwar, 2013). Se trata, pues, de insecticidas selectivos, de baja persistencia y cuyo modo de acción no es neurotóxico, pero que son altamente efectivos para una amplia mayoría de plagas de insectos (M. Sarwar, 2010). Además, por su alta especificidad, son seguros para los insectos polinizadores, depredadores y parasitoides, lo que contribuye a una mayor actividad y biodiversidad en los ecosistemas agrarios. Entre los agentes de control biológico se encuentran bacterias, virus, hongos, nematodos, enemigos naturales y sustancias derivadas de vegetales (Pan & Zhang, 2020). En las últimas décadas se ha realizado un gran progreso en la investigación y aplicación de muchos de ellos sobre *B. germanica*, entre muchas otras plagas. Y aunque se han arrojado resultados prometedores, todavía es necesario un mayor desarrollo de los BCA para que podamos estar hablando de una alternativa competitiva frente a los productos químicos. Los principales aspectos a mejorar son su breve persistencia, su reducida velocidad de acción hasta la muerte del insecto y su elevado coste de producción (Pan & Zhang, 2020).

En este contexto se desarrolla el presente trabajo, en la línea de desarrollo de agentes de control biológico, y más concretamente, de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915).

3- *Bacillus thuringiensis* y ciclo de desarrollo

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva perteneciente a la familia Bacillaceae, esporulante, de forma alargada (1 μm de ancho x 3-5 μm de largo), aerobia y anaerobia facultativa, que ha sido aislada en suelos, agua y tejidos de diferentes organismos en todo el mundo. Aunque fue descubierta y aislada en Japón en 1901, no fue oficialmente descrita hasta 1915 por el entomólogo alemán Berliner, y hasta los años 20 cuando se llevaron a cabo los primeros intentos de control de plagas (Iriarte et al., 1998; Martin & Travers, 1989). El primer insecticida comercial formulado a base de la bacteria fue producido en Francia en 1938 pero el auge de los insecticidas de síntesis desvió las investigaciones (Ibrahim et al., 2010; Roh et al., 2007). A partir de los años 70 se llevaron a cabo amplios programas de muestreo que dieron lugar a la caracterización de nuevas cepas constituyentes de algunos de los bioinsecticidas que se comercializan actualmente (Ruiz de Escudero, 2006).

Su característica diferencial respecto a otros bacilos es la capacidad de formar un cristal paraesporal durante el proceso de esporulación que está compuesto por proteínas, responsables de la actividad insecticida (Baumann et al., 1984). El cristal paraesporal se sintetiza debido a múltiples genes que están contenidos en plásmidos, que pueden ser cedidos o intercambiados entre distintas células (González & Carlton, 1984; Yamamoto, 2001). Esta característica da lugar a una gran variabilidad genética entre las muchas cepas de *B. thuringiensis* descubiertas (Sanchis, 2000). Las proteínas que forman los cristales o cuerpos de inclusión, que presentan distintas formas (bipiramidales, cúbicos, esféricos e irregulares) en función de su composición, se denominan δ -endotoxinas (Ruiz de Escudero, 2006). Según su estructura molecular se clasifican en proteínas Cyt y Cry, las cuales constituyen el grupo más numeroso de todas las proteínas insecticidas (BPPRC; Crickmore et al., 1998). Adicionalmente, algunas cepas Bt producen también proteínas durante su fase vegetativa que son secretadas al medio externo y que igualmente poseen propiedades insecticidas. Estas proteínas pueden ser a su vez de dos clases, denominadas Vip (vegetative insecticidal protein) y Sip (secreted insecticidal protein).

El ciclo de vida de *B. thuringiensis* tiene dos fases claramente diferenciadas. La primera fase de crecimiento vegetativo tiene lugar cuando en el medio se dan las condiciones favorables de temperatura, pH, nutrientes y aireación (Ibrahim et al., 2010; M. Porcar, 2012). Es entonces cuando la spora germina, originando una célula que crece y se divide sucesivamente en dos células idénticas, como cualquier otra especie de bacteria (Osman & El-Ghareeb, 2015). Aunque es capaz de crecer a una temperatura de entre 15 - 45 $^{\circ}\text{C}$, el rango óptimo se encuentra en 26 - 30 $^{\circ}\text{C}$, por encima del cual los plásmidos que contienen los genes insecticidas pueden ser secretados al medio (Mikesell et al., 1983). Análogamente, el pH más adecuado para el crecimiento se encuentra en torno a 7 pero

puede desarrollarse desde 5,5 hasta 8,5 (Bernhard et al., 1997). Durante esta fase de crecimiento exponencial, las bacterias suelen unirse formando pares o cadenas cortas (Figura 3). En el momento que uno o más nutrientes comienzan a escasear o las condiciones del medio le son adversas, las bacterias entran en fase estacionaria o de esporulación. En ella tiene lugar, mediante un complejo proceso de 7 etapas, la formación de una spora resistente y de un cristal paraesporal proteico, uno en cada extremo de la célula (Bechtel & Bulla, 1982). La esporulación finaliza con la lisis de la pared celular del esporangio y la liberación del cristal y de la spora madura, que germinará y reiniciará la fase vegetativa cuando las condiciones vuelvan a ser favorables (Figura 3).

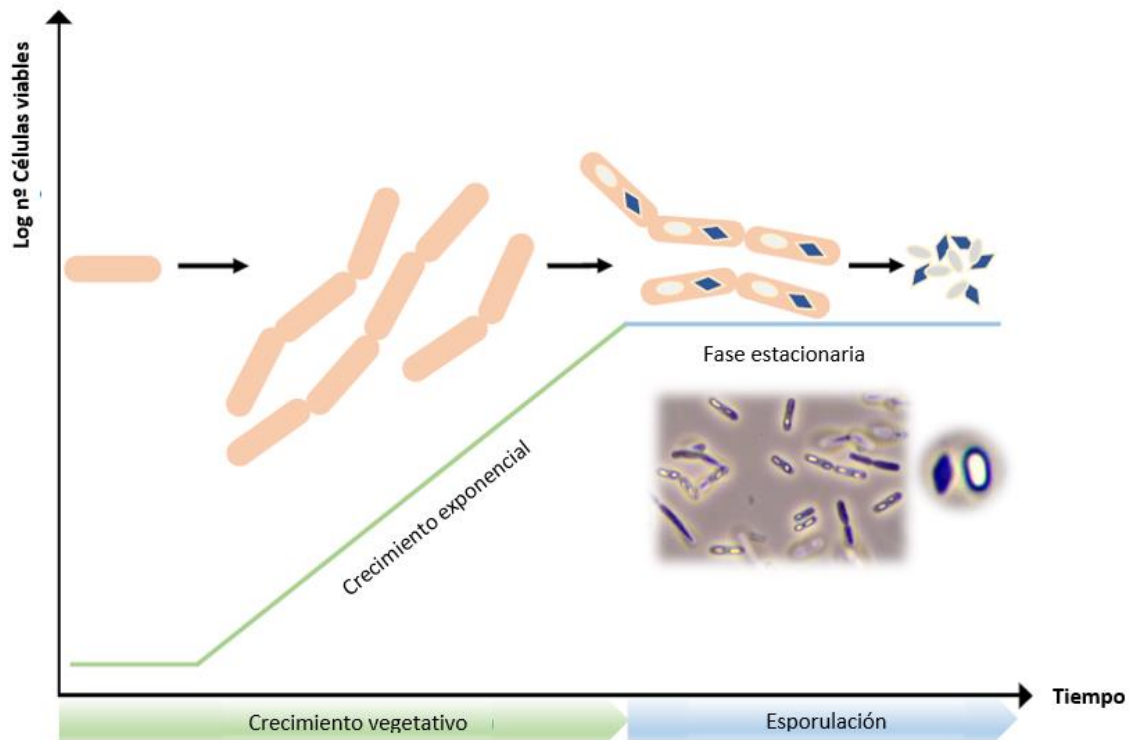


Figura 3. Ciclo de vida de *B. thuringiensis*. Crece exponencialmente durante la fase vegetativa. En fase estacionaria, esporula y las proteínas se agregan en el cristal paraesporal. Finalmente, la célula se lisa liberando el cristal y la spora, que germinará de nuevo, cerrando así el ciclo (Caballero, 2019).

B. thuringiensis es de un microorganismo asociado al suelo, donde la spora mantiene su viabilidad durante años y es altamente resistente a condiciones extremas de calor, salinidad o sequedad (Iriarte et al., 1998; Martin & Travers, 1989). En cambio, tanto la spora como el cristal son sensibles a la radiación ultravioleta, perdiendo su viabilidad con rapidez cuando se exponen a la luz solar (C. M. Ignoffo, 1992). Estos cristales producen un efecto letal sobre el insecto huésped, que sirve como fuente de nutrientes para la germinación de esporas latentes, iniciando así su crecimiento vegetativo sobre el cadáver (De Maagd et al., 2001). Aunque actualmente se desconoce el verdadero papel ecológico de los cuerpos cristalinos de *B. thuringiensis*, podrían tratarse de una ventaja competitiva para un patógeno oportunista, es decir, el insecto representa una fuente complementaria de alimento (Schnepf et al., 1998).

4- Mecanismo de acción de las proteínas insecticidas

Las proteínas Bt han resultado activas frente a un amplio espectro de insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera, Neuroptera, Orthoptera y Mallophaga, así como contra otros invertebrados como nematodos, ácaros y protozoos (van Frankenhuyzen, 2013). El modo de acción de las proteínas Cry y Cyt comienza por la ingestión de los cristales, que llegan prácticamente inalterados hasta que se solubilizan en el intestino medio. Para conseguir la adecuada disolución del cristal tienen que darse unas condiciones químicas particulares que dependen del tipo de proteína, la composición del cristal, la composición del contenido intestinal y su pH. Tras la solubilización, se liberan las protoxinas, que requieren ser activadas por diferentes tipos de proteasas presentes naturalmente en el intestino, mayoritariamente tripsinas y quimiotripsinas, para dar lugar a la toxina, de menor tamaño (unos 60 - 70 kDa) (Bradley et al., 1995; Haider et al., 1986; Jaquet et al., 1987).

Las células epiteliales del intestino están protegidas por la membrana peritrófica, formada por quitina y otras proteínas que forman una red porosa. Las toxinas tienen el tamaño suficiente como para atravesar esta membrana y unirse a receptores de la membrana de las células columnares llamadas sitios de unión específicos (Figura 4). La unión da lugar al complejo toxina-receptor y se producen una serie de cambios en la estructura de la proteína que permiten la inserción de la toxina en la membrana (Schnepf et al., 1998). Existen varios modelos que explican a partir de aquí la acción citolítica de las toxinas, aunque generalmente se acepta el modelo de lisis coloideosmótica (Knowles & Ellar, 1987) por la cual las proteínas oligomerizan y forman poros en las microvellosidades de las células columnares. En consecuencia, se desencadena un desequilibrio osmótico por el libre movimiento de los iones. Debido a la presencia de gran cantidad de solutos incapaces de atravesar los poros, se produce una entrada de agua para alcanzar el equilibrio osmótico. Las células se hinchan hasta que se ocasiona su lisis y la destrucción del epitelio intestinal, el tubo digestivo queda inutilizado y el insecto muere de inanición. Además, el efecto de la proteína puede verse potenciado y derivar en una septicemia cuando las esporas presentes en el intestino acceden a la cavidad hemocélica, donde proliferan.

Las proteínas Cry y Vip3A tienen un modo de acción similar, si bien se ha visto que los sitios de unión del epitelio intestinal son distintos para cada una de ellas (M. K. Lee et al., 2003; Sena et al., 2009). Por ello, hasta la fecha no se ha detectado resistencia cruzada y su uso combinado puede emplearse para paliar la aparición de resistencias (Bravo et al., 2011; M. K. Lee et al., 2006; Mehlo et al., 2005).

