



MEDIOS DE CULTIVOS NO CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN

De Bacillus thuringiensis



MEDIOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus* *thuringiensis*

COLECCIÓN RESULTADO DE INVESTIGACIÓN

Primera Edición 2024 Vol. 1

Editorial EIDEC

Sello Editorial EIDEC (978-958-53018)
NIT 900583173-1

Autores

Gino Francesco Olivieri Salas
Pedro José Frago Castilla

ISBN: 978-628-96378-6-1

Formato: Digital PDF (Portable Document Format)

DOI: <https://doi.org/10.34893/b4936-6737-5315-j>

Publicación: Colombia

Fecha Publicación: 30/10/2024

Coordinación Editorial

Escuela Internacional de Negocios y Desarrollo Empresarial de Colombia – EIDEC
Centro de Investigación Científica, Empresarial y Tecnológica de Colombia – CEINCET
Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES

Revisión y pares evaluadores

Centro de Investigación Científica, Empresarial y Tecnológica de Colombia – CEINCET
Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES



Coordinadores editoriales

Paula A. Noguera Zambrano
Editorial EIDEC

Dr. Cesar Augusto Silva Giraldo
Centro de Investigación Científica, Empresarial y Tecnológica de Colombia – CEINCET – Colombia.

Dr. David Andrés Suarez Suarez
Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES – Colombia.

El libro **MEDIOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis***, está publicado bajo la licencia de Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) Internacional (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es>). Esta licencia permite copiar, adaptar, redistribuir y reproducir el material en cualquier medio o formato, con fines no comerciales, dando crédito al autor y fuente original, proporcionando un enlace de la licencia de Creative Commons e indicando si se han realizado cambios.

Licencia: CC BY-NC 4.0.

NOTA EDITORIAL: Las opiniones y los contenidos publicados en el libro **MEDIOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis***, son de responsabilidad exclusiva de los autores; así mismo, éstos se responsabilizarán de obtener el permiso correspondiente para incluir material publicado por parte de la **Editorial EIDEC**.

**MEDIOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES
PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis***

**NON-CONVENTIONAL GROWING MEDIA FOR
PRODUCTION OF *Bacillus thuringiensis*.**

AUTORES

GINO FRANCESCO OLIVIERI SALAS¹

PEDRO JOSE FRAGOSO CASTILLA²

Pares evaluadores: Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad –
REDIEES.³

¹ Universidad Popular del Cesar, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, Valledupar Cesar, Colombia (correo-e: ginoolivieri@unicesar.edu.co)

² Universidad Popular del Cesar, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, Valledupar Cesar, Colombia (correo-e: pedrofragozo@unicesar.edu.co)

³ Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES. www.rediees.org



Índice de contenidos

Índice de Tablas

Tabla 1: desarrollo de esporas en BT (Ibrahim et al., 2010; González - Vázquez et al., 2021)	29
Tabla n°2: Requerimiento nutricional propuestos por autores nacionales e internacionales	30
Tabla n° 3: Principales materiales utilizado en la parte experimental	30
Tabla n°4: Medios de cultivos para bioensayos preliminares.....	33
Tabla n°5: Características morfológicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
Tabla n°6: Características bioquímicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
Tabla n°7: Estandarización del patrón de Mac Farland.	33
Tabla n°8: Comparación de la concentración celular con el patrón de Mac Farland.	33
Tabla n°9: Las características macroscópicas y microscópicas de <i>B thuringiensis</i>	40-41
Tabla n°10: Caracterización bioquímicas de las cepas de <i>B. thuringiensis</i>	41
Tabla n°11: Fermentación de azúcares por <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
Tabla n°12: Biomasa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medios de cultivos preliminares	43
Tabla n°13: Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%	43
Tabla n°14: Comparación de la concentración celular con el patrón de Mac Farland.	50
Tabla n°15: características macroscópicas y microscópicas de la cepa 7.....	53
Tabla n°16: Caracterización bioquímica de <i>B thuringiensis</i>	54
Tabla n°17: Fermentación de azúcares por <i>Bacillus thuringiensis</i>	54

Índice de Figuras

Figura n°1. Ciclo de vida. Tomado (Federici, Park y Sakano 2006)	19
Figura 2 Síntesis de proteínas. Tomado de: (Navarro y Pérez 2014)	30
Figura 3. Espectro de organismos afectados por BT. Tomado de: (Ben 2014)	22
Figura n°4: Representación gráfica de la metodología	36-37
Figura n°5: Tubos falcón 24 horas de incubación	31
Figura n°6: Tubos falcón 48 horas de incubación	33

Índice de Gráficas

Gráfica n°1: Produccion de biomasa de Bacillus thuringensis en los medios de cultivos preliminares	43
Grafica n°2: Cinetica de crecimiento de B thuringiensis en los medios de cultivo	45
Grafica n°3: Crecimiento de las cepas en los medios de cultivo	46
Grafica n°4: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher	48
Grafica n°5: pH de los medios de cultivo preliminares	49
Grafica n°6: Cinética de crecimiento de la cepa 7 en el medio a base de lactosuero	51
Grafica n°7	51
Grafica n°8: Biomasa del medio de cultivo optimizada	52

Medios de cultivo no convencionales para la producción de *Bacillus thuringiensis*

Non-conventional growing media for production of *Bacillus thuringiensis*

Gino Francesco Olivieri Salas⁴, Pedro José Fragozo Castilla⁵

RESUMEN

Este estudio tiene como objetivo contribuir al desarrollo de nuevos medios de cultivo naturales o complejos de bajo costo, elaborados a partir de residuos industriales, que sean optimizados a nivel de laboratorio para aumentar significativamente la producción de biomasa al proporcionar fuentes mejoradas de carbono, nitrógeno y otros macronutrientes. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es un bacilo Grampositivo esporulado ampliamente utilizado en el 95% de los productos de control biológico a nivel mundial en la gestión integrada de plagas. Se caracteriza por su capacidad para producir proteínas con un alto potencial insecticida, conocidas como proteínas Cry y Cyt, las cuales exhiben una alta especificidad hacia los insectos y una baja toxicidad para los seres humanos y el medio ambiente.

Además, debido al desarrollo de resistencia por parte de los insectos o vectores a los agroquímicos convencionales, se ha observado un aumento en los costos asociados. Sin embargo, en el caso de la producción de Bt, la materia prima se compone de componentes limitados, y los costos asociados representan aproximadamente del 35 al 59% del costo total de producción. Por lo tanto, se llevaron a cabo evaluaciones de 20 medios de cultivo no convencionales utilizando residuos industriales generados en el departamento del Cesar. Para el estudio se utilizaron cinco (5) aislamientos de Bt, provenientes del cepario del Grupo de Investigación Parasitología Agroecología Milenio de la Universidad Popular del Cesar, con seguimiento del conteo de esporas, densidad óptica y biomasa por peso seco durante un período de 144 horas. Los resultados demostraron que el lactosuero y el agua de maíz presentan un alto potencial nutricional en comparación con otros medios, lo que sugiere un mayor rendimiento productivo de Bt a escala industrial.

⁴ Microbiólogo, Maestría en Ciencias Ambientales, Universidad Popular del Cesar, Investigador, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, correo-e: ginoolivieri@unicesar.edu.co.

⁵ Bacteriólogo, magister en ciencia y tecnología de alimentos, Doctor en Medicina Tropical, Docente del programa de microbiología, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, Universidad Popular del Cesar correo-e: pedrofragozo@unicesar.edu.co.

PALABRAS CLAVES: Esporas, proteínas cry, *Bacillus thuringiensis*, lactosuero, control biológico.

ABSTRACT

This study aims to contribute to the development of new low-cost natural or complex culture media, made from industrial waste, that are optimized at the laboratory level to significantly increase biomass production by providing improved sources of carbon, nitrogen and other macronutrients. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a sporulated Gram-positive bacillus widely used in 95% of biological control products worldwide in integrated pest management. It is characterized by its ability to produce proteins with high insecticidal potential, known as Cry and Cyt proteins, which exhibit high specificity towards insects and low toxicity for humans and the environment.

Furthermore, due to the development of resistance by insects or vectors to conventional agrochemicals, an increase in associated costs has been observed. However, in the case of Bt production, the raw material is composed of limited components, and the associated costs represent approximately 35 to 59% of the total production cost. Therefore, evaluations of 20 unconventional culture media were carried out using industrial waste generated in the department of Cesar. For the study, five (5) Bt isolates were used, from the strain collection of the Milenio Agroecology Parasitology Research Group of the Popular University of Cesar, with monitoring of spore count, optical density and biomass by dry weight during a period of 144 hours. . The results demonstrated that corn whey and water have a high nutritional potential compared to other media, suggesting a higher productive yield of Bt on an industrial scale.

KEYWORDS: Spores, cry proteins, *Bacillus thuringiensis*, whey, biological control.

Introducción

Se estima que para el 2050 habrían alrededor de 10 mil millones de personas en el mundo, por lo tanto, es necesario cumplir con las necesidades poblacionales que aumentarán la demanda total de alimentos del 35% al 56% es decir un 21% más de lo que hoy se conoce. Esto a su vez, hace que sea un desafío mantener la seguridad alimentaria mundial con los planes y manejo integrado de plagas que se mantienen en el mercado (Kumari, P., et al. 2022).

Así mismo, una plaga se define como un ser vivo (Animal, planta o microorganismo) que logre aumentar su población a niveles anormales, afectando directa o indirectamente a otras especies (Duarte., 2012). En la agricultura; plagas son todos aquellos organismos patógenos que representan una amenaza para la seguridad alimentaria mundial, con miles de especies como: virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos (Guégan, J.-F., 2023). Por ello, la literatura afirma, que las plagas son un problema para la salud pública al ser vectores de enfermedades tropicales en animales y humanos. (Bebber et al., 2014; Piper, A. M., et al. 2019; Guégan, J.-F., 2023).

Además, en la agricultura las plagas o estresantes bióticos, son los causantes del 25% al 30% de las pérdidas mundiales, que económicamente oscilan entre los \$ 40 mil millones de dólares anuales (Jaiswal, D. K., et al. 2022; Kumari, P., et al. 2022;). Entre estas, se datan la del cereal más cultivado del mundo, estimándose una reducción entre el 16% al 41% de la producción global del cultivo de maíz, representando así una amenaza para la seguridad alimentaria mundial, anclado a miles de especies de virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos (Bebber et al., 2014; Yang, X., et al 2023).

Los insectos representan el 60% de las especies en la tierra, la mitad son herbívoros y dos tercios de las especies, son escarabajos devoradores de hojas (Coleoptera) o las orugas (Lepidoptera), limitando el crecimiento y producción de las plantas, causando enormes pérdidas económicas considerables por el rendimiento de los cultivos cada año. El orden Lepidoptera, incluyen más de 150,000 especies, entre estas están las polillas y mariposas, como especies de insectos más sorprendentes y hermosos, también las plagas más graves en la agricultura mundial (Kanost et al., 2016; Wielkopolan & Obrepalska, 2016; Evangelista, 2024)

Actualmente, se referencia el uso de 5200 millones de libras de pesticidas en todo el mundo (Khan, A. R., et al. 2022). No obstante, el uso de insecticidas químicos brinda muchos beneficios en la agricultura y la salud, como el control de plagas y enfermedades tropicales. Aunque por ser un químico se demostró que sería potencialmente peligroso, afectando la salud humana y la naturaleza (Martínez 1990; Mall, Larsen y Martin 2018). Por tal razón, se afirma que el uso indiscriminado de estos incide directamente en la salud y el ambiente; produciendo efectos negativos en los nichos ecológicos (Puerto y Suárez 2014; Pérez et al., 2022).

Así que, estas malas prácticas durante muchos años ha generado que aproximadamente 500 especies de artrópodos o insectos como *Aedes* sp y *Culex* sp, vectores antropofílico nocturno causantes de enfermedades virales emergentes (Giraldo., et al. 2008; Benelli 2015^a; Jallouli, W., et al 2020), entre las que encontramos dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla, fiebre del valle del Rift, paludismo, encefalitis japonesa, filariasis linfática y fiebre del Nilo occidental, las cuales pueden ser transmitidas a humanos y de un animal a otro (Arenas 2012; Ragavendran, Mariappan, y Natarajan 2017), crean mecanismos de resistencia a más de 2 tipos de insecticida, el cual ha llevado que se aumente la dosis y a su vez los costos (Escobar et al., 2004; Benelli., 2015b; Jallouli, W., et al 2020; Collins, et al., 2022).

De lo anterior, es importante enfatizar, el impacto que ha generado estas actividades antropogénicas, resultando en la persistencia de 20 a 30 años que tienen los agroquímicos en el ambiente y la salud, teniendo comportamientos recalcitrantes, favoreciendo la disrupción endocrina y el desencadenamiento de carcinogénesis (Cheremisinoff, N. P., & Rosenfeld, P. E. 2011; Wang, R., et al. 2021). Ya que, dentro de sus características más relevantes esta su alta insolubilidad en el agua, es decir completamente hidrofóbico, dándole la particularidad de ser volátil y transportarse junto al polvo con el viento (Seong, K. M., et al., 2019; Falakdin, P., et al. 2022).

Swezey et al., en 1983, Señaló que el uso indiscriminado de insecticidas químicos deja trazas, porque en 1967 a Nicaragua no pudo exportar carne a EE. UU por altos índices de Diclorofenil Tricloroetano (DDT). Años anteriores, la Who en 1980 informó sobre los restos de plaguicidas que superaron 42 veces su concentración en leches maternas,

sobrepasando los límites tolerables según la OMS” (Martínez 1990). Además, investigaciones como la de Castro Ramirez, I., et al., en 2022, que encontraron rastros de pesticidas en 88 muestras de sangre de niños en edad escolar de la ciudad de Salamanca, 20 años después del desastre en Tekchem, detectándose heptacloro en el 100% de los niños.

Colombia, debido a su situación geográfica y a las políticas de transición agroecológica, se proyecta como una potencia en el mercado internacional bajo los principios de la sostenibilidad, soportada en la corriente holística para la obtención de alimentos sanos, llegando a competir con países como Brasil (Hoyos, A. M. G. 2021). Y para ello, debe cumplir con los estándares de calidad en el control integrado de plagas, teniendo en cuenta todos los aspectos del cultivo, para mitigar el uso de insecticida sintéticos e implementar nuevos mecanismos amigables con el ecosistema (Castañeda y Consuelo 2016; Nicoletti M. 2020; Hoyos, A. M. G. 2021).

Los bioinsecticidas, son un tipo de plaguicida o agente controlador de plagas, caracterizado por el uso de organismos vivos o productos naturales, y se dividen por la naturaleza de su principio activo en: (i) microorganismos; (ii) bioquímicos; y (iii) semioquímicos (Chandler et al., 2011; Arthurs, S., & Dara, S. K. 2019). Por lo tanto, los grupos microbianos más utilizados como biopesticida son; bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos (Arthurs, S., & Dara, S. K. 2019).

En 1950, el uso de plaguicidas químicos y bioplaguicidas (a base de microorganismos), se le llamó; manejo integrado de plagas (MIP), ya que juntos lograban una interacción positiva más contundente contra el manejo de plagas (Peralta y Palma 2017). No obstante, el uso de plaguicidas químicos puede causar efectos negativos a la salud humana y el medio ambiente (Peralta y Palma 2017; Arthurs, S., & Dara, S. K. 2019).

Los biopesticidas son una alternativa económica y ambiental desde hace más de 60 años, ya que contiene características más selectivas y eficaces tratándose de un controlador biológico de insectos como los lepidópteros, coleópteros, dípteros, entre otros (Argôlo y Loguercio 2014; Martemyanov et al., 2016; Khan, A. R., et al. 2022).

El control biológico, es el uso de organismos benéficos, antagonistas o enemigos naturales para el control de plagas, conocidos como fitopatógenos o parasitoides, entomopatógenos, predadores entre otros, que suelen ser ventajoso porqué; son económico, selectivo y sin efecto negativo para el ser humano o la naturaleza. Logrando el equilibrio del ecosistema (Duarte 2012; Khan, A. R., et al. 2022).

Los microorganismos entomopatógenos son una diversidad de organismos biológicamente microscópicos que debido a sus características infecciosas se utilizan como control biológico (Jaiswal, D. K., et al. 2022). En los cuales, se encuentran los hongos entomopatógenos como: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Arthurs, S., & Dara, S. K. 2019; Bava, R., et al., 2022).

Estos tienen 2 fases, una parasítica y otra saprofítica. La parasítica tienen la capacidad de penetrar a través de la cutícula del insecto, coloniza los tejidos y secreta sustancias tóxicas. En la fase saprofítica el hongo crece fuera del cuerpo del hospedero (Schapovaloff, Angeli, Urrutia y López 2015; Bava, R., et al., 2022).

De los virus se resaltan principalmente los de la familia Baculoviridae incluye los géneros Nucleopolyhedrovirus (NPV), que ataca Lepidópteros e himenópteros); La familia Reoviridae son los virus de la poliedrosis citoplásmica (CPVs), de interés como bioplaguicida porque ataca Lepidópteros y Dípteros) y La familia Poxviridae, que se encuentran clasificados en la subfamilia Entomopoxvirinae, que se caracterizan por formar cuerpo de inclusión (OBs), denominados esferoides, con capacidad de atacar a Lepidópteros y Coleópteros (Cuartas y Villamizar 2016; Arthurs, S., & Dara, S. K. 2019; Reid, S., et al., 2023).

Los nematodos entomopatógenos como: *Heterorhabditis spp.* Poseen 20 especies y Steinernematidae spp. (Rhabditida) aproximadamente 90 especies. En simbiosis con bacterias del género *Xenorhabdus*, son endoparásitos obligados y letales contra insectos, penetrándolos e infectándolos a través de la cutícula, liberando bacterias en el hemocele generándole como resultado la muerte por septicemia (Labaude y Griffin 2018; Půža, V., & Tarasco, E. 2023).

En cuanto a las bacterias, son organismos más ampliamente utilizados en investigaciones de este tipo. Los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* son letalmente potentes en simbiosis con los nematodos. Por otra parte, especies del género *Bacillus* sp son capaces de formar toxinas de carácter proteico y esporas extremadamente virulentas. (Castagnola y Stock., 2014; Noureldeen, A., 2022).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es un bacilo Grampositivo esporulado, caracterizado por su alto potencial insecticida. Desde su descubrimiento en 1902 por Ishiwatta y Berliner en 1911, hasta sus primeros ensayos para el control biológico en 1920, transcurrieron 18 años donde se pudo haber hecho cientos de pruebas y ensayos, en un mundo del cual se conocía poco de su gran espectro insecticida (Rabinovitch et al. 2017; Zhao, X., et al. 2023). Luego en Francia durante 1938 se comercializo el primer insecticida basado en *Bt* para controlar las polillas de la harina de maíz (Ibrahim., et al. 2010; Gu, J., et al. 2021).

En la actualidad, este microorganismo es el más utilizado como bioplaguicida, se encuentra en la mayoría de los productos de control biológico a nivel mundial con valores económicos aproximados a los doscientos once millones de dólares (~211 000 000 USD) (kersh, et al., 2016; Li et al., 2017; Martínez A., et al., 2020). *Bt* permanece enzooticamente en los insectos intensificando su propagación con los cambios ambientales (Fonseca et al., 2013; Gu, J., et al. 2021).

Y su capacidad insecticida varia del tipo de cristal parasporal, que debido al pH alcalino del intestino genera una toxina que rompen la pared intestinal del insecto formando poros, causándole la muerte a un amplio espectro de insectos perjudiciales para los seres humano y para los cultivos (Pathaichindachote, et al., 2013; Vásquez et al., 2015; Biggel, M., et al 2022; Zhao, X., et al 2023).