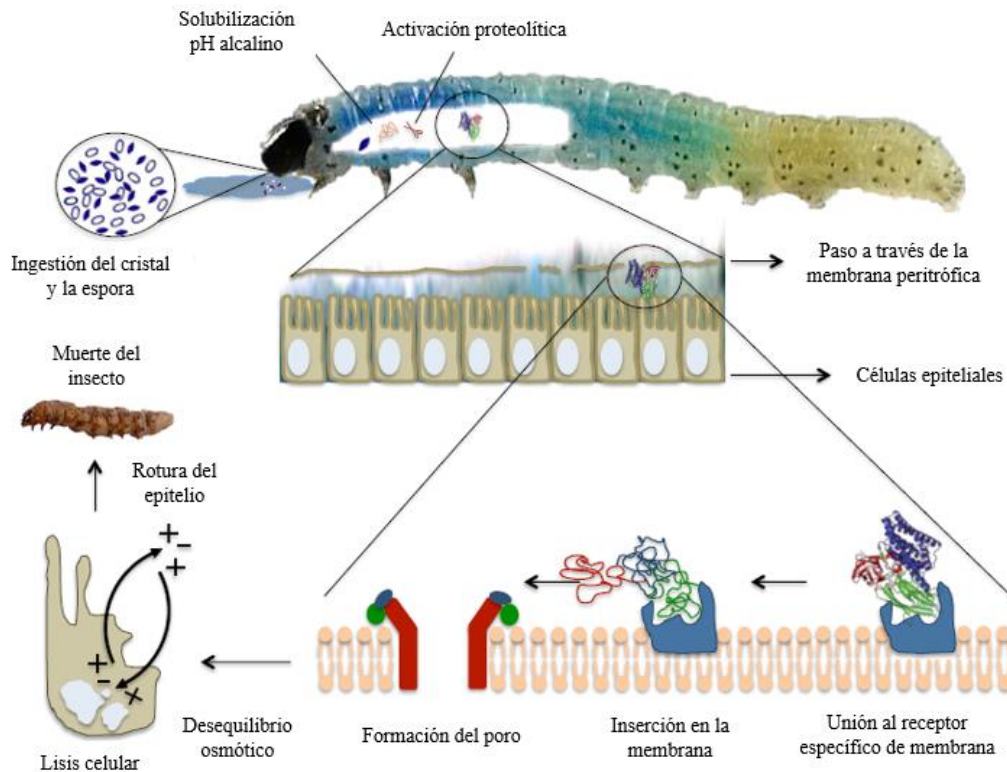


Figura 4. Modo de acción de las proteínas Cry (Caballero, 2019).

5- Resistencias frente a BT

Desde que se extendió el uso de *B. thuringiensis* hace más de 40 años, varias plagas del orden Lepidoptera como *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni* o *Helicoverpa armigera* han desarrollado resistencias a niveles detectables en campo (Downes & Mahon, 2012; Ferré et al., 2008; Kain et al., 2015; Y. B. Liu & Tabashnik, 1997; Tabashnik et al., 1990). Otros lepidópteros, dípteros y coleópteros (Ferré & Van Rie, 2002), además de nematodos (Marroquin et al., 2000), también han sido capaces de generar resistencias, pero en condiciones de laboratorio bajo presión de selección. Las resistencias pueden originarse a causa de alteraciones en alguna de las etapas que intervienen en su modo de acción. Hasta la fecha se han identificado tres mecanismos de resistencia:

1) Alteraciones en el procesamiento proteolítico de la protoxina, como la ausencia de determinadas proteasas en el intestino del insecto, lo que da lugar a una escasa activación (Oppert et al., 1997). 2) Las mutaciones en los sitios de unión específicos son el mecanismo de resistencia más común, y responsables además de las resistencias cruzadas. Este tipo de resistencia puede expresarse como una disminución en la afinidad entre la toxina y el sitio de unión (Ferre et al., 1991), la falta absoluta de interacción (Van Rie et al., 1990) o la reducción en el número de zonas de unión (Herrero et al., 2001). 3) El último mecanismo de resistencia, reportado en *H. virescens*, es la rápida regeneración de células columnares afectadas antes de que los daños sean irreversibles (Forcada et al., 1999; Martínez-Ramírez et al., 1999).

6- Aplicaciones de BT

A pesar de que en la actualidad se conocen miles de cepas, sólo unas pocas son empleadas en la fabricación comercial de bioinsecticidas, que suelen consistir en mezclas pulverizables de esporas y cristales (Ruiz de Escudero, 2006). Los bioinsecticidas formulados a base de Bt son los más utilizados ya que representan el 80% de los comercializados en todo el mundo (Whalon & Wingerd, 2003). Por otro lado, la aplicación de *B. thuringiensis* que más impacto ha tenido es el desarrollo de las plantas transgénicas. Se trata de plantas que en sus tejidos expresan las proteínas en su forma soluble como toxinas y que la dotan de capacidad para autodefenderse de los insectos plaga (De Maagd et al., 1999). Los primeros cultivos modificados genéticamente fueron el tomate y el tabaco en 1986 (Barton et al., 1987; Vaeck et al., 1988). Aunque al principio los niveles de expresión eran bajos e insuficientes para controlar la plaga, lograron aumentarse mediante modificaciones en la secuencia genética, lo que a su vez redujo el riesgo de selección de genotipos resistentes (Perlak et al., 1991). El mayor beneficio es la disminución del número de tratamientos sobre el cultivo, lo que tiene un impacto positivo sobre la fauna auxiliar al mismo tiempo que se reducen los costes de la explotación (Carpenter, 2002). El uso de cultivos Bt ha aumentado de forma considerable desde 1996 hasta los 189,8 millones de hectáreas cultivadas en 2017, principalmente de soja, maíz, algodón y colza, siendo sus principales productores Estados Unidos, Brasil y Argentina (James, 2018).

La efectividad de los cristales se ve reducida en gran medida por la radiación ultravioleta que los degrada o por la lluvia que los lava de las superficies (C. M. Ignoffo, 1992; Carlo M. Ignoffo & Garcia, 1978; McGuire & Shasha, 1990; Pusztai et al., 1991). Esto hace necesario el desarrollo de nuevas formulaciones que amplíe la persistencia y la viabilidad de las toxinas a través de distintas estrategias, como la encapsulación del cristal en microcápsulas biodegradables o en otras bacterias huésped no fitopatógenas como *Bacillus megaterium* o *Pseudomonas fluorescens* (Bora et al., 1994; Thompson, 1994; W. Yang et al., 2012). Otra línea de actuación es la potenciación de la toxicidad a través de nuevos genes insecticidas, nuevas combinaciones de ellos o niveles de expresión más elevados (Kuo & Chak, 1996; Manuel Porcar & Juárez-Pérez, 2003). Esto se ha logrado en los llamados *Productos de Segunda y de Tercera Generación*, utilizando técnicas biotecnológicas que modifican cepas nativas introduciendo genes por conjugación o transformación, procesos que son la clave de las futuras mejoras junto con la lucha contra las resistencias (Tabashnik et al., 2011).

7- Susceptibilidad de Cucarachas a BT

En cuanto a las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha sobre la susceptibilidad de cucarachas, y más concretamente, de *B. germanica* frente a *B. thuringiensis*, existen disparidad de resultados, además de contradictorios; el número de estudios de toxicidad es escaso, y más aún en condiciones de campo.

Por un lado, en varios ensayos se afirma que la bacteria resultó tóxica contra *B. germanica*, aunque en algunos de ellos no se especifica qué cepas utilizan (H. L. Lee et al., 1984; Ulewicz, 1975). Singh & Gill, (1985), muestran la toxicidad del serovar *israelensis* mientras que Lonc et al. (1997) ensayaron diferentes aislados del serovar *kurstaki*, con una mortalidad máxima del 34% a una concentración de $1,6 \times 10^9$ esporas/ml. Zukowski (1993) obtuvo un 83% de mortalidad a los 9 días en ninfas neonatas al suministrarles un cebo con el formulado comercial Dipel 1%. Sandhu (1980) también encontró mortalidad en un preparado a base de Dipel, y Payne (1993), utilizando la proteína Cyt1Ba1. Otro estudio más reciente probó que los serovares *colmeri*, *yunnanensis*, *huazhangensis*, *roskildiensis* y *sooncheon* provocaban una mortalidad de hasta el 30% después de 7 días a una concentración de 1×10^{10} células/ml (Fiuza et al., 2017). La efectividad de 3 aislados de *B. thuringiensis* que muestra Zulfiana et al. (2018), en los tratamientos de pulverización con spray es incluso mayor que en los tratamientos con la toxina incorporada en una dieta azucarada semisólida, al cabo de 14 días. La última referencia de la que se tiene constancia son los ensayos de Liu et al. (2020), en los que se ensayó la proteína Vip3Aa1 sobre adultos de *B. germanica* y *P. americana*, obteniendo a las 24 horas una DL_{50} de 0,276 y 0,182 mg/ml respectivamente.

Por contra, en otros ensayos realizados a partir de la mezcla de cristales y esporas de Cry1, Cry2 y Cry5 con dieta artificial, no se ha producido mortalidad ni cambios sustanciales en el peso de ninfas neonatas de *B. germanica*, *P. americana* y *B. orientalis* (M. Porcar et al., 2006). No obstante, estos mismos autores sí obtuvieron mortalidad administrando las esporas vía intratorácica. Además, Pan & Zhang (2020) afirman que hasta la actualidad no se ha descubierto ninguna cepa a la que se pueda atribuir mortalidad sobre *B. germanica*, proponiendo como posibles razones el ambiente ácido en el intestino, con un pH de alrededor de 5,7 (Vinokurov et al., 2007) que no disolvería la proteína o la falta de receptores en las células columnares. No obstante, no existe un trabajo donde se haya probado de forma sistemática una batería de proteínas contra *B. germanica* o *B. dubia*. Por todo ello, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

- Evaluación de la actividad insecticida de proteínas de *B. thuringiensis* frente a *B. germanica* y *B. dubia*.
- Puesta a punto de un método de bioensayos para ninfas neonatas y adultos de ambas especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

1- Insectos. Origen y métodos de cría

Para poder disponer de insectos suficientes para realizar los ensayos, inicialmente hubo que establecer una población de *B. germanica*. Los individuos precursores de dicha población fueron solicitados al insectario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) en Barcelona. La población de origen no había sido sometida a ningún tratamiento, químico ni biológico, y no cuenta con genes de resistencia.

Los individuos recibidos fueron separados en distintos recipientes de vidrio de 1,5 litros de capacidad y cerrados con una tela tipo muselina transpirable sujeta con una goma elástica (Figura 5), según su estadio ninfal y por la presencia de ooteca en hembras adultas. Una vez que liberaban la ooteca, las hembras eran devueltas al recipiente que contenía los adultos. El borde superior del recipiente era impregnado con aceite de girasol para impedir que las cucarachas trepasen.



Figura 5. Tarros de vidrio utilizados en la cría

En cada recipiente se introducía una placa Petri de 30 mm de diámetro con algodón empapado en agua, varios pellets de pienso para perros, como fuente de alimento, un papel doblado y un trozo de cartón corrugado como refugio. Las tareas de mantenimiento de la población se realizaban 2 días a la semana y consistían en la separación de hembras adultas con ooteca y el recambio de pellets de pienso, agua y del papel doblado. El resto del tiempo, las cucarachas permanecían en cámaras a una temperatura de 25 ± 2 °C, bajo condiciones de humedad elevada y oscuridad total.

Por otro lado, las ninfas neonatas y adultos de *Blaptica dubia* fueron solicitadas a la empresa “Exofauna” (Lorca, Murcia). Éstas se emplearon directamente en los bioensayos sin establecerse una población permanente.

Como control positivo de las proteínas de *B. thuringiensis* se utilizaron larvas neonatas de *Spodoptera littoralis*. Las larvas fueron criadas en el insectario de la UPNA bajo condiciones controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 5\%$ humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 luz:oscuridad). Las larvas se alimentaban de dieta semisintética (Greene et al., 1976) y los adultos de una solución azucarada al 10%.

2- Proteínas insecticidas y cepas bacterianas empleadas

Las proteínas producidas figuran en la Tabla 1 y fueron expresadas en cepas recombinantes de *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis* que pertenecen a la colección de la UPNA. Cada una de las cepas empleadas portaba un plásmido que contenía el gen de Bt de interés. Todas las proteínas Vip3, Cry9 y Cry32 fueron expresadas en *Escherichia coli*, el resto, en *B. thuringiensis*. Por otro lado, también fueron ensayadas las cepas que componen los productos comerciales Bactur, Cordalene, Dipel y Xentari, formulados con cepas nativas que expresan una mezcla natural de proteínas Cry. Además, se ensayaron otras proteínas (Cry1Bb, Cry1Ia7, Cry9A, Cry32, Cyt1Ca) que ya se habían producido anteriormente en el laboratorio y que se encontraban conservadas a -80 °C. Por lo tanto, se ensayaron un total de 24 proteínas y 4 productos comerciales.

Tabla 1. Proteínas de *B. thuringiensis* producidas

Especie bacteriana	<i>B. thuringiensis</i>		<i>E. coli</i>			
	pEG1270		pET28b		pGA85	
Proteína expresada	Cry1Aa	Cry1Ab	Vip3Aa45	Cry32	Vip3Aa1	Vip3Ab1
	Cry1Ac	Cry1B	Vip3Ag4	Cry9C	Vip3Ad2	Vip3Ae1
	Cry1Fa	Cry1D	Vip3Ca1	Cry9E	Vip3Af1	ISP3D
	Cry2Aa					

3- Expresión de proteínas en *Bacillus thuringiensis*

Cuando el gen que queríamos expresar se encontraba clonado en *B. thuringiensis*, se sembró cada una de las cepas en una placa de medio CCY (Stewart et al., 1981). Al cabo de 3-4 días a una temperatura de 28 °C se comprobó el estado de crecimiento de las bacterias en microscopio. Las colonias seleccionadas se recogieron con un asa de siembra en un vial con 1 ml de agua destilada estéril, y la suspensión se pasteurizó durante 30 minutos a 70 °C para sincronizar el cultivo. El inóculo pasteurizado se añadió a un matraz de 2 litros con 500 ml de medio CCY y suplementado con el correspondiente antibiótico. El cultivo se mantuvo durante 72 horas a 28 °C y agitación continua a 220 rpm. En el

momento en el que al menos el 90% de las bacterias habían esporulado y lisado; y se podían observar a microscopio las estructuras de esporas y cristales, se añadieron 100 ml NaCl 5M. El cultivo se centrifugó a 4 °C y 6500 rpm durante 15 minutos. Tras verter el sobrenadante, el pellet fue lavado con agua MiliQ y centrifugado de nuevo en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 15 ml de agua MiliQ. La mezcla de esporas y cristales se conservó a -20 °C hasta su uso.