Estas proteínas insecticidas para el control de plagas, son conocidas como Endotoxinas y exotoxinas (Gomis, Scaramal y Ferré 2018). Estas a su vez, son de alta especificidad para los insectos, y baja toxicidad para los seres humanos, y el ambiente (Palma, Muñoz, Berry, Murillo, y Caballero 2014; Gu, J., et al. 2021). Existen investigaciones donde se informa que la actividad de las proteínas CryA sobre células cancerosas en humanos son positivas. (Garcia et al. 2018; Santos, et al., 2022).

Como se dijo anteriormente, *Bacillus thuringiensis* fue descubierto por Ishiwata entre (1901) y (1902) en Japón, cuando trabajaba sobre las larvas del gusano de seda (*Bombyx morii*) denominandolo *Bacillus sotto*. Luego se le llamó *B. thuringiensis*, cuando fue aislada de larvas enfermas de la polilla *Ephestia kuehniella* entre (1909 y 1915) por Berliner en Turingia Alemania, cuando aún se desconocía la nomenclatura de Ishiwata (Sauka., 2017; Gu, J., et al., 2021; Gonzalez-Vazquez et al., 2021).

No obstante, Mitani y Watari en 1916, demuestran su patogenicidad debido a un filtrado tóxico de toxina preformada en cultivo esporulado. Gallegos (1985). Así mismo, como bioplaguicida lleva más o menos 6 décadas en el mercado y es empleado entre el 90 al 95% de los productos de control biológico a nivel mundial (kersh, et al., 2016; Li et al., 2017; Jallouli, W., et al., 2020).

Macroscópicamente, el género *Bacillus* posee diversa o finitas características coloniales, y esto difiere por el tipo de especie, los componentes del medio de cultivo y otras variables relacionadas a las condiciones de incubación. Así bien, aunque existan estas diferencias, para muchos investigadores las colonias en medio de rutinas son fáciles de reconocer. Sumado a esto, en medios de cultivo como el agar sangre, incubado a 37° C en un rango de 24 a 36 horas, Bt bajo distintas variables, genera características que puedan no considerarse completamente necesarias como típicas de la especie, aunque suelen tener colonias de 1 a 7 mm de diámetro con formas circulares e irregulares de bordes enteros u ondulados, con hemolisis ausente, leve, marcada, parcial o completa, de colonias con texturas mate, granulosa, algodonosa o costrosa, y colores que varían de beige o gris crema a blanquecino, además de pigmentación características de sub-especies como: pigmentos negros, marrones, naranjas, rosados o amarillos, que tienden ser elevadas, efusas y convexas (Tufts J, SD et al., 2014; Logan & Vos, 2015).

Bt posee una distribución cosmopolita, ya que se encuentra presente en: suelo, agua, aire, insectos muertos, mamíferos insectívoros y tejidos humanos en descomposición. (Alva y Vargas 2015; Belousova et al., 2021). Es aeróbica y también crece en anaerobiosis facultativa, a temperaturas con rango entre 10-45°C, en el suelo su

aislamiento esta entre 10^2 y 10^4 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/gr) (Viana et al., 2021).

Microscópicamente es un bacilo Gram positivos, de 1 a 1,2 μm de diámetro por 3 a 5 μm de largo, de borde redondeados, que se encuentran solas, en par o en cadenas cortas, con flagelación períttrica, esporas elipsoidales, centrales no deformes, esporangios que no se extienden de manera evidente y con cristales paraesporales adyacentes con forma bipiramidal, cuboide, esférica, ovoide, plana-rectangular y heteromorfas, la cual se encuentran menos brillantes que las esporas en presencia de luz o en microscopía de contraste de fase, además ostenta un genoma entre $2,4 \times 10^{-6}$ y $5,7 \times 10^{-6}$ pares de bases (pb) (Vázquez et al., 2015; Logan & Vos, 2015; Viana et al., 2021).

Taxonómicamente *Bt* pertenece al reino Eubacteria, filo Firmicutes o Bacillota, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus* y el grupo *Bacillus Cereus* en cuya división se encuentran especies como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* (*Bt*), *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*. Sin embargo, las 3 primeras especies de este grupo para algunos autores son patovares de una misma especie, pero, las diferencias filogenéticas y fenéticas de este grupo solo respaldan su estado genérico (Carrera, 2010; Xu et al., 2014; Logan & Vos, 2015).

En la clasificación de *Bacillus sp*, el análisis molecular para describir diferencias entre estas especies, han sido de gran utilidad, pero se quedan cortos al deducir características genéticamente precisas, como en el caso del análisis de restricción de ADNr amplificado (ARDRA), que es sensible para reconocer nuevos taxones y poco eficiente para hacer distinciones en especies estrechamente relacionadas (Logan & Vos, 2015). Este tipo de problemáticas también se presentan con técnicas de secuenciación del ADNr 16S, que, además, de sesgarse en los resultados de las secuencias internas, también se efectúan en las secuencias adyacentes, ya que son secuencias múltiples de cistrones de ARNr de una sola cepa. Otro de los métodos pocos estudiados para la clasificación de *Bacillus* es el uso de fagos, pero los resultados de estos fagovares por lo general no son similares a los serovares de tipo flagelar H (Logan & Vos, 2015).

De lo anterior se destaca que el género *Bacillus sp*, hoy en día posee más de 90 especies, que se caracterizan por ser quimioheterotrofos, quimioorganotróficos,

quimiolitotrofos facultativos, prototrofos y auxotrofos, además de habilidades fisiológicas que les permite ser psicrófilas, termófilas, acidófilas, alcalófilas, tolerantes a las sales como las halófilas y formadores de endosporas. (Koneman, E. W. 2008; Logan & Vos, 2015).

Hasta la fecha, del género *Bacillus* se habla del poco o nulo potencial patógeno que posee entre sus especies, excepto *B. anthracis* y otras especies que pueden causar infecciones e intoxicación alimentaria. Por otro lado, Bt es una de las especies más representativas de las cinco líneas taxonómica de *Bacillus*, debido a su alta patogenicidad en los invertebrados (Logan & Vos, 2015).

Bt también posee capacidades quitinolíticas, que junto con la liberación de enzimas AHL lactonasa obtiene funciones de biocontrol en el ecosistema, que suelen ser importantes para el control de hongos. Además, esta propuesto en la agricultura sostenible como un biofertilizante, al tener características de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), antagonista y productor de sideróforos que pueden lograr generar oportunidad, confianza y ecoseguridad (Logan & Vos, 2015; Khan et al., 2022).

De *BT* se ha identificado 69 serotipos, 84 serovares de antígeno flagelar H y 13 grupos subantigenico que tienen actividad insecticida específica posicionándose como uno de los grupos microbianos más seguros conocidos para esta actividad (Argôlo y Loguercio 2014). También conserva más 300 holotipos y 73 familias categorizada (Xu et al., 2014). El cual, en condiciones adversas, espórtula y produce endosporas para sobrevivir durante años, décadas o incluso siglos (Evdokimov et al., 2014; Logan & Vos, 2015).

En su ciclo de vida *BT* tiene dos características importantes: La reproducción que se da a través de fisión binaria y el desarrollo de esporas, el cual se da en siete etapas, tal como aparece en la tabla 1 y Figura 1.

Fases	Etapas	Detalles
I	Formación de filamentos axiales	
II	Formación de tabiques paraesporal	

III	Engrosamiento de tabiques paraesporal	Primera aparición de cristales paraesporales y formación de una preespora
IV	Formación de esporas	Pared celular primordial, corteza y capas de esporas acompañadas por la transformación del nucleóide de la espora.
V		
VI		
VII	Maduración de esporas y lisis celular	Liberación de espora y cristal paraesporales

Tabla 1: desarrollo de esporas en *BT* (Ibrahim et al., 2010; González - Vázquez et al., 2021).

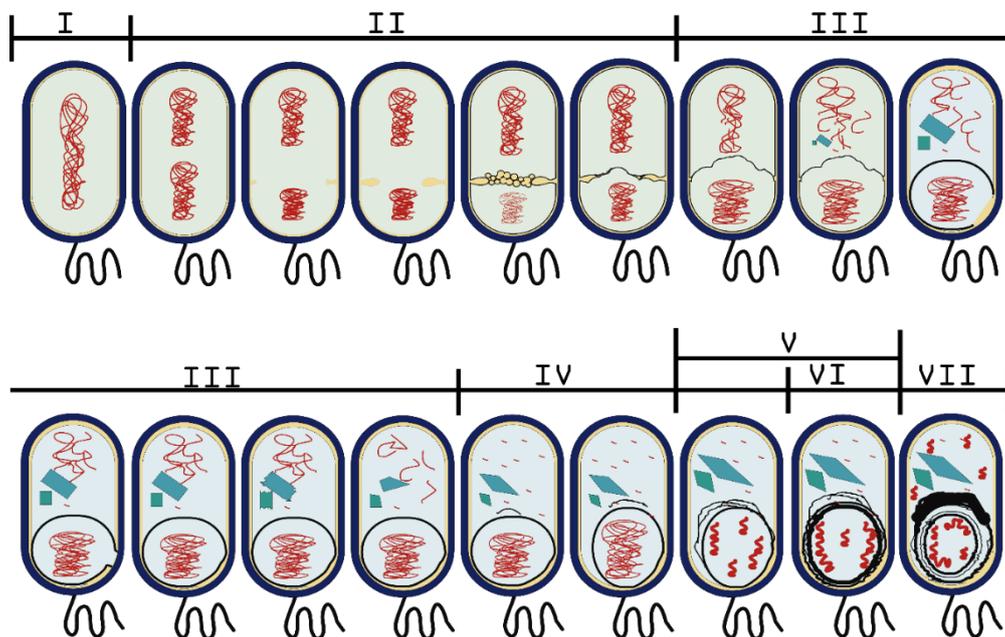


Figura #1. Ciclo de vida. Tomado (Federici, Park y Sakano 2006).

Durante la esporulación, *BT* produce grandes cantidades de cuerpos de inclusión paraesporal que puede tener el 40% del peso seco de una célula esporulada (Tetreau et al., 2021). Una proteína cristalina nociva para larvas de insectos o especies de otros phylum (Palma *et al.*, 2014). Los cristales se componen de glicoproteína δ -endotoxina, una proteína grande de 130 - 140 Kda, normalmente insoluble que se activa cuando es ingerida y hace contacto con las proteasas del intestino medio de los insectos. Obviamente, esto sólo se lleva a cabo cuando los cristales se disuelven a un pH mayor o igual a 10, similar al pH de los intestinos de los insectos, favoreciendo así su especificidad en el hospedador (Saldaña, Blas y Muro 2014; Xiao, Y., & Wu, K., 2019; Tetreau, G., et al., 2021).

Sin embargo, la producción de cristales proteicos parasporal, llamado delta – endotoxinas inicia con la acumulación y degradación del PHB (poli-β-hidroxibutirato) en ausencia de elementos nutricionales esenciales, durante el proceso de esporulación en el ciclo γ-aminobutírico de la fase estacionaria; Logrando ayudar a estabilizar las proteínas para su proceso de cristalización (Bernhard, 1986). En contraste con, Wang *et al.*, (2016), los cuales afirman, que no se encuentra una correlación específica entre la acumulación de PHB, con la esporulación y la formación de cristales paraesporales.

En consecuencia, el proceso de esporulación se activa cuando *Bt* toma la ruta metabólica del ácido tricarboxílico en la fase vegetativa o muerte (Navarro y Pérez 2014). No obstante, durante las fases de crecimiento y muerte de las células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), se activa un proceso crucial para la formación de esporas, donde la regulación de genes específicos, como el operón del ciclo 2-metilcitrato, juega un papel muy importante. Aunque factores de transcripción como cCPa, aBrB y ccPC afectan la expresión génica de este operón durante estas etapas, se afirma su implicación directa sobre el proceso de esporulación, lo que subraya la importancia de comprender mecanismos moleculares para mejorar el control de la producción de esporas, con amplias implicaciones en biotecnología y agricultura (Zheng *et al.*, 2020).

Por lo tanto, de la figura #2 se afirma, que, desde la fase estacionaria hasta la fase vegetativa o muerte, se inicia la síntesis de proteínas insecticidas para el control de plagas conocidas como; δ-endotoxinas, la cual se divide en: Endotoxinas (Cry y Cyt) y Exotoxinas (Vip, SIP, Mtx y Bin) (Gomis *et al.*, 2018; Liu, L., *et al.*, 2021). También se debe agregar que, las Cry se sintetizan durante la fase de esporulación, las Vip 3 (Pinos, D., *et al.*, 2021).

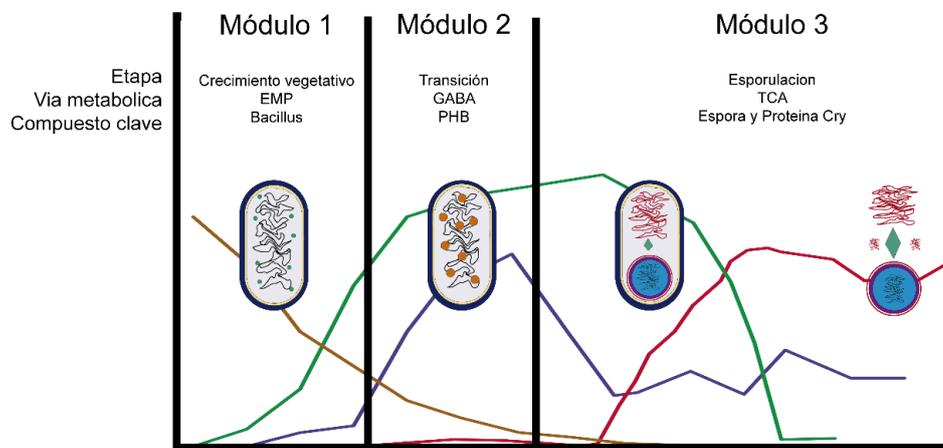


Figura # 2. Embedded-Meyerhof-Parnas (EMP), ciclo γ-aminobutírico de transición (GABA) y ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). PHB — Espora — Bacillus — Glucosa — PHB
 1Figura 2 Síntesis de proteínas. Tomado de: (Navarro y Pérez 2014).

Estos cristales parasporales son altamente tóxicas contra insectos de los órdenes; Lepidóptera (polillas y mariposas), Díptera (moscas y mosquitos), Coleóptera (escarabajos) e Himenóptera (abejas y avispas), en menor medida son afectados los órdenes Homóptera (cigarras, pulgones y cochinillas) y Mallophaga (piojos). Como está en la figura #3 (Romero et al., 2017; Domínguez A., et al., 2020). Y pueden actuar sinérgicamente con algunos metabolitos como; quitinasas, acil-homoserina lactona lactonasa, lipopéptidos y ciertos antibióticos (Djenane *et al.*, 2017; Martínez A., et al., 2020).

Desde 1981 cuando Schnepf y Whiteley hizo la identificación y clonación del primer gen de la proteína Cry *BT* ha tenido gran impacto comercial; ya que ahora se conocen más de 700 secuencias del gen, con al menos 78 grupos, 53 subgrupos, y más de 200 miembros dividido en 3 subfamilias o dominios como las mosquitocidas (Etx_Mtx2), las Toxin_10 y las alfa-helicoidales (Palma, *et al.*, 2014; Domínguez A., et al., 2020).

Las proteínas Cry se han convertido en un gran dominio en el control biológico de plagas con actividad ante un diverso orden de insectos o una amplia gama de invertebrados. Además, existen investigaciones donde se informa la actividad de las proteínas CryA sobre células cancerosas en humanos (García *et al.*, 2018).

Las toxinas Cry y Cyt hacen parte del grupo de toxinas formadoras de poros (PFT). De los cuales existen dos grupos: (i) las toxinas α -helicoidales, que forman el poro transmembranal, y (ii) las toxinas de barril β , que se insertan en la membrana (Bravo, Gill, y Soberón 2007). Estas a su vez poseen actividad tóxica contra una amplia gama de insectos como: Díptera: (Tabanidae, Tephritidae, Nematocera, Sciaridae y Platystomatidae); Hemiptera: (Aphidoidea); Homoptera: (Aphididae); Lepidoptera: (Noctuidae, Plutellidae). Coleoptera, Hymenoptera, Rhabditida, Gastropoda. Como está en la figura #3. También; Nematodo de nudo de raíz, *Meloidogyne incognita* en cebada y especies de trematodos, *Schistosoma mansoni* y *Trichobilharzia szidati* (Trematoda: Schistosomatidae) como aparece en la figura # 3 (Ben 2014).

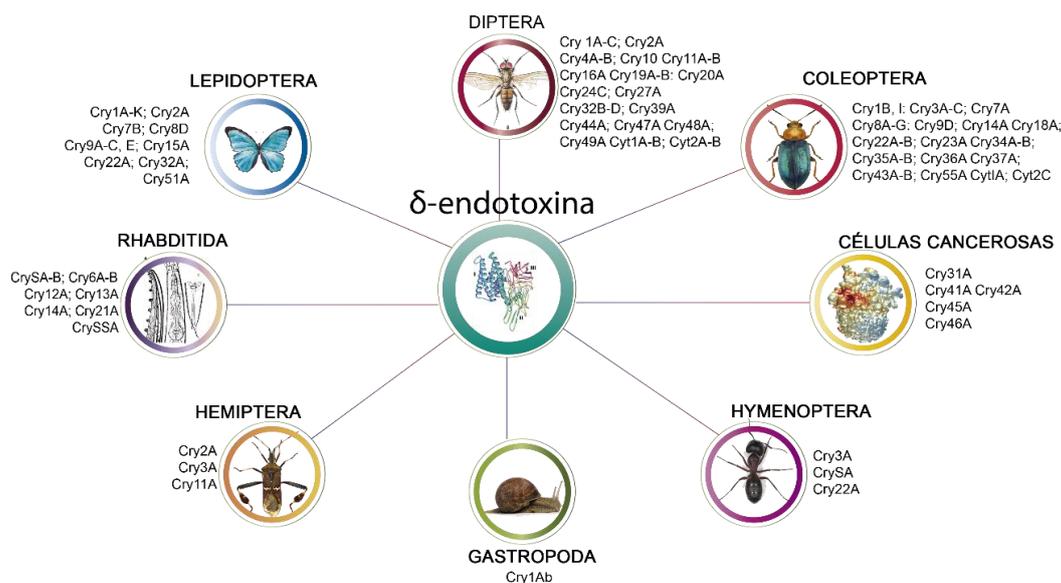


Figura #3. Vista resumida que muestra el espectro del huésped conocido de Bt δ -endotoxinas (Cry y Cyt)
 Figura 3. Espectro de organismos afectados por BT. Tomado de: (Ben 2014).

Hasta la fecha, se han identificado más de 30 toxinas Cyt. Pathaichindachote et al., (2013). Las proteínas Cyt se dividen en tres familias diferentes (Cyt1, Cyt2 y Cyt3) con actividad tóxica contra insectos como: Diptera, Lepidoptera y Coleoptera. Por otra parte, las Cyt2C tienen actividad contra nematodos. Más aún, las proteínas Cyt, tienen la capacidad de reducir los niveles de resistencia de los insectos al sinergizar la actividad insecticida de otras toxinas Cry o Vip3 (Palma *et al.*, 2014).

Por la similitud de aminoácidos, el grupo de las proteínas Vip se clasifican en: Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4. Donde las proteínas Vip1 y Vip2 poseen alta actividad insecticida contra algunos coleópteros e insectos chupadores de savia (Hemíptero), Las proteínas Vip3 tienen actividad insecticida contra lepidópteros, se sintetizan y secretan en la fase vegetativa bacteriana (Pinos, D., et al., 2021). Las proteínas Vip4 tienen hospedador desconocido hasta la fecha (Palma *et al.*, 2014).