4- Expresión de proteínas en *Escherichia coli*

El proceso de expresión en *E. coli* (BL21) de los genes *cry9*, *cry32*, *vip3Ca* y *vip3As* que estaban clonados en los plásmidos pET28b y pGA85 se inició sembrando el clon correspondiente en una placa de medio Luria-Bertani (LB, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro, pH 7,2) con kanamicina a 50 µg/ml o ampicilina 100 µg/ml, según el plásmido de expresión. Al cabo de 24 horas a 37 °C, se inoculó un precultivo sembrando una colonia en 50 ml de medio 2xTY (16 g triptona, 10 g extracto de levadura, 5 g NaCl por litro, pH 7,0) suplementado con kanamicina o ampicilina que se incubó toda la noche a 37 °C y 200 rpm en un matraz de 250 ml. A la mañana siguiente, se sembraron 10 ml del preinóculo en un matraz de 2 l, que contenía 500 ml de 2xTY (Kn 50 µg/ml o Amp 100 µg/ml). El cultivo se mantuvo a 37 °C y 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,6 ($\lambda = 600$ nm) en el caso de Cry9, y transcurridas 8 horas en el caso de Vip3A. En ese momento, se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG entre 1 y 2 mM de concentración final según la proteína. Después de 6 horas a 37 °C y 210 rpm para Cry9 y de 16 horas para las proteínas Vip3A, se centrifugó el cultivo a 4 °C y 6.500 rpm durante 15 minutos. El pellet se congeló a -80 °C hasta el día siguiente, cuando tuvo lugar el proceso de extracción, solubilización y purificación de la proteína.

5- Purificación de las proteínas

Cada uno de los pellets se resuspendió en un determinado volumen de LEW (Lysis-Equilibration-Wash) buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) según la relación 3 ml LEW buffer:g pellet. Se añadió 3 mg lisocima/ml, 10 µg benzonasa/ml (Novagen, Estados Unidos) y 100 µM PMSF. La mezcla se incubó a 37 °C en agitación suave durante una hora. Las células se sometieron a 3 ciclos de 60 segundos de ultrasonidos al 50-60% de potencia, con pausas de 60 segundos entre ciclos (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, USA). A continuación, los protocolos difirieron según la proteína, ya que las proteínas Cry9 requieren un paso adicional de purificación. El lisado se centrifugó durante 30 minutos a 4 °C y 10.000 rpm. Se conservó el sobrenadante (S1) y se resuspendió el pellet en un volumen de tampón carbonato (0,05 M Na₂CO₃; 0,1 M NaCl; pH 11,3) en relación 3 ml tampón carbonato:g pellet y 0,01 M ditiotreitól (DTT). Tanto esta suspensión como el lisado de las Vip3A se llevaron al agitador orbital magnético para incubar en hielo a bajas revoluciones. Tras una hora para las Vip3A y dos

para las Cry9, se centrifugó el lisado a 4 °C y 10.000 rpm durante 45 minutos para obtener la toxina solubilizada en el sobrenadante, cuyo pH se redujo hasta 8,4 con HCl 5M en el caso de las Cry9. Las proteínas Vip3Aa1, Vip3Ab1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3af1 y ISP3D fueron precipitadas desde el extracto con sulfato de amonio (ver apartado 5 de Material y Métodos).

El sobrenadante de Cry9, Vip3Aa45 y Vip3Ag4 se filtró (junto con el S1 en Cry9) con filtros de acetato de celulosa (Sartorius Stedim Biotech, Germany) de 0,45 y 0,2 µm de diámetro para después purificar la proteína a través de la columna de afinidad Níquel-Histidina (Protino Ni-TED 2000 Machery-Nagel, UK) previamente equilibrada con 4 ml de LEW buffer. Posteriormente se lavó la columna dos veces con 4 ml de LEW buffer. La proteína fue eluída y recogida con 3 ml de buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0). Por su contenido en imidazol, que resulta tóxico para los insectos, se realizó un cambio de buffer a tampón carbonato para las proteínas Cry9 y a PBS (Phosphate Buffered Saline) para las Vip3A, empleando una columna de desalado (SephadexTH G-25M, GE Healthcare). Para ello, la columna se lavó 5 veces con 5 ml del buffer correspondiente y se cargaron 2,5 ml de la proteína eluída que se recogió en 3,5 ml del buffer deseado. Las proteínas se conservaron alícuotadas en viales a -80 °C.

6- Precipitación por sulfato de amonio

Debido a que el vector (pGA85) en el que fueron expresadas las proteínas Vip3Aa1, Vip3Ab1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1 y ISP3D no contaba con colas de Histidina, que permitirían su purificación en columnas de afinidad de Níquel, éstas fueron precipitadas con sulfato de amonio.

Para ello, se preparó una solución saturada de sulfato amónico (SA) con 160 g SA en 200 ml de agua MiliQ, que se mantuvo en agitación a 4 °C durante 24 horas. El sobrenadante proveniente de cada cultivo se filtró y se colocó en un matraz con agitación magnética a 4 °C. Sobre el sobrenadante se añadió, gota a gota, un volumen de SA equivalente a 2,3 veces el volumen de lisado a tratar. Se dejó la solución en agitación durante una hora para su equilibrado. La solución se centrifugó a 4 °C y 10.000 rpm durante 15 minutos. Después de verter el sobrenadante, se obtuvo el precipitado de proteína, que se conservó a -20 °C.

7- Solubilización y activación de proteínas

Los cristales de *Bacillus thuringiensis* que contenían las proteínas Cry fueron solubilizados en tampón carbonato. Para ello, un volumen de esporas y cristales se incubó en el mismo volumen de tampón carbonato (0,05 M Na₂CO₃; 0,1 M NaCl; pH 11,3) con DTT (ditiotretitol) a 10 mM, durante una hora en agitación suave a temperatura ambiente.

A continuación, se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford, descrito más adelante.

La activación de todas las proteínas se realizó con Tripsina (Sigma) preparada en un buffer de digestión (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ y 2 mM DTT). Dependiendo de la proteína a activar la relación tripsina:proteína osciló de 1:100 a 1:10. En todos los casos se activaron 5 µg de la correspondiente proteína a 37 °C durante 1 a 2 horas. Una vez completada la activación, se alicuotaron 3,75 µg de proteína para ser sometidos a electroforesis en geles de acrilamida

8- Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE

Las alícuotas de proteína recogidas durante las distintas etapas del proceso de producción y purificación, y las provenientes de los experimentos de activación, se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 11 % de acrilamida. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos con el correspondiente buffer de carga (4x Laemmli Sample Buffer, Biorad). Para estimar el tamaño de los péptidos obtenidos se empleó el marcador molecular Precision Plus Protein™ Standars – Dual color (Bio-Rad, USA). Los geles se corrieron a un amperaje constante de 45 mA por gel. Posteriormente los geles se tiñeron en azul de Coomassie.

9- Cuantificación de la proteína purificada

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976) a 595 nm empleando un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer plus, Germany). Se realizó una recta patrón con Albúmina de Suero Bovino (BSA). Las proteínas que fueron precipitadas con SA se cuantificaron por densitometría en el gel de acrilamida, en el cual se comparó la anchura de banda de la proteína objetivo con un patrón de cantidad conocida de (BSA).

10-Diseño de un método de bioensayo

Con el objetivo de evaluar la idoneidad de los recipientes elegidos y la forma de exposición a la toxina, se diseñaron varios tipos de ensayos. Se evaluó la facilidad en el manejo de las cucarachas, minimizando el riesgo de fuga. Así mismo, se buscó una forma de proporcionar a los individuos alimento suficiente y atractivo con el que pudieran mantenerse y satisfacer completamente sus necesidades alimentarias.

- Bioensayos con *Blattella germanica*

Método de bioensayo nº 1: Tarrinas de plástico

Se seleccionaron unas tarrinas en forma de pequeños vasos de 5 cm de altura por 3 cm de diámetro con tapa hermética. En cada tarrina se colocaba un trozo de papel doblado para

proporcionar refugio a las ninfas. El agua se suministró con un trozo de algodón empapado y colocado en la tapa de un vial de 1,5 ml. Como alimento se utilizó el mismo pienso que en la cría. También se untó el borde superior con aceite para evitar que las ninfas pudiesen trepar y escapar.

Las toxinas se ofrecieron a los insectos de varias formas: 1) Diluida en el agua con la que se humedecía el algodón. 2) Incorporada en una pasta húmeda de pienso, para lo cual se molían los pellets de pienso utilizados en la cría hasta formar un polvo homogéneo que se empapaba con la proteína y se secaba en la estufa durante una hora para evitar la aparición de hongos. 3) Impregnada en un cubo de manzana. 4) Diluida en proporción 1:1 con Fluorella Blue, un colorante alimenticio, y sacarosa, que se aplicó con una pipeta en forma de gotas directamente sobre la superficie de la tarrina. Todos los ensayos con *B. germanica* se mantuvieron a 25 °C y oscuridad total durante un mes aproximadamente, realizando dos observaciones a la semana.

Método de bioensayo nº 2: Individualización en blísteres

Con el objetivo de eliminar el efecto del canibalismo en los bioensayos, las ninfas fueron individualizadas desde el primer momento. De esta forma asegurábamos un periodo de 48 horas en hambre tras el cual ingerirían la toxina inmediatamente. Para ello, las ninfas se individualizaron en blísteres con 28 pocillos rectangulares (Figura 6, izquierda), que se cerraban con una tapa porosa de cartón y una ranura en sentido longitudinal de cada espacio. Tras las 48 horas de ayuno, las toxinas se ofrecían diluidas 1:1 en Fluorella Blue, atravesando la ranura con la punta de la pipeta y suministrando 5 µl de la mezcla por pocillo. Transcurridas dos horas se comprobaba a la lupa si cada una de las ninfas había adquirido la coloración azul de su sistema digestivo al beber de la solución con Fluorella Blue, tras lo cual cada ninfa era trasvasada a una placa de plástico transparente de 12 pocillos circulares de 4 cm² cada uno. Se colocó una servilleta de papel entre la base de la caja y la tapa (Figura 6, derecha) que aseguraba el adecuado solape, evitando fugas. Para disminuir la actividad y facilitar la manipulación de las cucarachas, el trasvase de los insectos se llevó a cabo en la cámara de 4 °C, después de un enfriamiento de unos 20 minutos a 4 °C. En cada uno de los pocillos se introducía un cubo de manzana como fuente de alimento y agua, que previamente había sido sometido a radiación ultravioleta para retrasar la formación de hongos. Todos los métodos de bioensayos fueron validados mediante el empleo de un control positivo que contenía Spinosad al 0,5%.



Figura 6. Detalle de *B. germanica* bebiendo la gota de toxinas con Fluorella Blue (izquierda) y placas transparentes de 12 pocillos con cubos de manzana donde se pueden observar las deyecciones de color azul (derecha).

Método de bioensayo nº 3: Placa Petri y diluciones en Fluorella Blue

Con el objetivo de garantizar una exposición más prolongada a la toxina se idearon varios tipos de ensayos en los que un volumen mayor de toxina mezclado 1:1 con Fluorella Blue se presentaba a los insectos en diferentes formatos y recipientes, en grupos de 10 individuos y sin necesidad de tenerlos previamente en hambre:

Las ninfas eran colocadas en placas Petri cerradas con Parafilm, en las que se suministraba la toxina colocada en un tapón de un vial con y sin algodón, y en el mismo vial abierto por arriba o cerrado con la punta agujereada (Figura 7). Todos estos formatos se probaron también en tarrinas, y además, un vial con la punta agujerada y pegado en la pared verticalmente. Se evaluó la existencia de canibalismo, el correcto acceso a la toxina y la adecuada hermeticidad del envase que haga posible el intercambio de gases, pero no la fuga de los insectos.