Las proteínas Sip, secretadas por *B. thuringiensis*, son la única toxina con alta letalidad demostrada contra larvas de coleópteros como: *Tenebrionidae* y *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: *Chrysomelidae*). E inhibe el crecimiento de *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: *Chrysomelidae*) y *D. virgifera virgifera* (Palma *et al.* 2014).

Las toxinas Bin y Mtx, muestran toxicidad contra lepidópteros, hemíptero, dípteros, nematodos (parásitos humanos y animales, y vida libre; Rhabditida) y algunos caracoles (Palma et al (2014). Además, por su similitud las toxinas binarias (similar a Bin) y similar a mosquitocida (Mtx-like) de *Bacillus thuringiensis* están relacionadas con las toxinas Bin y Mtx de *Sphaericus* (Xu et al., 2014).

Estas delta-endotoxinas, ofrecen beneficios significativos con respecto a los insecticidas químicos, pero el hecho de que se fumigue directamente sobre los cultivos, presenta muchos contratiempos. Ya que, esta técnica tiene baja estabilidad, se inactiva fácilmente cuando está expuesta a la luz visible, su período de efecto residual es limitado, tiene una baja velocidad de destrucción, además de ser vulnerable a los factores ambientales y del suelo, lo que ha afectado mucho su venta comercial (Xiao, Y., & Wu, K., 2019).

De lo anterior se puede afirmar que, es preferible crear técnicas destacables sobre la producción celular de *Bacillus thuringiensis*, para así poder garantizar su productividad y aplicabilidad directa sobre los cultivos. Ya que dentro de sus ventajas esta la durabilidad y eficacia en campo de hasta 90 días con poca luz solar; y permanecer en larvas muertas hasta la germinación de sus esporas (Viana et al., 2021).

No obstante, sacando provecho de las características morfofisiológicas de Bt al ser estables y amigables con el ambiente, le genera la particularidad de comportarse como una fábrica natural de esporas, la cual en cuyo proceso desencadena simultáneamente la síntesis de delta-endotoxinas (Xiao, Y., & Wu, K., 2019; Tetreau, G., et al., 2021). A sabiendas que este proceso también se puede activar a través de las proteasas presentes en el sistema digestivo de los insectos (Xiao, Y., & Wu, K., 2019).

Debido a su alta demanda en el mercado, grandes industrias en países como china, están en la vanguardia de nuevos productos que en el mercado pueden ser fáciles de adquirir, pero a precios elevados porque su producción es muy costosa ya que muchas veces las materias primas son de nutrientes limitados y los costos representan alrededor del 35 al 59% del costo total de producción (Li, Chen, & Yu 2017). Sumado a esto la falta de metodologías optimizadas con materiales de bajo costo que impliquen la formulación de medios de cultivos (Pineda y Vélez 2018).

Un medio de cultivo es una matriz líquida, sólida o semisólida; compuesta de nutrientes disponibles con factores de crecimiento y componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (Oberhardt et al., 2015). En distintas áreas de la ciencia se utilizan para el aislamiento, mantenimiento, reproducción e identificación, a una temperatura y tiempo determinado por la microbiología del microorganismo (Bomar et al., 2011; Lagier et al., 2015).

Para su clasificación, los medios de cultivo suelen tener diferentes estados físicos: líquidos, semisólidos y sólidos. Y para diferente finalidad: Selectivos, no selectivos, enriquecido y diferenciales. Además pueden clasificarse por su composición, como: Naturales o complejos (Sangre, suelo, frutas, etc.) o medios sintéticos (componentes son extrapuros) (Kiyoshi K., 2014; Yao & Asayama., 2017).

Por otra parte, los medios de cultivo no convencionales son naturales o complejos de bajo costo, que pueden estar compuestos de residuos industriales, optimizado a nivel de laboratorio para que nutrientes como las fuentes de carbono, nitrógeno y los macronutrientes afecten significativamente la producción eficiente de biomasa, proteína, enzimas y esporas (Devidas et al, 2014).

En cuanto a requerimiento nutricional; los microorganismos necesitan condiciones óptimas para una alta producción de metabolitos secundarios. Algunos iones metálicos son cofactores en holoenzimas e influyen en la actividad de las proteínas enzimáticas, modificando los procesos metabólicos de los organismos. Algunos iones metálicos pueden estimular o suprimir la síntesis de estos metabolitos (Liu et al., 2015).

Estudios afirman que entre los minerales como: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeCl_3$ y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. El Mg y el Cu son los metales más importantes para la biosíntesis de toxinas (Liu et al. 2015; Quan et al. 2016). Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^{2+} y Mn^{2+} son fundamentales y esenciales para la producción de toxina. Ennouri, et al. (2017). Así mismo, el Zn y Ca poseen excelentes efectos en la formación de esporas y endotoxinas. Valicente et al., (2010). Por otra parte; la omisión de $FeSO_4$ da como resultado, reducciones en el rendimiento de algunas proteínas Cry en aproximadamente un 50% (Liu et al., 2015).

En Colombia; Escobar et al., En el 2004 hizo un análisis exploratorio para optimizar un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. Escogiendo de diferentes medios de cultivo, uno optimizado para la fermentación de una cepa nativa de *B. thuringiensis*, teniendo en cuenta materias primas y minerales de bajo costo como: Melaza fuente de carbono comúnmente utilizada, jarabe de maíz como fuentes de nitrógeno orgánico, harina de soya (que contiene alrededor de 40% de proteína y 12% de lípidos), el extracto de levadura, caseína, sulfato de amonio como fuente inorgánica de nitrógeno, y micronutrientes como calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio propuesto por Pardo, en el (2003). En la cual se obtuvo rendimientos altos, entre 13 g/L y 16 g/L, a un bajo costo por litro de medio, entre \$600 y \$670.

Ocampo et al., En el 2008 hizo la Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. Midiendo la eficacia de los productos en 60 sumideros por un período de 90 días. De los cuales; 20 con triflumurón, 20 con VectoMax® y 20 sin tratamiento. Como resultado se encontró que los tratados con VectoMax® presentaron diferencias en el promedio de estadios inmaduros en ambas especies. El tratamiento con triflumurón sólo presentó diferencias en los estadios inmaduros de *A. aegypti*. El efecto residual del VectoMax® fue mayor en la época sin lluvias.

Khedher, et al., En el 2013 trabajo en la Aplicación del diseño experimental estadístico para la optimización de la producción de bioinsecticidas por cepa de *Bacillus thuringiensis* sin esporular en medio barato, evaluando los efectos de ocho componentes del medio en la producción de delta-endotoxina utilizando; almidón, soja, NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄ y FeSO₄. Observaron una producción de deltaendotoxina de hasta 50%. En comparación con el medio de producción basal. Determinando que el uso de medios de cultivo baratos, es una buena alternativa para una producción de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*.

Nguyen, et al., En el 2014, trabajo en la optimización de las composiciones de medios de fermentación del lodo de aguas residuales deshidratadas de la manufactura de cerveza para la producción de endotoxina delta *Bacillus thuringiensis* el cual consistió en

la hidrólisis de lodos de aguas residuales con varios subproductos agrícolas como: salvado de arroz (cáscara), harina de soja, harina de maíz) y sales minerales ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; $MnSO_4$; $CaCl_2$; $NaCl$). Determinando que el salvado de arroz y el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$ tienen una influencia significativa en la fermentación optimizada, con un incremento de delta endotoxina del 34% en comparación con un medio no óptimo.

Devidas, et al., En el 2014. Evaluaron diferentes medios de cultivo para la mejora en la producción de bioinsecticidas por *Bacillus thuringiensis* nativo y su aplicación contra larvas de *Aedes aegypti*. Utilizando un medio basal compuesto de 1 L de agua y $NaCl$ (0,25%), Na_2HPO_4 (0,1%), $MgSO_4$ (0,02%) y $MnCl_2$ (0,005%) y (pH 7,2). Con fuentes de carbono y nitrógeno convencionales y no convencionales, como: glucosa, sacarosa, fructosa, almidón de maíz, manitol, pulpa de raíz de remolacha, pulpa de fruta de plátano, extracto de flor mahua y extracto de levadura (0,5%). obteniendo que la producción con guandú y la harina de soja son muy eficaz contra larvas de *Aedes aegypti*. Reduciendo 23 veces el costo de producción utilizando harina de soja. revelando que la producción de bioplaguicidas a partir de medios de prueba es muy económica.

En el 2014. Fernández. et al., En su investigación: Producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* en dos medios de cultivo contra larvas de *Aedes aegypti*. Probó medios de cultivo propuesto por Maldonado-Blanco, en el (2001). llevando a cabo 2 medios de cultivo, uno a base de jarabe de maíz (1%), sólidos de remojo del maíz (1%) y extracto de levadura (1%). El otro con harina de soya (1%), sólidos de remojo del maíz (1%), melaza (1%) y sales minerales. Posteriormente, se obtuvo el complejo espora-cristal según el método de (Dulmage et al. 1970), mediante coprecipitación con lactosa y acetona.

Blas et al., En el 2015 realizó la investigación Naranja de Acridina, obtención de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante y producción de bioinsecticida por fermentación con sanguaza. Aplicando la metodología de producción a gran escala de Abarca et al. (1992), en que: Se utilizó “naranja de acridina” (tetrametilacridina), compuesto orgánico cuya fórmula química es 1-7 (dimetil) (9-amino) antraceno; con un peso molecular de 265 g/mol. Como Agente Mutagénico. Diseñaron y construyeron tres biorreactores tipo tanque cilíndrico aireado agitado (TCAA) de dos litros de capacidad, con un volumen de trabajo de 1,4 L y flujos de aire de 0,5 vvm a 220 rpm de agitación.

Para la obtención del bioinsecticida tomó como referencia un medio de producción a gran escala (Abarca et al. 1992), adicionando sanguaza, previamente diluida al décimo, en reemplazo de la fuente nitrogenada.

Untol et al., En el 2015. Realizo la investigación: Efecto del poder residual de tres formulaciones con *Bacillus thuringiensis* h-14 var. Israelensis cultivado en “sanguaza” sobre el porcentaje de mortalidad en larvas de *aedes aegypti*. Preparó tres formulaciones de Bt con sanguaza de harina de maíz morado, maíz morado - carragenina y carragenina a las concentraciones de 0.5 y 2% de ingrediente activo (i.a.), exponiéndose las larvas de tercer estadio de *A. aegypti* a 0.1g de cada formulación; la mortalidad de larvas se registró mediante observación directa a las 48 horas de aplicados los tratamientos. Posteriormente un lote nuevo de 25 larvas de *A. aegypti* se introdujo en los contenedores a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días post aplicación de las formulaciones.

Castañeda y Consuelo en el 2016. Realizaron la investigación: Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Para evaluar el comportamiento nutricional de todas las cepas bacterianas en estudio, se utilizó Medio Mínimo de Sales MMS: 1.2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.2 g/L K₂HPO₄ y 0.1 g/L KH₂PO₄, ajustado a pH 6,0. El procedimiento para evaluar el crecimiento de los aislamientos UCMC-TB1, UCMC-TB2, UCMC-TB3 y UCMC-TB4 se realizó utilizando espectrofotometría y recuento directo en placa y pruebas de antagonismo dual en placa para evaluar el efecto controlador contra *Fusarium* sp.

Fatin, et al., En el 2016. Investigo sobre; La actividad de entomotoxicidad de *Bacillus thuringiensis* en medio de cultivo de lodos de aguas residuales hacia *Bactrocera dorsalis* y su evaluación histopatológica, utilizando 60% de salvado de trigo con 40% lodos de aguas residuales y el 60% de paja de arroz con 40% lodos de aguas residuales. Obteniendo como resultado que los lodos de aguas residuales semisólidas tienen el potencial de mejorar la actividad de entomotoxicidad de *B. thuringiensis*.

Fuentes de Carbono, nitrógeno y minerales g/L.	Autores											
	Gómez M. (1989).	Dulmage HT (1990).	Abarca C. (1992)	Beltrán L. (1998)	Escobar J. (2004).	Ghribi D. (2005).	Khedher B. (2013).	Fernández G (2014).	Devidas P. (2014).	Navarro A. (2014).	Liu X. (2015).	Pineda C. (2018)
Extracto de flor de Mahua	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
Extracto de Levadura	0,2	2,0	-	3,46	0,1	5	-	10	-	5,8	-	35,4
Carbohidratos	0,5	30	-	30	-	15	40	-	-	-	18	54,1
Harina de soya	-	20	6	-	-	-	35	10	-	35	-	-
Jarabe de Maíz	-	-	-	-	20	-	-	10	-	9,2	-	-
Leche	10	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
Melaza	-	18,6	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-
Pulpa de plátano	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
Pure de tomate	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raíz de remolacha	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
Semilla de algodón	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Licor o Remojo de maíz	-	20	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
(NH4)2SO4	-	-	-	5,88	0,1	5,4	-	-	-	-	-	-
CaCl2	-	0,1	0,056	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-
CaCO3	-	1,0	-	-	-	1	-	1,0	-	-	-	-
CoCl2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,003	-	-
CuSO4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,075	0,0006	0,075
FeSO4	0,02	0,02	0,028	-	0,002	0,01	0,012	0,2	-	0,014	0,02	0,014
K2HPO4	-	-	-	1,029	-	1	1,5	-	-	-	2,5	-
KCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	3,0
KH2PO4	-	-	4,65	1,6	-	1	1,5	-	-	-	-	-
MgSO4	0,3	0,3	0,06	0,563	0,002	0,3	0,4	0,3	0,002	0,002	0,025	0,002
MnSO4	0,02	0,02	0,026	0,0034	0,002	0,01	0,012	0,2	-	0,040	0,02	0,040
MnCl2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0005	-	-	-
Na2HPO4	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-
NaCl	-	-	-	-	-	7	11	-	0,025	-	-	-
ZnSO4	-	0,02	0,014	-	0,002	-	-	0,2	-	7,5	-	7,5

Tabla n°2: Requerimiento nutricional propuestos por autores nacionales e internacionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este es un tipo de estudio descriptivo; porque se va a observar y describir el comportamiento de *Bacillus thuringiensis* en medios de cultivo no convencionales. Con el propósito de, presentar un producto amigable con el ambiente, lo que hace que esté totalmente basado en la línea investigativa de la Bioprospección.

El Área de estudio y localización es en laboratorio del Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio de la facultad de ciencias de la salud en el programa de microbiología donde se aplicaron la mayoría de los exámenes preliminares y el Centro de Investigación para el Desarrollo de la Ingeniería donde se aplicará la producción a escala, dentro de la Universidad Popular del Cesar, sede sabana en la ciudad de Valledupar Cesar (Colombia). Ubicada en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta al margen del río Guatapurí, en los 10° 29' de latitud Norte y 73° 15' de longitud Oeste. Por el Norte limita con los departamentos de Magdalena y la Guajira, por el Sur con los municipios de San Diego, La Paz y el Paso, al éste con la Guajira y los municipios de San Diego y la Paz, por el Oeste con el Magdalena y los municipios de Bosconia y el Copey, con una temperatura 32°C. Además, se caracteriza por la producción ganadera y agrícola.

Materiales

Tabla n° 3: Principales materiales utilizado en la parte experimental

Materiales		
	Nombre	Marca
Equipos	Autoclave	All American
	Balanza analítica	A&D
	Biorreactor	Bioflo 2000
	Cámara de neubauer	Boeco
	Centrífuga	Hettich
	Espectrofotómetro	Thermo scientific
	Estufa	Haceb
	Horno microondas	LG
	Incubadora	Binder
	Microscopio	Scientific
	Potenciómetro	Hach
Shaker	VWR	
Sustratos	Agua residual	
	Cascarilla de arroz	
	Remojo de maíz	
	Lacto suero	

Material biológico

En el presente estudio se emplearon cinco (5) cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. Proporcionado por la Universidad industrial de Santander (UIS) y el Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio de la facultad de ciencias de la salud en Universidad Popular del Cesar, Valledupar.

Patrón de Mac Farland

Este procedimiento se hizo con el fin de estandarizar el preinoculo. En el cual, se prepararon 11 patrones de Mac Farland con un rango de concentración de 0.5 a 10 µl de BaCl₂ al 1% y H₂SO₄ al 1%. Luego se determinó la turbidez o densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nanómetros (Lahuerta & Pérez-Gracia, 2012; Zapata & Ramirez-Arcos, 2015; Lozano et al., 2018).

Recuperación de las cepas de *Bacillus thuringiensis*

Se tomó asépticamente una tirilla conservada e impregnada con *Bacillus thuringiensis* dentro de un tubo eppendorf, se cortó y se agregó en tubos con 3 mililitros (ml) de caldo brain heart infusion (BHI), para luego incubarse a 30°C durante 24 horas (Navarro-Mtz & Pérez-Guevara, 2014; Navarro-Mtz et al., 2019; Cappuccino & Welsh, 2019; Zegeye & Aspholm, 2022).

Verificación y pureza de la cepa

El pre-inóculo con cepas de *B. thuringiensis*, se sembraron en cajas de petri, con agar tripticosa soya (TSA) e incubadas a 30°C durante 48 horas. Culminado el tiempo de incubación se realizaron observaciones de sus características macroscópicas y microscópicas mediante el uso de colorantes que penetran en las paredes de las células como cristal violeta y lugol se ejecuta la tinción de Gram. Así mismo la coloración de estructuras internas como las esporas con vapores de verde de malaquita. Además de su fisiología por medio de pruebas bioquímica como las IMViC (Brock, 1996; Plasencia y Villanueva 2015; Logan & Vos, 2015; Cappuccino & Welsh, 2019).

Estandarización del pre-inóculo

Pasadas las 24 horas de incubación, se tomó una asada de cada tubo y se sembraron por agotamiento en agar tripticasa soya (TSA), se incubaron entre 28 y 30°C durante 72 horas, y luego se estandarizo la concentración celular con los patrones de Mac Farland. Para esto se tomó una colonia de *BT* y se suspendió en tubos con 9 ml de agua destilada estéril, se hicieron diluciones seriadas hasta 10^6 , se determinó el número de células por mililitros con cámara de Neubauer, DO con el espectrofotómetro y posteriormente se inocularon por el método de profundidad en placa con agar (TSA) y se incubaron entre 28 y 30°C durante 18 horas (Zapata & Ramirez-Arcos, 2015; Valtierra et al., 2017; Lozano et al., 2018; Cappuccino & Welsh, 2019).

Medios de cultivos preliminares.

Los ensayos se realizaron en envases de vidrio de 237 ml (8 Oz) de volumen total con 100 ml de volumen de trabajo en relación 1/100 para permitir suficiente aireación (biorreactores a escala piloto de 100 ml) (Blas 2017; Ballardo 2016; García y Villanueva 2016). Teniendo en cuenta lo anterior; Se prepararon cuatro (4) tratamientos (medios de cultivo) utilizando diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono como: Agua residual, cascarilla de arroz, licor de maíz y lactosuero. Además, de una serie de nutrientes y minerales propuestos por Vanderkar y Dulmage en 1983, luego modificado por (Navarro *et al.*, 2014). en la tabla #3.

Inoculación de medios de cultivos

Luego se esterilizaron a 121°C a 15 ATM de presión por 15 min; se inocularon los medios de cultivo con 1000 µl de los pre-inóculos estandarizados a partir de las cepas 2, 7, 9, 11 y 28 de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, proporcionado el Grupo de investigación. Posteriormente, se incubaron a 30°C, en constante agitación orbital de 200 rpm, a un pH ajustó a los 7,2 durante 120 horas. (Navarro et al., 2014; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Bukhari et al., 2022)

Tabla n°4: Medios de cultivos para bioensayos preliminares.