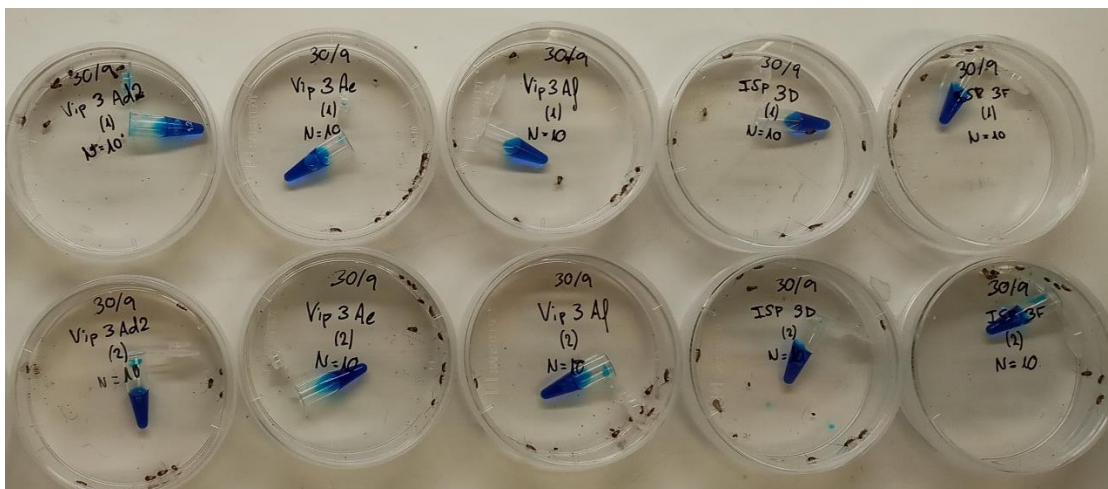


Figura 7. Bioensayos en placas Petri con los viales abiertos

Método de bioensayo nº 4. Contaminación superficial de la dieta

Con el objetivo de controlar el canibalismo y aumentar la ingesta, se planteó un método por el cual, individualizadas, pudieran ingerir la toxina de forma continuada, incorporada a un sustrato nutricionalmente rico. Así, las cucarachas se introdujeron de forma individualizada en los blísteres con una pequeña cantidad de dieta semisintética (Greene et al., 1976). Cada pocillo medía 2,5 cm², donde la dieta se contaminaba previamente de forma superficial, extendiendo 40 µL del tratamiento de forma homogénea y dejándolo secar en campana durante 45 minutos. La concentración de proteína se midió en µg/cm² y fue variable dependiendo del tratamiento, tratando de ofrecer a los insectos la mayor cantidad de proteína posible. Los insectos se mantuvieron en el blíster durante todo el ensayo. Se hicieron, como mínimo, 3 repeticiones por tratamiento, de 24 individuos cada una. El blíster se colocó dado la vuelta, con la dieta en la zona superior con el fin de que las cucarachas trepasen a por ella y evitar que se quedasen pegadas en la dieta húmeda (Figura 8).



Figura 8. Bioensayos de *B. germanica* en un blíster con dieta contaminada superficialmente con la solución de proteína.

- Bioensayos con *Blaptica dubia*

Los adultos y ninfas neonatas de *B. dubia* fueron adquiridas a la empresa “Exofauna” (Murcia). Los insectos llegaron en contenedores de plástico con salvado de trigo. Tras mantenerlos 24 horas en hambre, se procedió a la realización de los bioensayos. Las ninfas neonatas se individualizaron en blísteres de 24 pocillos. Los adultos se colocaron en placas Petri de 140 mm de diámetro en grupos de 10 individuos por placa. En cada una de las placas Petri se introdujo otra placa de 12 cm² de superficie donde se extendió dieta semisintética (Figura 9). Las toxinas de Bt fueron extendidas previamente sobre la dieta. Los ensayos se mantuvieron a 25 °C y en oscuridad, rellenando la placa con dieta sin tratar conforme era necesario. Los resultados se anotaron cada 7 días hasta la tercera semana. Se realizaron dos repeticiones de cada tratamiento, con 24 individuos los de ninfas y 10 los de adultos.



Figura 9. Adultos de *B. dubia* momentos después de introducir la dieta

- Bioensayos con *Spodoptera littoralis*

Con el objetivo de confirmar la actividad de las proteínas insecticidas empleadas y asegurar que el proceso de producción de las mismas había sido bien realizado, se llevaron a cabo ensayos de actividad sobre el lepidóptero *S. littoralis*. Trabajos previos realizados en el Laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos de la UPNA ya habían mostrado la susceptibilidad de *S. littoralis* a varias proteínas Cry y Vip (Ruiz de Escudero et al., 2014). Para ello, larvas neonatas de *S. littoralis* fueron ensayadas en paralelo a los bioensayos de *B. germanica*. Se llevaron a cabo dos repeticiones para cada una de las 8 proteínas Vip3A, en blísteres de 24 individuos, y sobre dieta semisintética contaminada superficialmente (Figura 10). Los ensayos se mantuvieron a 25 °C durante 10 días. Se suministró una única concentración de proteína de 500 ng/cm², la cual debería producir una mortalidad del 100% excepto para Vip3Ad1, según Ruiz de Escudero et al. (2014).



Figura 10. Bioensayos de *S. littoralis*

RESULTADOS

1- Producción de proteínas

Para comprobar que los procesos de expresión y purificación de las distintas proteínas se habían desarrollado correctamente, durante las diferentes etapas del proceso de producción de las proteínas se recogieron alícuotas que posteriormente se resolvieron en geles de SDS-PAGE. En las figuras 21Figura 11 y Figura 12 se muestran los geles correspondientes a las proteínas Vip3Ag4 y Vip3Aa1, en los que se ve cómo las fracciones “imi” y “des” quedan enriquecidas en una banda de unos 88 kDa, que correspondería con el peso molecular de la protoxina. El resto de las proteínas fueron analizadas de la misma forma obteniendo valores de concentración satisfactorios, aunque no se muestren los geles.



Figura 11. Gel de SDS-PAGE correspondiente al proceso de producción y purificación de la proteína Vip3Ag4. T0: Preinducción. T1: Postinducción. Sobrenadante. Pellet. imi: fracción eluída con imidazol. des: fracción tras el desalado. Albúmina de suero bovina (BSA) a concentraciones de 1, 2 y 3 mg. MM: Marcador molecular.

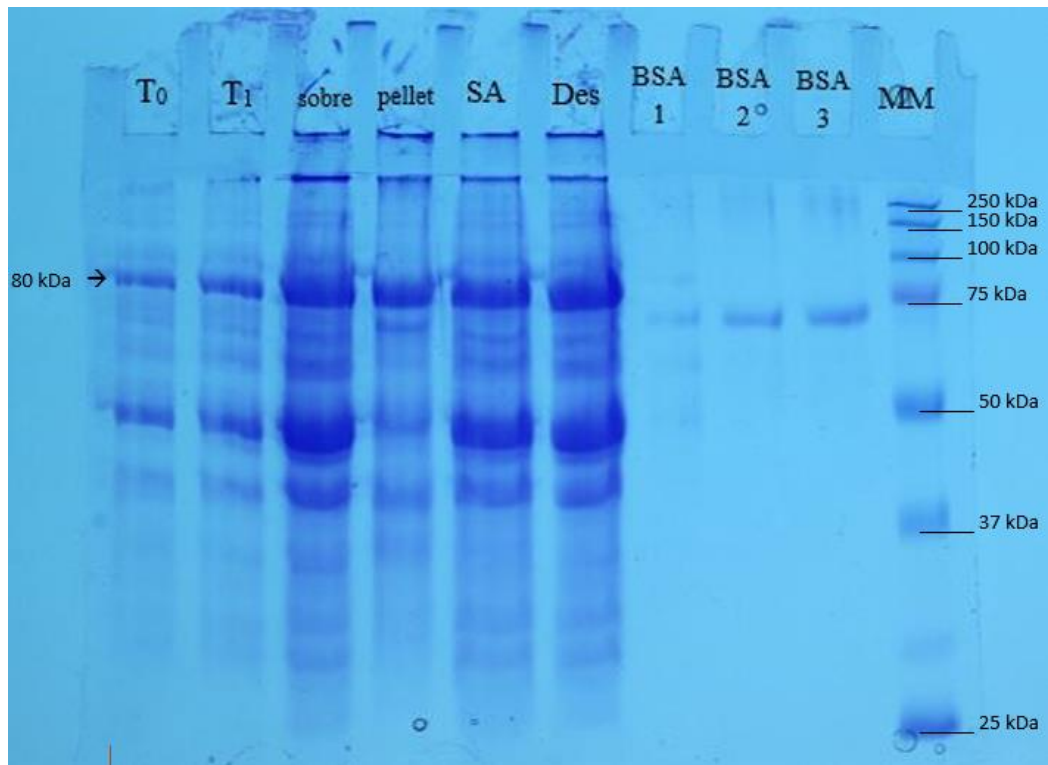


Figura 12. Gel de SDS-PAGE correspondiente al proceso de producción y purificación de la proteína Vip3Aa1. T0: Preinducción. T1: Postinducción. Sobre: Sobrenadante. Pellet. SA: Precipitado en Sulfato de Amonio. Des: fracción tras el desalado en PBS. Albúmina de suero bovina (BSA) a concentraciones de 1, 2 y 3 mg. MM: marcador molecular.

2- Activación de proteínas

Es muy posible que en el tracto digestivo del insecto no se den las condiciones para la digestión y activación de las proteínas, ya sea por falta de enzimas o por un pH desfavorable. Por ello, se utilizó tripsina a diferentes concentraciones y tiempos a 37°C para simular esta activación de forma artificial. Una pequeña cantidad de estas pruebas de activación fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE. Observando el tamaño y densidad de las bandas se trató de buscar un equilibrio entre la completa activación de la protoxina y la conservación de la toxina intacta (Figura 13). Así se determinó que las mejores condiciones de activación al cabo de un tiempo de 2 horas eran manteniendo una proporción tripsina:proteína desde 1:100 hasta 1:25, dependiendo de cada proteína (Tabla 2). También se comprobó que para las proteínas Vip3A, como se muestra en la Figura 13, el peso molecular de la proteína activada con tripsina es de unos 65 kDa, frente a las 88 kDa de la proteína original. Una vez puestas a punto las condiciones de activación para cada una de las proteínas, se activaron lotes mayores de proteína suficientes para la realización de los bioensayos.

Tabla 2. Condiciones de activación de las proteínas Vip3A

Proteína	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	Proporción Tripsina:proteína
Vip3 Aa45	2	37	1:100
Vip3 Ag4	2	37	1:100
Vip3 Aa1	2	37	1:50
Vip3 Ad2	2	37	1:25
Vip3 Ae1	2	37	1:25

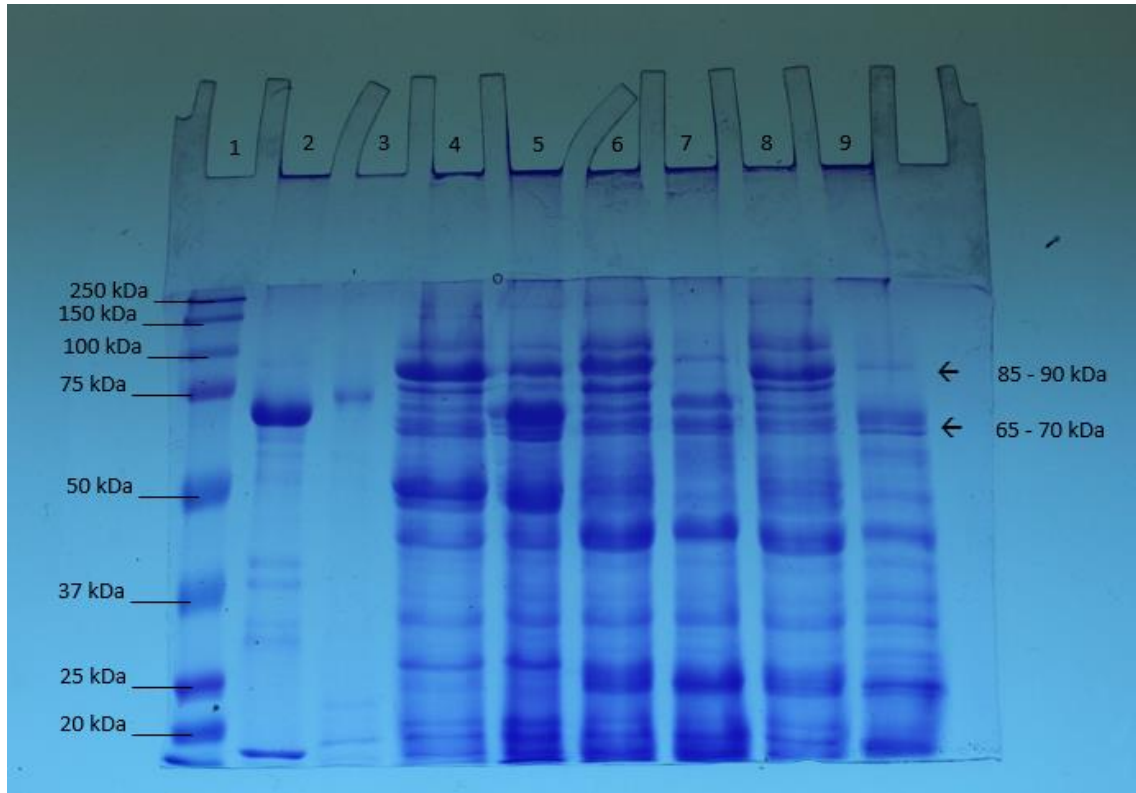


Figura 13. Gel de SDS-PAGE en el que se muestra el resultado de la activación con Tripsina de las proteínas Vip3A utilizadas en los bioensayos. 1: Marcador Molecular. 2: Toxina Vip3Aa45. 3: Toxina Vip3Ag4. 4: Prototoxina Vip3Aa1. 5: Toxina Vip3Aa1. 6: Prototoxina. Vip3Ad2. 7: Toxina Vip3Ad2. 8: Prototoxina Vip3Ae1. 9: Toxina Vip3Ae1

3- Método de bioensayo

La idoneidad de los métodos de bioensayos viene determinada por varios indicadores como el canibalismo, la supervivencia de los insectos en los controles negativos, la cantidad de dieta ingerida o la facilidad de realización. Estos factores se han medido en determinados momentos a lo largo de la puesta a punto del método.