Medios de cultivos para bioensayos preliminares				
Medios	Agua Residual	Cascarilla de arroz	Zumo de maíz	Lacto suero
	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Extracto de Levadura	5.8 g/L	5.8 g/L	5.8 g/L	5.8 g/L
KCl	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L
MgSO4 7H2O	0.2 mg/L	0.2 mg/L	0.2 mg/L	0.2 mg/L
MnSO4	40 mg/L	40 mg/L	40 mg/L	40 mg/L
CaCO3	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
CuSO4 5H2O	7.5 mg/L	7.5 mg/L	7.5 mg/L	7.5 mg/L
ZnSO4 7H2O	7.5 g/L	7.5 g/L	7.5 g/L	7.5 g/L
FeSO4	1.35 mg/L	1.35 mg/L	1.35 mg/L	1.35 mg/L

Tomado de: (Khedher *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014; Khedher *et al.*, 2014; Vázquez *et al.*, 2015; Untol *et al.*, 2015; Salazar *et al.* (2015); Pineda y Vélez 2018) .

Parámetros de producción en cultivos

Asimismo, se realizaron observaciones microscópicas y ópticas diarias con el propósito de verificar esporulación y formación de cristales y lisis celular. Como lo propuso (Beltrán *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2014; Pineda López & Vélez Salas, 2018)

Recuento de esporas

Durante las 120 horas que los medios de cultivo estén en incubación a temperatura controlada entre 28 y 30°C en constante agitación orbital a 250 rpm, y un pH ajustó a los 7,2. Se tomaron alícuotas cada 24 horas, a la que se le determino recuento de esporas en cámara de Neubauer por el método de Breed, utilizando la siguiente fórmula (Navarro *et al.*, 2014; Valtierra *et al.*, 2017; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2019)

$$C = N^{\circ} \text{ esporas-celulas} \times 10^4 \times \text{dil}$$

Donde:

C = Cél/mL

N= Numero de células presentes en 1 mm² (0.1 µL)

Dil= Factor de dilución

Determinación de la biomasa

Pasada las 120 horas de producción, se tomaron 100 ml de cada biorreactor y se centrifugaron a 2000 RPM por 10 minutos, se lavó 2 veces el sedimento. Posteriormente el sedimento se llevó a deshidratación en horno a 105 °C durante un tiempo de 24 horas, obteniéndose biomasa seca en gramos por litro (Avignone 1990; BLAS *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2014).

Producción de cepa y medio de cultivo seleccionado a escala piloto

Luego de conocer el medio de cultivo con mejor rendimiento en la producción de biomasa y esporas. Este se fermento a escala de 1 Litro durante 144 horas en constante agitación, con parámetros como: pH de 7,2, Temperatura a 30 °C, oxígeno, entre otros que genera las condiciones necesarias para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, en un biorreactor proporcionado por el Centro de Investigación para el Desarrollo de la Ingeniería de la universidad popular del cesar (Logan & Vos, 2015; Valtierra *et al.*, 2017; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2019).

Recuento de esporas

Durante las 144 horas que el medio de cultivo estuvo en el biorreactor. Se tomaron alícuota cada 24 horas, a la que se le determinaron recuento de esporas en cámara de Neubauer (Logan & Vos, 2015; Valtierra *et al.*, 2017; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2019).

Determinación de la biomasa

Pasada las 144 horas de producción, se tomaron 100 ml del biorreactor y se centrifugaron a 2000 RPM por 10 minutos, se lavó 2 veces el sedimento con agua destilada estéril. Posteriormente el sedimento se deshidrato en un horno a 105°C durante un tiempo de 24 horas, obteniéndose biomasa seca en gramos por litro (Avignone 1990; BLAS *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2014).

Pureza de cultivo a escala piloto

Culminado el tiempo de incubación se realizaron observaciones de sus características macroscópicas y microscópicas mediante el uso de colorantes que penetran en las paredes de las células como cristal violeta y lugol se ejecuta la tinción de Gram. Así mismo la coloración de estructuras internas como las esporas con vapores de verde de malaquita. Además de su fisiología por medio de pruebas bioquímica como las IMViC (Brock, 1996; Plasencia y Villanueva 2015; Logan & Vos, 2015; Cappuccino & Welsh, 2019). Cuya características microbiológicas será acuerdo a la morfología propuesta en la tabla # 4 y fisiología en la tabla # 5.

Tabla n°5: Características morfológicas de *Bacillus thuringiensis*.

Características morfológicas				
Macroscópica			Microscópica	
AGAR EN SUPERFICIE	Forma Borde Elevación Superficie	Consistencia Color Luz transmitida Luz reflejada	Forma	Bacilos
MEDIO SEMISÓLIDO	Movilidad		Agrupación	Cadenas
CALDO	Turbidez Sedimento Gas Color		Estructuras	Tinción de Gram Tinción de espora

Tomado de: (Narvaéz 2015; Logan & Vos, 2015; Cappuccino & Welsh, 2019).

Tabla n°6: Características bioquímicas de *Bacillus thuringiensis*.

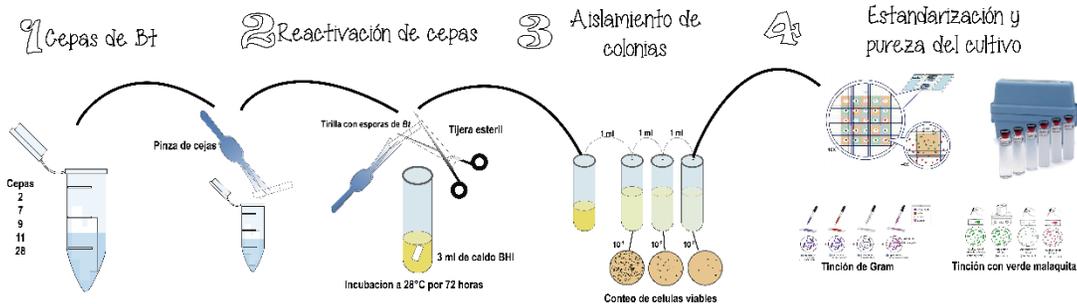
Características bioquímicas	
Sulfuro, indol Motilidad rojo de metilo (prueba MR) Voges-proskeur (Prueba VP) Utilización del citrato Hidrólisis de almidón Gelatina hidrolizada Caseína hidrolítica Prueba Oxidasa Ureasa	Prueba de catalasa Azúcares Glucosa Sacarosa Fructosa Lactosa Xylose Manitol Tres azúcares y hierro (TSI)

Tomado de: (Narvaéz 2015; Logan & Vos, 2015; Dhawan 2018; Cappuccino & Welsh, 2019).

Para el análisis de datos se utilizó el programa Statgraphycs®, en donde se determinó las variables influyentes para la producción de biomasa, con gráficas de superficie de respuesta y gráficas de contornos.

Figura n°4: Representación gráfica de la metodología

A) Preparación y estandarización del pre-inculo de los cultivos de *B. thuringiensis*



B) Preparación, esterilización e inoculación de medios de cultivos preliminares.



C) Determinación de los Parámetros de producción de cepas y medios de cultivos preliminares.



D) Producción de cepa y medio de cultivo seleccionado a escala de 1 Litro.



E) Determinación de los Parámetros de producción de la cepa y medio de cultivos seleccionado

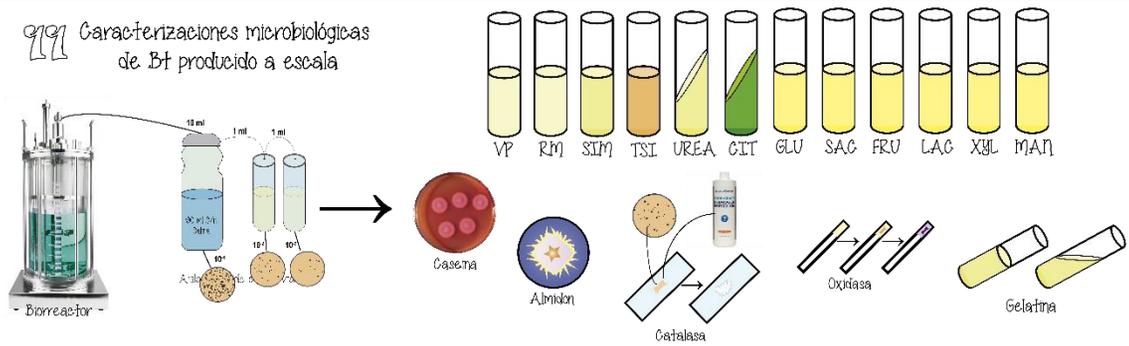
9) Recuento de esporas y densidad optica cada 12 horas

10) Determinación de la biomasa al 72 horas



F) Verificación de la pureza de *B. thuringiensis* producido a escala de 1 Litro

11) Caracterizaciones microbiológicas de *Bt* producido a escala



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* a nivel de laboratorio mediante la cuantificación de esporas.

Patrón de Mac Farland

Se preparó el patrón de Mac Farland para obtener el rango de concentraciones en valores de absorbancias (Abs) y numero celular para luego estandarizar el pre inculo de los medios de cultivo. En la Tabla #6

Tabla n°7: Estandarización del patrón de Mac Farland

N° PATRÓN MAC FARLAND	ABSORBANCIAS PATRÓN	CONCENTRACIÓN PATRÓN cel/ml	ABSORBANCIA OBTENIDA
0.5	0,05	1.5×10^8	0.056
1.0	0.1	3×10^8	0.179
2.0	0.2	6×10^8	0.253
3.0	0.3	9×10^8	0.378
4.0	0.4	12×10^8	0.456
5.0	0.5	15×10^8	0.566
6.0	0.6	18×10^8	0.678
7.0	0.6	21×10^8	0.780
8.0	0.8	24×10^8	0.860
9.0	0.9	27×10^8	0.958
10	1.0	30×10^8	1.150

De la Cruz, Bautista, Jing, & Teves. En el 2015, hicieron algo similar al inocular larvas de *Aedes* y *Culex*. Así mismo, estandarizaron la escala de macfarland estándar en el aislamiento, identificación y evaluación de la entomotoxicidad de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Culicidae*, *Aedes* y *Culex*. Midiendo la mortalidad por dosis de diferentes densidades bacterianas en *Aedes* y *Culex*. Inoculándolos con ayuda de los patrones de turbidez de McFarland 0,5, 1, 2, 3 etc. Obteniendo como resultado densidades bacteriana de 1.5×10^8 , 3×10^8 , 6×10^8 , 9×10^8 cel/ml sucesivamente para indicar la tasa de mortalidad promedio de ambas larvas.