Método 1: Tarrinas de plástico

En el primer método de las tarrinas se untó el borde superior con aceite, como en los tarros de cría, para evitar que las cucarachas pudiesen trepar y escapar, pero pronto se comprobó que quedaban impregnadas del aceite, perdían la movilidad y acababan

muriendo, por lo que se procedió a manejar los insectos en frío y se descartó el uso de aceite en los bioensayos. Otro inconveniente de este método de bioensayo era la rápida evaporación de la solución en algodón, que debía humedecerse unas 3 veces por semana, lo que hacía el método poco cómodo y requería de más trabajo.

En cuanto a la forma en la que se incorpora la toxina en el alimento, todas las descritas en Método y Materiales presentaban algún inconveniente. El método de la proteína en el algodón empapado requería una elevada cantidad de toxina a producir y una administración frecuente. El cubo de manzana sumergido en la proteína fue descartado por el rápido desarrollo de hongos en la superficie de la manzana y por el escaso control sobre la dosis aplicada. Las gotas de Fluorella Blue no mantenían la tensión superficial, por lo que acababan derramándose por todo el fondo del envase. Estos métodos fueron evaluados tanto en los controles positivos de Spinosad (Spintor 48%, Corteva), como en controles negativos con el fin de comparar el volumen ingerido, el canibalismo y la facilidad de manejo, dando por hecho que el canibalismo indicaba una deficiencia en las necesidades alimentarias. Estos resultados se muestran en la Tabla 3, donde se puede observar un canibalismo más acentuado en los tratamientos basados en dieta líquida que en la dieta sólida. Pese a que el pienso desmenuzado parecía la mejor alternativa, seguíamos teniendo problemas como el canibalismo o el control de la cantidad de toxina ingerida.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad según el tipo de bioensayo. Los controles positivos contenían Spinosad. La mortalidad en los controles negativos se debía al canibalismo o a otras causas.

Método 1	Días transcurridos					
	1	3	5	8	10	12
Pienso	0	0	0	0	14	14
Pienso Spinosad 0,5 %	19	62	75	100	100	100
Gota	0	15	19	26	43	59
Gota Spinosad 0,5 %	50	100	100	100	100	100
Manzana	0	0	0	0	43	57
Algodón	0	15	20	30	45	65

Método 2: Individualización en blísteres

El método que individualizaba las cucarachas en blísteres inmediatamente después de recuperarlas de los tarros de cría nos aseguraba el ayuno de las ninfas en el momento de suministrar la toxina, 48 horas después. Sin embargo, se observó que, ante una exposición a la proteína, que inicialmente era de 30 minutos, muchas de las cucarachas no bebían (no estaban azules al observarlas en la lupa) o bebían poca cantidad. Esto, añadido a la ausencia de mortalidad en todos los tratamientos, se decidió prolongar el tiempo de exposición hasta las 2 horas y aumentar la dosis suministrada. De esta manera, se realizaron los tratamientos que se muestran más adelante, en la Tabla 6. Las observaciones posteriores en las placas de pocillos tuvieron que interrumpirse después de dos semanas por la aparición de hongos, lo que daba lugar a unos resultados poco fiables y limitó la efectividad del método. Este proceso permitía controlar muy bien la cantidad

ingerida e impedía el canibalismo, pero era muy laborioso al tener que manipular las cucarachas en dos ocasiones por cada bioensayo.

Método 3: Placa Petri y diluciones en Fluorella Blue

En este método de bioensayo se propuso otra estrategia en la que la exposición a la proteína fuese continua durante todo el tiempo de observación, con un método más simplificado. Pese a agrupar las ninfas en tarrinas o placas en grupos de 10, se contaba con un canibalismo que previsiblemente sería residual. Así mismo, se asumió que un mayor canibalismo significaba una peor disponibilidad de la mezcla administrada, por lo que se plantearon diversos formatos de presentación de la toxina diluida en Fluorella Blue y se midió el volumen ingerido y el canibalismo en cada uno de ellos (Tabla 4).

El volumen medio ingerido por 20 ninfas al cabo de 6 días es de 71 µl en tarrina y de 91 µl en placa Petri, no resultando ninguno de los formatos de administración de la proteína más atractivo que el resto. Por otra parte, la media del canibalismo es del 13% en ambos recipientes. Sin embargo, se observó que en el tapón la mortalidad es mayor porque pueden ahogarse algunas ninfas, mientras que en el vial agujereado puede formarse una burbuja de aire que impida el acceso a la toxina. Por lo tanto, se decidió que la mejor alternativa, en este caso, fue la del vial relleno y abierto horizontalmente, preferiblemente en placa Petri por motivos de espacio y manejo (Figura 7).

Tabla 4. Volumen ingerido y porcentaje de canibalismo en los diferentes formatos de presentación de la proteína después de 6 días. Se realizaron 2 repeticiones por método y 20 ninfas de B. germanica por repetición.

	Método ensayado	Volumen ingerido (µl)	Canibalismo (%)
Placa Petri	Vial abierto	75	10
		70	5
	Vial agujeros	85	5
		45	10
	Tapón	70	45
		80	5
	Tapón algodón	-	10
		-	20
Tarrina	Vial abierto	80	10
		130	0
	Vial agujeros	95	10
		90	5
	Vial vertical	80	15
		65	20
	Tapón	100	5
		90	35
	Tapón algodón	-	20
		-	10

En los bioensayos en los que se emplearon proteínas precipitadas por SA y resuspendidas en PBS, se observó que las ninfas apenas ingerían la solución proteica, por lo que se decidió hacer un cambio de buffer a PBS en una columna de desalado para eliminar al máximo el SA remanente. De esta manera, se vio que el volumen de proteína ingerido fue mucho mayor. Se observó que los individuos de *B. germanica* tampoco bebían de las soluciones que contenían DTT (proteínas producidas en *B. thuringiensis*), hecho que se confirmó con ensayos a diferentes concentraciones y que daban lugar a un mayor canibalismo e inexistencia de deyecciones azules en los de mayor concentración de la sustancia. De los resultados que se facilitan en la Tabla 5 podría decirse que las ninfas de *B. germanica* muestran una aversión hacia el tratamiento con tampón carbonato y DTT al 25% (25 mM) de la cantidad requerida en la solubilización (100 mM), mientras que no existe una tendencia clara hacia el resto de tratamientos, con resultados similares al del control.

Tabla 5. Porcentajes de canibalismo de *B. germanica* frente a distintas concentraciones de tampón carbonato (TCa) y DTT + tampón carbonato, 10 días después del tratamiento. Dos repeticiones por tratamiento, de 20 ninfas de *B. germanica* por repetición.

Tratamiento	Concentración (%)	Canibalismo (%)
C- (H₂O)	-	30
		20
TCa + DTT	25	55
		60
TCa + DTT	10	40
		5
TCa	25	25
		35
TCa	10	25
		20

Aún con plena disponibilidad de sacarosa mezclada con Fluorella Blue, el azúcar no satisfacía las necesidades nutricionales de los insectos (escaso crecimiento) y generalmente se percibió bastante canibalismo, por lo que finalmente se descartó este método de bioensayo en favor del método de la dieta contaminada superficialmente. Con este método no se llevaron a cabo ensayos de supervivencia como tal, pero la mortalidad en los controles negativos de los tratamientos era prácticamente inexistente después de varias semanas, como se muestra en la Tabla 8. Tan solo se dio una mayor mortalidad en el primer tratamiento que se realizó, en el que la cantidad de dieta y humedad fue excesiva y los blísteres se colocaron con la dieta hacia abajo. A partir de este ensayo, los demás fueron realizados como se describe en el apartado “Método y materiales”, con un gran éxito. Además, la velocidad de desarrollo de las ninfas fue muy superior a la de todos los métodos anteriores, lo que se asocia a un mayor consumo de la dieta y, por lo tanto, de la proteína. Por todo ello, se validó como el método más fiable y con el que se ensayarían los tratamientos en adelante. Además, se intentó ensayar las proteínas insecticidas con el método de la contaminación superficial de la dieta también sobre individuos adultos de

B. germanica, pero los controles negativos previos a los tratamientos insecticidas mostraron una mortalidad muy elevada después de la primera semana, por lo que se descartó la validez del método para los estadios más avanzados y se abandonó la idea de realizar los tratamientos en estas condiciones.

4- Actividad de las proteínas de Bt frente a *B. germanica*

La actividad insecticida de las proteínas fue evaluada a lo largo de toda la duración del trabajo, paralelamente a la puesta a punto del método de bioensayos, por lo que los tratamientos fueron realizados con varios de ellos, según el momento en el que la proteína era producida. En las tablas Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 8 se muestran los tratamientos que se llevaron a cabo, ordenados según el método con el que las proteínas fueron ensayadas.

Los bioensayos realizados con el método de la gota reflejaron en general unos datos nulos o muy bajos de mortalidad. Tanto las proteínas individuales Cry1, Cry2, Cry9, Cry32, como la Vip3C mostraron valores de mortalidad menores que los del control negativo, por lo que dicha mortalidad no puede ser atribuida al efecto de la proteína sino a ciertos desajustes en el método de bioensayo, como el frío excesivo para adormilar a las ninfas o su asfixia al quedar empapadas con la gota. Las cepas de *B. thuringiensis* provenientes de productos comerciales también mostraron valores de mortalidad similares al control negativo. Sólo apareció una mortalidad reseñable en el control positivo con Spinosad que al 0,25% mató al 93% de las ninfas ensayadas (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad de ninfas neonatas de *B. germanica* después de 15 días tras recibir el tratamiento mediante el método de la gota y posterior individualización en pocillos con manzana, (SP: Spinosad).

Ninfas neonatas - Método de la gota					
Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)	Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)
C - H ₂ O	-	6	Cry1Ac	1500	0
C + SP	0,25 %	93	Cry1B	1500	0
Bactur	200	6	Cry1D	410	2
Cordalene	1400	6	Cry1Fa	200	4
Dipel	900	9	Cry2A	1500	0
Xentari	1700	5	Cry9E	1500	9
Cry1Aa	1200	0	Cry32	105	0
Cry1Ab	1500	0	Vip3Ca1	350	12

En lo que se refiere a los ensayos de mortalidad con el método de la proteína diluida en Fluorella Blue (Tabla 7), los resultados mostraron de nuevo una baja acción de las proteínas ensayadas. El único tratamiento con una mortalidad elevada (97%) fue el control positivo con Spinosad al 0,25%. Sin embargo, en alguna de las proteínas (Cry1Bb, Cry1Ia7, Cry9A y Cry9C), el porcentaje de mortalidad fue más alto que el de los controles negativos. Al revisar detenidamente los bioensayos se observó un elevado porcentaje de canibalismo entre las mismas cucarachas, promovido por una deficiencia alimentaria.

Esta mortalidad aumentaba de forma considerable después de la primera semana, desde que el contenido del vial era consumido por completo.

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de ninfas neonatas de *B. germanica* después de 7 días tras recibir el tratamiento mediante el método de exposición continua a la toxina diluida en Fluorella Blue (SP: Spinosad).

Ninfas neonatas - Placas con Fluorella en vial						
Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)		Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)
C - H ₂ O	-	15		C + SP	0,25 %	97
Vip3Aa1	1655	5		Cry1Bb	621	20
Vip3Ab1	1309	15		Cry1Ia7	214	30
Vip3Ad2	2375	15		Cry3202	106	15
Vip3Ae1	1729	0		Cry9A	919	30
Vip3Af1	722	5		Cry9C	708	18
ISP3D	3378	10		Cyt1Ca	921	10

Finalmente se testó el lote de 8 proteínas Vip, tanto en su forma de protoxina como en la forma activada con tripsina (toxina). Los bioensayos de las proteínas ensayadas mostraron que ninguna de ellas fue activa contra *B. germanica* (Tabla 8). Así mismo se volvió a ensayar con este método la proteína Cry9C, que de nuevo mostró ser inactiva contra *B. germanica*.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de ninfas neonatas de *B. germanica* después de 15 días tras recibir el tratamiento de protoxinas (pro) y de toxinas (tox) mediante el método de contaminación superficial de la dieta.

Ninfas neonatas - Contaminación superficial de la dieta						
Tratamiento	Concentración (µg/cm ²)	Mortalidad (%)		Tratamiento	Concentración (µg/cm ²)	Mortalidad (%)
Vip3Aa45 pro	27,2	0	--	Vip3Aa45 tox	13,5	0
Vip3Ag4 pro	4,2	0	--	Vip3Ag4 tox	3,8	4
Vip3Aa1 pro	14,4	4	--	Vip3Aa1 tox	14,4	0
Vip3Ab1 pro	9,6	0				
Vip3Ad2 pro	5,3	8	--	Vip3Ad2 tox	5,3	0
Vip3Ae1 pro	16,0	0	--	Vip3Ae1 tox	16,0	0
Vip3Af1 pro	4,8	4				
ISP3D pro	14,4	8				
Cry9C pro	19,2	0		C - PBS	-	1

5- Actividad de las proteínas de Bt frente a *B. dubia*

Los resultados mostraron una mortalidad que fue prácticamente nula en todos los tratamientos, tanto para las ninfas como para los adultos (Tabla 9). Todas las proteínas mostraron valores de mortalidad por debajo del 5% excepto VipAg4, que ofreció valores de mortalidad del 10% para ninfas y para adultos.

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad de adultos y ninfas neonatas de *B. dubia* después de 20 días tras recibir el tratamiento mediante el método de contaminación superficial de la dieta.

NINFAS			ADULTOS		
Tratamiento	Concentración (µg/cm ²)	Mortalidad (%)	Tratamiento	Concentración (µg/cm ²)	Mortalidad (%)
C - PBS	-	0	C - PBS	-	0
Vip3Aa45	3,0	4	Vip3Aa45	3,0	5
Vip3Ag4	3,0	12	Vip3Ag4	3,0	10
Vip3Aa1	3,0	4	Vip3Aa1	3,0	5
Vip3Ab1	3,0	0	Vip3Ab1	3,0	0
Vip3Ad2	3,0	0	Vip3Ad2	3,0	0
Vip3Ae1	3,0	0	Vip3Ae1	3,0	5
Vip3Af1	3,0	4	Vip3Af1	3,0	5
ISP3D	3,0	0	ISP3D	3,0	0

6- Actividad de las proteínas de Bt frente a *Spodoptera littoralis*

Con el objetivo de comprobar el estado de los lotes de proteínas producidas, todas las proteínas Vip3A fueron ensayadas, como protoxinas, a una única concentración contra larvas neonatas de *S. littoralis*. Después de 7 días, todas las proteínas mostraron una elevada actividad a muy bajas concentraciones (500 ng/cm²). La mortalidad fue del 100 % en ambas repeticiones de los tratamientos con Vip3Aa45, Vip3Ag4, Vip3Aa1, Vip3Ab1, Vip3Ae1 y Vip3Af1 (Tabla 10). En el tratamiento con la proteína Vip3Ad2 la mortalidad media fue del 81% y en el de ISP3D, del 44%. En estos dos tratamientos se observó además que las larvas supervivientes eran de un tamaño algo mayor a las neonatas pero muy inferior al de las larvas del tratamiento de control, por lo que, aunque la mortalidad no fue del 100 %, se ve un claro efecto inhibitorio del crecimiento.

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *S. littoralis* después de 7 días tras recibir el tratamiento mediante el método de contaminación superficial de la dieta.

Tratamiento	Concentración (ng/cm²)	Mortalidad (%)
C- (H₂O)	-	0
Vip3Aa45	500	100
Vip3Ag4	500	100
Vip3Aa1	500	100
Vip3Ab1	500	100
Vip3Ad2	500	81
Vip3Ae1	500	100
Vip3Af1	500	100
ISP 3D	500	44

DISCUSIÓN

El número de estudios llevados a cabo hasta la fecha relacionados con la susceptibilidad de cucarachas, y más concretamente, de *B. germanica* frente a *B. thuringiensis*, es muy reducido, y más aún en condiciones reales, fuera del laboratorio. Igualmente existe una disparidad de resultados, muchos de ellos son contradictorios y, por otro lado, en algunos trabajos se oculta parte de la información, como pueden ser los detalles del método de bioensayos o las cepas empleadas. Por un lado, en este trabajo se probaron distintos métodos de bioensayo que trataron de reunir una serie de características como son reproducibilidad, fiabilidad de los resultados, comodidad de manejo... que los hiciera adecuados para la evaluación de la actividad insecticida de proteínas Cry y Vip de *Bacillus thuringiensis*, el otro objetivo del trabajo.

La mayoría de los autores optan por un mismo tipo de metodología. Independientemente del método de cría, los individuos a ensayar, que podían ser adultos o ninfas de cualquier estadio ninfal, eran aislados de los individuos del resto de la población. Con la finalidad de favorecer después una rápida ingestión de la toxina en un determinado tiempo de exposición, las cucarachas solían ser sometidas a un periodo de ayuno que oscilaba entre 24 y 96 horas, sin que aparentemente esto tuviera efectos negativos en su desarrollo o supervivencia (V. Durier & Rivault, 2000; Kaakeh et al., 1997). Esta práctica es muy habitual en el mundo de los ensayos con insectos y muchos autores mantienen unas horas en hambre a las larvas o ninfas antes de someterlas al tratamiento (Sutherland et al., 2003). Nuestros ensayos se llevaron a cabo con ninfas neonatas o adultos, en todos los casos aisladas y mantenidas en hambre durante 48 horas hasta el comienzo del ensayo.

En segundo lugar, varios autores establecen repeticiones de insectos en grupos, habitualmente alrededor de 10 individuos, mantenidos en placas Petri u otros recipientes más voluminosos como jarras de 1 litro (Lonc et al., 1997), normalmente en oscuridad total. La toxina podía ser administrada a través de distintos formatos, bien sea incorporada en la dieta sólida (Richter et al., 1997), en un medio líquido, pulverizado sobre el cuerpo de los insectos o incluso inyectando la mezcla de esporas y cristales de forma intratorácica. En nuestro caso, se probó con distintos recipientes a lo largo de la puesta a punto del método de bioensayo, juntando los insectos en grupos de 10, de 20 o individualizados. No llegamos a aplicar la toxina pulverizada o por vía intratorácica como esporas y cristales, buscando una septicemia, sino solamente como proteína, con su entrada a través del sistema digestivo incorporada en la dieta sólida o en un medio líquido con sacarosa.

Tras un tiempo de exposición variable de entre 30 minutos y 24 horas, se solía retirar la dieta contaminada para proveer a los insectos de dieta sin tratar en cantidad suficiente. A lo largo de las semanas siguientes se recogía la mortalidad, hasta una duración máxima de 31 días (Quesada-Moraga et al., 2004), cuando el bioensayo se daba por concluido. Esto contrasta con la exposición continua del último método de bioensayos evaluado en

el presente trabajo, que fue adoptada para ver si una ingesta más prolongada podía dar lugar a algún efecto de toxicidad.

Por otra parte, el canibalismo detectado en los diferentes bioensayos y que muchas veces llegaba a suponer la principal limitación, es una tendencia común en la especie (Mariño Pedraza, 2011), observada especialmente en aquellas experiencias en las que la fuente de alimento era azucarada. Así, algunos autores (Virginie Durier & Rivault, 1999) afirman que los machos rechazaban alimentarse de glucosa hasta el punto que preferían recurrir al canibalismo o incluso morir de hambre antes que consumirla. En todos nuestros ensayos en los que no se individualizaba a los insectos se observó un canibalismo que solía comenzar a los 2 o 3 días. Coincidiendo con lo que describen estos autores, este fenómeno era más frecuente cuando la toxina se presentaba en medio líquido con sacarosa que en medio sólido y se intensificaba una vez se agotaba la fuente de alimento. Con el fin de evitarlo y obtener unos resultados no alterados por el canibalismo, se optó por la individualización en los posteriores ensayos.

Si bien, la efectividad de las toxinas Vip3A contra *S. littoralis*, fue la esperada como ya se había demostrado previamente (Ruiz de Escudero et al., 2014) con el mismo método de la dieta contaminada superficialmente, demostrando que las proteínas Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ae y Vip3Af resultaban activas con unas LC₅₀ situadas entre 4,0 y 163 ng/cm². Ninguna de las proteínas Cry o Vip empleadas en este trabajo, ya fuera como protoxina o como toxina, mostró efectos letales sobre ninguna de las dos especies de cucarachas. En trabajos previos con distintas especies de cucarachas los resultados de actividad son dispares. En algunas de las investigaciones encontradas se citan resultados positivos en la actividad insecticida de Bt, mientras que en otras ocasiones no se obtuvo ningún efecto tóxico. La patogenicidad de 3 formulados comerciales a base de *B. thuringiensis* fue primero demostrada frente a *B. germanica* por Ulewicz en 1975, sin especificar el clon utilizado, a concentraciones de hasta 14 x 10⁸ esporas/gramo. En 1984, H. L. Lee et al. suministraron durante 20 días un formulado de Bt var. *israelensis* (Bti) mezclado en azúcar a diferentes concentraciones. Las primeras muertes se dieron a los 5 - 7 días y sólo a concentraciones muy altas, por lo que el efecto del Bti no estaba claro, sin descartar el canibalismo como causa de las muertes. Otro estudio realizado en 1985 por Singh & Gill describe los efectos de Bti sobre el sistema nervioso de *Periplaneta americana*. El formulado comercial Dipel fue ensayado a concentraciones desde 0,125 a 1% sobre 1800 individuos de todos los estadios, incorporando la mezcla de esporas y cristales en la dieta (Zukowski, 1993). Después de 9 días la mortalidad fue del 83% en el grupo de Dipel 1%, mientras que para el grupo de control fue del 3,4%. Sin embargo, uno de nuestros tratamientos ensayados mediante el método de la gota contenía Dipel a una concentración de 900 µg/ml, dando lugar a una mortalidad prácticamente nula pasados 15 días. Otro trabajo que podría arrojar alguna pista en la interacción entre cucarachas y Bt podría ser la patente realizada por Payne en 1993, en la que utilizó la proteína Cyt1Ba1. A pesar de que nosotros probamos la proteína Cyt1Ca a una concentración de 921 µg/ml, la mortalidad con esta proteína, muy similar, fue nula.

Lonc et al. (1997) ensayaron hasta 10 aislados del serovar *kurstaki* sobre *B. germanica*, *P. americana* y *Blatta orientalis*, con una mortalidad máxima del 34% a una concentración de $1,6 \times 10^9$ esporas/ml al cabo de 30 días. También hallaron una mayor susceptibilidad de las ninfas neonatas en comparación con estadios más avanzados, lo que concuerda con los resultados de otros autores. Otro estudio más reciente (Fiuza et al., 2017) mostró que los serovares *colmeri*, *yunnanensis*, *huazhangiensis*, *roskildiensis* y *sooncheon* provocaban una baja mortalidad del 6 al 30% en *B. germanica* e inexistente en *P. americana* después de 7 días a una concentración de 1×10^{10} células/ml. Lambiase et al. (1997) mencionan una diferenciación en los sitios de unión de la proteína entre estas dos especies, lo que parece justificar el hecho de que se obtuviera cierta acción sobre la primera y una ausencia de actividad sobre la segunda. En 2018, Zulfiana et al. analizaron el efecto de 3 aislados de *B. thuringiensis*. En este estudio se comparó la actividad de los tratamientos de pulverización con spray con la toxina incorporada en una dieta azucarada semisólida, al cabo de 14 días. Los autores obtuvieron una elevada mortalidad en los tratamientos de pulverización con spray (80%), que es incluso mayor que con la toxina ingerida (6,67%), lo que hace sospechar sobre la veracidad de dichas investigaciones, puesto que la toxina solo actúa por ingestión y no por contacto.

W. Liu et al., (2020), ensayaron la proteína Vip3Aa1 sobre adultos de *B. germanica* y *P. americana*, obteniendo a las 24 horas una DL_{50} de 0,276 y 0,182 mg/ml respectivamente. Este valor de DL_{50} es un valor que cuantitativamente resulta comparable al obtenido por otros autores con otras especies de insectos y proteínas Vip3 de Bt (Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020; Ruiz de Escudero et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados no van en la misma dirección ya que ni la proteína Vip3Aa1 que probamos, ni ninguna de las otras proteínas Vip3 ensayadas mostraron actividad insecticida, aunque suministramos valores de concentraciones mucho más elevados. En nuestros ensayos se probaron 9 tipos de proteínas Vip3 distintas, incluida la propia Vip3Aa1 y otras muy similares como Vip3Aa45. Otros autores han obtenido resultados similares a los nuestros, que apoyan la falta de actividad de Bt frente a *B. germanica*, como los realizados a partir de la mezcla de cristales y esporas de Cry1, Cry2 y Cry5 y en los que no se produjo mortalidad ni cambios sustanciales en el peso de ninfas neonatas de *B. germanica*, *P. americana* y *B. orientalis* después de 25 días (M. Porcar et al., 2006). Estos autores achacan la falta de susceptibilidad a las proteínas Cry a la ineficiente activación de la protoxina o a la falta de receptores específicos en el intestino del insecto. Sin embargo, estos mismos autores sí obtuvieron mortalidad administrando las esporas vía intratorácica en *P. americana* y *B. orientalis*, con una LD_{50} de 100.000 y 34.600 esporas por insecto respectivamente. En este estudio, los resultados en *B. germanica* fueron descartados por una elevada mortalidad en el grupo de control.

Además, en el reciente artículo de Pan & Zhang (2020) se afirma que hasta la actualidad no se ha descubierto ninguna proteína a la que se pueda atribuir mortalidad sobre *B. germanica*, proponiendo como posibles motivos el ambiente ácido en el intestino, con un pH de alrededor de 5,7 (Vinokurov et al., 2007) que no disolvería la proteína o la falta de receptores en las células columnares, las mismas razones que argumentaban M. Porcar et al. (2006) y cuyos resultados irían en concordancia con este trabajo. Sin embargo, sí

existen un mayor número de investigaciones acerca de la susceptibilidad frente a otros bioinsecticidas, con otras bacterias, hongos o nematodos que podrían actuar como agentes de control y cuya utilización parece más prometedora (Pan & Zhang, 2020). Además, la existencia de una rica microbiota que estos insectos hospedan en el tracto intestinal, dificulta la acción de la proteína al actuar en diversos procesos homeostáticos. De esta manera se ha demostrado que la acción combinada de antibióticos y hongos potencia la acción del patógeno a través del intestino (Li et al., 2020), por lo que esta podría ser una vía en la que seguir investigando en la lucha contra esta plaga.

El método de bioensayo desarrollado en este trabajo supone un avance respecto a los utilizados por otros autores hasta el día de hoy al eliminar los problemas derivados del canibalismo y de la falta de ingesta de la proteína, dando lugar a una metodología fácil de reproducir, cómoda en el manejo y cuyos resultados pueden ser más fiables. Por otro lado, existe una bibliografía escasa y dispar sobre la efectividad de Bt frente a *B. germanica*. Algunos de los artículos exponen una inocuidad en los tratamientos con algunas cepas, mientras que otros demuestran la mortalidad que causan otras proteínas, algunas de ellas ensayadas en nuestro trabajo sin apreciarse mortalidad. Se desconocen los motivos de estas diferencias en los resultados obtenidos, pero la utilización de un método más refinado y estandarizado ayudaría a la unificación y fiabilidad de los mismos.

CONCLUSIONES

- El método de bioensayo más adecuado para *B. germanica* y *B. dubia* fue el de contaminación superficial de la dieta, que con una exposición constante a la toxina y teniendo en cuenta la tendencia de *B. germanica* hacia el canibalismo, logró el mayor desarrollo ninfal y la mayor tasa de supervivencia.
- Ninguna de las proteínas Bt a las dosis ensayadas ha resultado tener actividad insecticida frente a *B. germanica* ni a *B. dubia*. Lo cual va en concordancia con muchos de los trabajos previos realizados hasta ahora.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, B. W. (1987). Excretion of viable tubercle bacilli by *Blatta orientalis* (the oriental cockroach) following ingestion of heat-fixed sputum smears: a laboratory investigation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 98–99. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90295-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90295-1)
- Ayayee, P. A., Ondrejch, A., Keeney, G., & Munõz-Garcia, A. (2018). The role of gut microbiota in the regulation of standard metabolic rate in female *Periplaneta americana*. *PeerJ*, 2018(5), e4717. <https://doi.org/10.7717/peerj.4717>
- Barton, K. A., Whiteley, H. R., & Yang, N.-S. (1987). *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. *Plant Physiology*, 85(4), 1103–1109. <https://doi.org/10.1104/pp.85.4.1103>
- Baumann, L., Okamoto, K., Unterman, B. M., Lynch, M. J., & Baumann, P. (1984). Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44(3), 329–341. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(84\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90031-4)
- Bechtel, D. B., & Bulla, L. A. (1982). Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* Sporulation. *Journal of Ultrastructure Research*, 79(2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(82\)90024-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90024-7)
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Pauli, S., Rodgers, P., & Burges, H. D. (1997). Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide Distribution, Characterization, and Activity against Insect Pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(1), 59–68. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4669>
- Bora, R. S., Murty, M. G., Shenbagarathai, R., & Sekar, V. (1994). Introduction of a lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 214–222. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.1.214-222.1994>
- BPPRC. (n.d.). Retrieved February 17, 2021, from <https://www.bpprc.org/>
- Bracke, J. W., Cruden, D. L., & Markovetz, A. J. (1978). Effect of metronidazole on the intestinal microflora of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(1), 115–120. <https://doi.org/10.1128/AAC.13.1.115>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bradley, D., Harkey, M. A., Kim, M. K., Biever, K. D., & Bauer, L. S. (1995). The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to Coleopteran and Lepidopteran larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(2), 162–173. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1024>

- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. In *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 41, Issue 7, pp. 423–431). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Caballero, J. (2019). *Identification and quantification of crystal components of Bacillus thuringiensis strains and their contribution to insecticidal activity*. <https://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/36476>
- CABI. (2021). *Blattella germanica* (German cockroach). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/9408>
- Carpenter, J. E. (2002). Comparative environmental impacts of biotechnology-derived and traditional soybean, corn, and cotton crops. Council for Agricultural Science and Technology. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300072314>
- Carrasco, P., Elena Pérez-Cobas, A., Van De Pol, C., Baixeras, J., Moya, A., & Latorre, A. (2014). Succession of the gut microbiota in the cockroach *Blattella germanica* Equal contributors. *International Microbiology*, 17(2), 99–109. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.212>
- Chang, K.-S., Jung, J.-S., Park, C., Lee, H.-I., Lee, W.-G., Lee, D.-K., & Shin, E.-H. (2009). Insecticide susceptibility and resistance of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae) in Seoul, Republic of Korea, 2007. *Entomological Research*, 39(4), 243–247. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00227.x>
- Cheng, D., Guo, Z., Riegler, M., Xi, Z., Liang, G., & Xu, Y. (2017). Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0236-z>
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., & Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 807–813. <https://doi.org/10.1128/membr.62.3.807-813.1998>
- De Maagd, R. A., Bosch, D., & Stiekema, W. (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. In *Trends in Plant Science* (Vol. 4, Issue 1, pp. 9–13). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01356-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01356-9)
- De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. In *Trends in Genetics* (Vol. 17, Issue 4, pp. 193–199). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
- Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., & Caballero, P. (2020). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. *Toxins*, 12(7), 430. <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
- Downes, S., & Mahon, R. (2012). Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia. *GM Crops & Food*, 3(3), 228–234. <https://doi.org/10.4161/gmcr.20194>
- Durier, V., & Rivault, C. (2000). Secondary transmission of toxic baits in German

- cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(2), 434–440. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.434>
- Durier, Virginie, & Rivault, C. (1999). Food bait preference in german cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). 113–119. <https://hal-univ-rennes1.archives-ouvertes.fr/hal-01320256>
- Erwin, T., Reaka-Kudla, M. L., Wilson, D., & Wilson, E. (1997). Biodiversity at its utmost: tropical forest beetles. *Undefined*.
- Feng, Y., Chen, X.-M., Zhao, M., He, Z., Sun, L., Wang, C.-Y., & Ding, W.-F. (2018). Edible insects in China: Utilization and prospects. *Insect Science*, 25(2), 184–198. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12449>
- Ferre, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S., & Peferoen, M. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(12), 5119–5123. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5119>
- Ferré, J., & Van Rie, J. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47(1), 501–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145234>
- Ferré, J., Van Rie, J., & Macintosh, S. C. (2008). Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs* (pp. 41–85). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8373-0_3
- Figuroa, A. (1964). Estudio biológico de la *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera: blattidae). *Acta Agronómica*, 14(1–4), 47–69.
- Fiuza, L. M., Berlitz, D. L., de Oliveira, J. V., & Knaak, N. (2017). *Bacillus thuringiensis*: different targets and interactions. In *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol* (pp. 111–126). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_9
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M. D., Tato, A., & Martínez, R. (1999). Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 42(1), 51–63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(199909\)42:1<51::AID-ARCH6>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(199909)42:1<51::AID-ARCH6>3.0.CO;2-6)
- Gao, Y., Wang, D., Xu, M. L., Shi, S. Sen, & Xiong, J. F. (2018). Toxicological characteristics of edible insects in China: A historical review. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.016>
- Germanica, B., & Díez, M. D. (2013). Efecto Del Metopreno Sobre La Metamorfosis De La Cucaracha . . 0–23.
- González, J. M., & Carlton, B. C. (1984). A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety israelensis. *Plasmid*, 11(1), 28–38. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(84\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0147-619X(84)90004-0)
- Gordon, J. R. (2020). Urban entomology highlights from 2019 help create integrated pest management plans. *Journal of Medical Entomology*, 57(5), 1342–1348.

<https://doi.org/10.1093/jme/tjaa121>

- Graczyk, T. K., Knight, R., & Tamang, L. (2005). Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 18, Issue 1, pp. 128–132). <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.128-132.2005>
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium 123. *Journal of Economic Entomology*, 69(4), 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Guzman, J., & Vilcinskas, A. (2020). Bacteria associated with cockroaches: health risk or biotechnological opportunity? In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 24, pp. 10369–10387). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10973-6>
- Haider, M. Z., KNOWLES, B. H., & ELLAR, D. J. (1986). Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry*, 156(3), 531–540. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09612.x>
- Herrero, S., Oppert, B., & Ferré, J. (2001). Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal Moth. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1085–1089. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1085-1089.2001>
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. In *Bioengineered Bugs* (Vol. 1, Issue 1, pp. 31–50). Bioeng Bugs. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- Ignoffo, C. M. (1992). Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *The Florida Entomologist*, 75(4), 516. <https://doi.org/10.2307/3496133>
- Ignoffo, Carlo M., & Garcia, C. (1978). Uv-Photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation 2. *Environmental Entomology*, 7(2), 270–272. <https://doi.org/10.1093/ee/7.2.270>
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferré, J., & Caballero, P. (1998). Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(1), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80012-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80012-X)
- James, C. (2018). Global status of commercialized biotech/gm crops in 2018: biotech crops continue to help meet the challenges of increased population and climate change.
- Jaquet, F., Hütter, R., & Lüthy, P. (1987). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-Endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3), 500–504. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.3.500-504.1987>
- Jensen, K., Ko, A. E., Schal, C., & Silverman, J. (2016). Insecticide resistance and nutrition interactively shape life-history parameters in German cockroaches. *Scientific Reports*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep28731>
- Kaakeh, W., Reid, B. L., Bohnert, T. J., & Bennett, G. W. (1997). Toxicity of Imidacloprid in the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the

- synergism between Imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes). *Journal of Economic Entomology*, 90(2), 473–482. <https://doi.org/10.1093/jee/90.2.473>
- Kain, W., Song, X., Janmaat, A. F., Zhao, J. Z., Myers, J., Shelton, A. M., & Wang, P. (2015). Resistance of *Trichoplusia ni* populations selected by *Bacillus thuringiensis* sprays to cotton plants expressing pyramided *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1884–1890. <https://doi.org/10.1128/AEM.03382-14>
- Kassiri, H., Zarrin, M., & Veys-Behbahani, R. (2018). Pathogenic fungal species associated with digestive system of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) trapped from residential dwellings in Ahvaz City, Southwestern Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12(1), 16–23.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200231109>
- Knowles, B. H., & Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *BBA - General Subjects*, 924(3), 509–518. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(87\)90167-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(87)90167-X)
- Kuo, W. S., & Chak, K. F. (1996). Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4).
- Lambiase, S., Grigolo, A., Laudani, U., Sacchi, L., & Baccetti, B. (1997). Pattern of bacteriocyte formation in *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blattidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 26(1), 9–19. [https://doi.org/10.1016/S0020-7322\(97\)88103-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7322(97)88103-2)
- Lee, H. L., Loong, K. P., & Cheong, W. H. (1984). Laboratory studies on the susceptibility of *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 15(3), 422–423.
- Lee, M. K., Miles, P., & Chen, J. S. (2006). Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(4), 1043–1047. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.112>
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., & Chen, J. S. (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4648–4657. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003>
- Leshan Wannigama, D., Dwivedi, R., & Zahraei-Ramazani, A. (2013). Prevalence and antibiotic resistance of gram-negative pathogenic bacteria species isolated from *Periplaneta americana* and *Blattella germanica* in Varanasi, India. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 8(1), 10–20. <http://jad.tums.ac.ir>
- Li, Y., Schal, C., Pan, X., Huang, Y., & Zhang, F. (2020). Effects of antibiotics on the

- dynamic balance of bacteria and fungi in the gut of the German Cockroach. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2666–2678. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa205>
- Liu, W., Wu, L., Wang, J., Li, X., Jin, X., & Zhu, J. (2020). Activity of Vip3Aa1 against *Periplaneta americana*. *Open Life Sciences*, 15(1), 133–144. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0014>
- Liu, Y. B., & Tabashnik, B. E. (1997). Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1381), 605–610. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0086>
- Lonc, E., Lecadet, M. -M., Lachowicz, T. M., & Panek, E. (1997). Description of *Bacillus thuringiensis wratislaviensis* (H-47), a new serotype originating from Wrocław (Poland), and other soil isolates from the same area. *Letters in Applied Microbiology*, 24(6), 467–473. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00039.x>
- Mariño Pedraza, E. (2011). Fósiles vivientes: Cucarachas. *CONABIO. Biodiversitas*, 97, 6–9. [moz-extension://7be4aad1-8d19-4cec-b138-32e0d9626849/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fwww.fumigacionesbw.com.co%2Fdocumentos%2Fpdf%2FInformacion_cucarachas.pdf](https://www.fumigacionesbw.com.co/documentos/Informacion_cucarachas.pdf)
- Marroquin, L. D., Elyassnia, D., Griffiths, J. S., Feitelson, J. S., & Aroian, R. V. (2000). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 155(4), 1693–1699. [/pmc/articles/PMC1461216/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1461216/)
- Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437–2442. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989>
- Martínez-Ramírez, A. C., Gould, F., & Ferré, J. (1999). Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology*, 9(2), 239–246. <https://doi.org/10.1080/09583159929811>
- McGuire, M. R., & Shasha, B. S. (1990). Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 83(5), 1813–1817. <https://doi.org/10.1093/jee/83.5.1813>
- Mehlo, L., Gahakwa, D., Nghia, P. T., Loc, N. T., Capell, T., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M. R., & Christou, P. (2005). An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7812–7816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502871102>
- Mikesell, P., Ivins, B. E., Ristroph, J. D., & Dreier, T. M. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*, 39(1), 371–376. <https://doi.org/10.1128/iai.39.1.371-376.1983>
- Montada, D., & Guerrero, J. A. (1996). Efectos de 3 formulaciones de insecticidas en el desprendimiento y eclosión de las ootecas de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*.
- Mpuchane, S., Matsheka, I., Gashe, B., Allotey, J., Murindamombe, G., & Mrema, N.

- (2011). Microbiological studies of cockroaches from three localities in Gaborone, Botswana. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 6(2). <https://doi.org/10.4314/ajfand.v6i2.71739>
- Nasirian, H., Ladonni, H., Aboulhassa, M., & Limoe, M. (2011). Susceptibility of Field populations of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae) to Spinosad. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(18), 862–868. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.862.868>
- O'Connor, G. T., & Gold, D. R. (1999). Cockroach allergy and asthma in a 30-year-old man. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 107, Issue 3, pp. 243–247). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107243>
- Oldenburg, M., Latza, U., & Baur, X. (2008). Occupational health risks due to shipboard cockroaches. *Int Arch Occup Environ Health*, 81, 727–734. <https://doi.org/10.1007/s00420-007-0247-3>
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., & McGaughey, W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23473–23476. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23473>
- Osman, G. & El-Ghareeb, (2015). Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a Comprehensive Review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(1), 271–288. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=asx&AN=130682976&site=eds-live>
- Pan, X. Y., & Zhang, F. (2020). Advances in biological control of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). In *Biological Control* (Vol. 142). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104104>
- Payne. (1993). *United States Patent* (19).
- Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., & Fischhoff, D. A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), 3324–3328. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3324>
- Pietri, J. E., & Liang, D. (2018). The links between insect symbionts and insecticide resistance: Causal relationships and physiological tradeoffs. In *Annals of the Entomological Society of America* (Vol. 111, Issue 3, pp. 92–97). Entomological Society of America. <https://doi.org/10.1093/aesa/say009>
- Pietri, J. E., Tiffany, C., & Liang, D. (2018). Disruption of the microbiota affects physiological and evolutionary aspects of insecticide resistance in the German cockroach, an important urban pest. *PLOS ONE*, 13(12), e0207985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207985>
- Porcar, M. (2012). Ecological Mysteries: is *Bacillus thuringiensis* a Real Insect Pathogen? *Bt Research*. <https://doi.org/10.5376/bt.2012.03.0001>
- Porcar, M., Navarro, L., & Jiménez-Peydró, R. (2006). Pathogenicity of intrathoracically administered *Bacillus thuringiensis* spores in *Blatta orientalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.001>

- Porcar, Manuel, & Juárez-Pérez, V. (2003). PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(5), 419–432. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2003.tb00624.x>
- Portnoy, J., Chew, G. L., Phipatanakul, W., Williams, P. B., Grimes, C., Kennedy, K., Matsui, E. C., Miller, J. D., Bernstein, D., Blessing-Moore, J., Cox, L., Khan, D., Lang, D., Nicklas, R., Oppenheimer, J., Randolph, C., Schuller, D., Spector, S., Tilles, S. A., ... Sublett, J. (2013). Environmental assessment and exposure reduction of cockroaches: A practice parameter. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(4). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.061>
- Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, L., Kaplan, H., Lessard, T., & Carey, P. R. (1991). The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochemical Journal*, 273(1), 43–47. <https://doi.org/10.1042/bj2730043>
- Quesada-Moraga, E., Santos-Quirós, R., Valverde-García, P., & Santiago-Álvarez, C. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.07.002>
- Richter, K., Böhm, G.-A., & Kleeberg, H. (1997). Effect of NeemAzal, a natural azadirachtin-containing preparation, on *Periplaneta americana* (L.) (Orthopt., Blattidae). *Journal of Applied Entomology*, 121(1–5), 59–64. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01371.x>
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., & Je, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 547–559). <http://europepmc.org/article/med/18051264>
- Ruiz de Escudero, I. (2006). “*Bacillus thuringiensis*” (Berliner) toxins for the control of lepidopteran pests. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=146039&info=resumen&idioma=SPA>
- Ruiz de Escudero, I., Banyuls, N., Bel, Y., Maeztu, M., Escriche, B., Muñoz, D., Caballero, P., & Ferré, J. (2014). A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 117(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.01.006>
- Saitou, K., FURUHATA, K., KAWAKAMI, Y., & FUKUYAMA, M. (2009). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from cockroaches captured in hospitals in Japan, and their antibiotic susceptibility. *Biocontrol Science*, 14(4), 155–159. <https://doi.org/10.4265/bio.14.155>
- Salehzadeh, A., Tavacol, P., & Mahjub, H. (2007). Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44(2), 105–110.
- Sanchis, V. (2000). Biotechnological improvement of *Bacillus thuringiensis* for agricultural control of insect pests: benefits and ecological implications. In *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application* (pp. 441–459). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7_24

- Sarwar, M. (2010). Some possibilities on the effectiveness of plant powders as grain protectants against cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) Walp (Coleoptera: Bruchidae) infestation in chickpea. *International Journal of Agronomy and Plant Protection*.
- Sarwar, Muhammad. (2013). The inhibitory properties of organic pest control agents against aphid (Aphididae: Homoptera) on Canola *Brassica napus* L. (Brassicaceae) under field environment. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 1(8), 195–201. <https://doi.org/10.12983/ijres-2013-p195-201>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775–806. <https://doi.org/10.1128/mnbr.62.3.775-806.1998>
- Sena, J. A. D., Hernández-Rodríguez, C. S., & Ferré, J. (2009). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2236–2237. <https://doi.org/10.1128/AEM.02342-08>
- Sharawi, S., Mahyoub, J., & Assagaf, A. (2019). Laboratory evaluation of toxicity of spinosad tablets and tracer 48 SC insecticides against different stages of American cockroaches (*Periplaneta americana* L.), in Jeddah governorate. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 021–029. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.6.1.0163>
- Sheih, A., Parks, W. C., & Ziegler, S. F. (2017). GM-CSF produced by the airway epithelium is required for sensitization to cockroach allergen. *Mucosal Immunology*, 10(3), 705–715. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.90>
- Singh, G. J. P., & Gill, S. S. (1985). Myotoxic and neurotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal toxin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 24(3), 406–414. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(85\)90153-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(85)90153-1)
- Soltani, A., Vatandoost, H., Oshaghi, M. A., Enayati, A. A., & Chavshin, A. R. (2017). The role of midgut symbiotic bacteria in resistance of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) to organophosphate insecticides. *Pathogens and Global Health*, 111(6), 289–296. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1356052>
- Stewart, G. S., Johnstone, K., Hagelberg, E., & Ellar, D. J. (1981). Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *The Biochemical Journal*, 198(1), 101–106. <https://doi.org/10.1042/bj1980101>
- Strand, M. A., & Brooks, M. A. (1977). Pathogens of Blattidae (cockroaches). *Bulletin of the World Health Organization*, 55 Suppl 1(Suppl 1), 289–296. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2366773/>
- Sutherland, P. W., Harris, M. O., & Markwick, N. P. (2003). Effects of starvation and the *Bacillus thuringiensis* endotoxin Cry1Ac on the midgut cells, feeding behavior, and growth of Lightbrown Apple Moth larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 96(3), 250–264. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2003\)096\[0250:EOSATB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0250:EOSATB]2.0.CO;2)
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N., & Johnson, M. W. (1990). Field

- Development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(5), 1671–1676. <https://doi.org/10.1093/jee/83.5.1671>
- Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Siegfried, B. D., Rangasamy, M., Yang, Y., Wu, Y., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Bravo, A., & Soberón, M. (2011). Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology*, 29(12), 1128–1131. <https://doi.org/10.1038/nbt.1988>
- Tang, Q., Bourguignon, T., Willenmse, L., Coninck, E. De, & Theodore Evans, Q. (2019). Global spread of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Biological Invasions*, 21, 693–707. <https://doi.org/10.1007/s10530>
- Thompson. (1994). *United States Patent (19)*.
- Toda, T. (1923). *CHOLERA AND THE SHIP "COCKROACH."* 21(4), 359–361.
- Tsai, C.-W., & Lee, H.-J. (2001). Analysis of Specific Adaptation to a Domicile Habitat: A Comparative Study of Two Closely Related Cockroach Species. *Journal of Medical Entomology*, 38(2), 245–252. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.245>
- Ulewicz, K. (1975). Studies on the infection of the cockroaches (*Blattella germanica* [L.]) with *Bac. thuringiensis*. *Zentralblatt Fur Bakteriologie. Hygiene. Krankenhaushygiene Betriebshygiene Praventive Medizin - Abt. 1 Orig. B*, 160(4–5), 534–539. <https://europepmc.org/article/med/1189795>
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Montagu, M. Van, & Leemans, J. (1988). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328(6125), 33–37. <https://doi.org/10.1038/328033a0>
- van Frankenhuyzen, K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. In *Journal of Invertebrate Pathology* (Vol. 114, Issue 1, pp. 76–85). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D., & Van Mellaert, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 247(4938), 72–74. <https://doi.org/10.1126/science.2294593>
- Vinokurov, K., Taranushenko, Y., Krishnan, N., & Sehna, F. (2007). Proteinase, amylase, and proteinase-inhibitor activities in the gut of six cockroach species. *Journal of Insect Physiology*, 53, 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.02.019>
- Whalon, M. E., & Wingerd, B. A. (2003). Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4), 200–211. <https://doi.org/10.1002/arch.10117>
- Willis, E. R., & Lewis, N. (1957). The Longevity of Starved Cockroaches1. *Journal of Economic Entomology*, 50(4), 438–440. <https://doi.org/10.1093/jee/50.4.438>
- Wu, X., & Appel, A. G. (2017). Insecticide resistance of several field-collected *German Cockroach* (Dictyoptera: Blattellidae) Strains. *Journal of Economic Entomology*, 110(3), 1203–1209. <https://doi.org/10.1093/jee/tox072>
- Yamamoto, T. (2001). One hundred years of *Bacillus thuringiensis* research and development: Discovery to transgenic crops. *Journal of Sericultural Science of*

- Japan*, 70(1), 1–23. <https://doi.org/10.11416/jibs2001.70.1>
- Yang, C. L., Zhu, H. Y., & Zhang, F. (2019). Comparative proteomics analysis between the short-term stress and long-term adaptation of the *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) in response to Beta-Cypermethrin. *Journal of Economic Entomology*, 112(3), 1396–1402. <https://doi.org/10.1093/jee/toz047>
- Yang, W., He, K., Zhang, J., & Guo, S. (2012). pH-Controlled *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin loading and release from polyelectrolyte microcapsules. *PLoS ONE*, 7(9), e45233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045233>
- Zukowski, K. (1993). Badania laboratoryjne przydatności biopreparatu Dipel w redukcji prusaków (*Blattella germanica* L.). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 44(2–3), 227–230. <https://europepmc.org/article/med/8016546>
- Zulfiana, D., Rini, M. S., Wikantoso, B., & Krishanti, N. P. R. A. (2018). Efficacy test on some entomopathogenic bacterial isolates of the *Periplaneta americana* and *Blatella germanica* Cockroaches (Orthoptera) at Laboratory scale. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10(2), 306–312. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v10i2.12934>