Recuperación de las cepas de *Bacillus thuringiensis*

Para desarrollar este estudio se recuperaron las tirillas con cepa de *Bacillus thuringiensis var israelensis* en tubos falcón de 10ml con 3ml de caldo BHI a una temperatura entre 28 y 30°C, la cual mostró una turbidez progresiva a partir de las 48, como se muestra en la figura 4 y 5

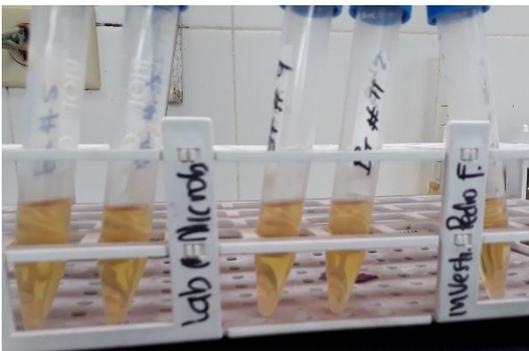


Figura n°5: Tubos falcón 24 horas de incubación

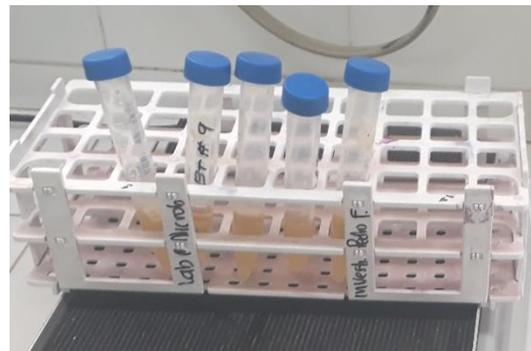


Figura n°6: Tubos falcón 48 horas de incubación

Estandarización del pre-inóculo de los cultivos de *B. thuringiensis*

En la tabla # 7 se indica el número de esporas recuperadas en 1 ml junto con la Abs y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en comparación con el rango de concentración del patrón de Mac Farland. Obteniendo como resultado una aproximación de los tubos 4,5 y 6 de la escala de Mac farland y de los números de esporas por ml con UFC por ml.

Tabla n°8: Comparación de la concentración celular con el patrón de Mac Farland.

Cepa UPCBT	Patrón Mac Farland	Abs patrón Mac Farland	Esporas/ml	UFC/ml
2	4 aproximado	0.510	13.5×10^8	14×10^8
7	4 aproximado	0.540	14.7×10^8	15×10^8
9	4 aproximado	0.446	11.4×10^8	13×10^8
11	5 aproximado	0.527	14.3×10^8	18×10^8
28	6 aproximado	0.678	18×10^8	22×10^8

En comparación con Olubusola, Odeniyi, Olakunle & Adeola. En el 2017, utilizaron como inóculo; 1.5×10^8 células/ml, equivalente al patrón 0,5 de McFarland estándar, medidos en una Abs de 640 nm con ocho cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas del suelo y aguas residuales, puestas en condiciones óptima para el crecimiento celular y la acumulación de PHA con un rendimiento de 0,33 g/L y 0,40 g/L peso-seco con salvado de maíz, mazorca de maíz y salvado de trigo para la producción de PHA.

Igualmente, Turnbull, Sirianni, LeBron, Samaan, Sutton, Reyes, y Peruski. En el 2004, utilizaron inoculos con patrones de turbidez equivalente a un McFarland estándar de 0.5 para determinar los efectos de agentes antimicrobianos sobre 76 aislamientos de *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycooides* derivados. Resistentes a la tetraciclina, azitromicina y eritromicina en fuentes clínicas y ambientales. Donde se obtuvieron como resultado, rango de 3×10^6 a 20×10^6 UFC/ml, en comparación con 1×10^8 a 3×10^8 UFC/ml de la cepa control estándar de mcfarland.

Pureza de las cepas de *B. thuringiensis*

La pureza de las cepas que se utilizaron para la inoculación de los medios de cultivo, se hizo a través de las características macroscópicas aisladas en agar TSA y microscópicas dando como resultado una semejanza entre las cepas 2, 7, 9, 11 y 28. (Tabla #8 y anexo #9)

Tabla n°9: Las características macroscópicas y microscópicas de *B thuringiensis*.

Capas UPCBT	Macroscópica	Microscópica	
		Tinción de Gram	Verde de malaquita
2	Colonias de color crema, secas, de forma irregular y bordes lobulados	Bacilos Grampositivo	Bacilos no deformes con esporas centrales y terminales
7	Colonias de color crema, secas, de forma irregular y bordes lobulados	Bacilos Grampositivo	Bacilos no deformes con esporas centrales y terminales
9	Colonias de color crema, secas, de forma irregular, bordes lobulados y entero	Bacilos Grampositivo	Bacilos no deformes con esporas centrales y terminales

11	Colonias de color crema, secas, de forma irregular y bordes lobulados	Bacilos Grampositivo	Bacilos no deformes con esporas centrales y terminales
28	Colonias de color crema, secas, de forma irregular, bordes lobulados y entero	Bacilos Grampositivo	Bacilos no deformes con esporas centrales y terminales

Las características macroscópicas y microscópicas son muy similares a las descritas por Rabinovitch, Vivoni, Machado, Knaak, Berlitz, Polanczyk, & Fiuza. En el 2017, donde afirman que son Bacilos Grampositivo no deformes con esporas centrales y terminales. Con colonias de color crema, brillantes, planas, elevadas, secas o mate, de forma irregular, bordes lobulados y entero. Que además pueden estar fuertemente asociada a las condiciones del cultivo.

En cuanto a la caracterización bioquímica, se encontró que todas las cepas son negativas para la prueba de producción de sulfuro, utilización de indol y citrato. Además, fueron positivas para el rojo de metilo (Rm), voges-proskauer (VP), hidrólisis del almidón, hidrólisis de la gelatina, hidrólisis de la caseína, hidrólisis de la urea, prueba de catalasa y oxidasa. Presentes en la tabla #9.

Tabla n°10: Caracterización bioquímicas de las cepas de *B. thuringiensis*.

Prueba	Cepas UPCBT				
	2	7	9	11	28
Sulfuro	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+
Rojo de metilo (prueba MR)	+	+	+	+	+
Voges-proskauer (Prueba VP)	+	+	+	+	+
Utilización del citrato	-	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	+	+	+	+	+
Gelatina hidrolizada	+	+	+	+	+
Caseína hidrolítica	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+
Triple azúcar hierro (TSI)	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Prueba Oxidasa	+	+	+	+	+
Prueba Catalasa	+	+	+	+	+
Prueba lecitinasa	+	+	+	+	+

(+) Reacción positiva, (-) Reacción negativa, (A/A) Acido/Acido.

La utilización del citrato, producción de sulfuro e indol fueron negativo ya que estas cepas no tienen la capacidad de desdoblar estos sustratos al igual que las cepas aisladas por Dhawan y Manish en el 2018 cuando aislaron trece especies de *Bacillus thuringiensis* donde la mayoría de los aislamientos bacterianos resultaron positivos para la prueba de hidrólisis MR, VP, catalasa, almidón y gelatina. Negativos para la prueba de utilización de indol, sulfuro y citrato.

Para la fermentación de carbohidrato, las cepas de *Bt* fueron capaz de fermentar la glucosa, xilosa, manitol, sacarosa y fructosa, produciendo acido evidenciado por el cambio de color producto del rojo de fenol al virar de color rosa a color amarillo (Tabla #10).

Tabla n°11: Fermentación de azúcares por *Bacillus thuringiensis*

Cepas	Glucosa	Sacarosa	Xilosa	Manitol	Fructosa
2	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+

(+) Reacción positiva, (-) Reacción negativa.

Por otra parte, de acuerdo a la caracterización y los asilamientos de cepas para la producción producción de toxinas con *Bacillus thuringiensis* realizados por Dhawan y Manish en el 2018. La fermentación de carbohidratos como lactosa y xilosa en muchos aislados resultaron negativos. Mientras que los demás carbohidratos fueron positivos. No obstante, hay cepas que pueden llegar a desdoblar ciertas azúcares, como en el caso de Gomaa que en el 2012, aisló treinta cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus licheniformis* para determinar la producción de quitinasa, obteniendo actividades quitinolíticas altas, utilizando medio de quitina coloidal con caseína como fuente de nitrógeno y glucosa, sacarosa, galactosa, arabinosa, rafinosa, manosa, maltosa, fructosa, lactosa, xilosa, almidón y celulosa a una concentración del 0,5% como fuentes de carbono.

Selección de medio del cultivo óptimos.

Para determinar el medio de cultivo óptimo en la fermentación de *Bacillus thuringiensis* en los medios de cultivo preliminares, se tuvo como referencia la producción de biomasa obtenida en el grafico #1 y la tabla #11 y 12.

Tabla n°12: Biomasa de *Bacillus thuringiensis* en medios de cultivos preliminares

Matriz	Biomasa expresada en mg/ml				
	UPCBT 2	UPCBT 7	UPCBT 9	UPCBT 11	UPCBT 28
Agua de maiz	19,2	21,3	19,8	18,8	19,8
Cascarilla de arroz	17,8	18,8	14,3	13,5	17,3
Agua residual	9,5	8,3	7,2	7,7	7,8
Lactosuero	21,7	28,8	20,8	22,5	25,5

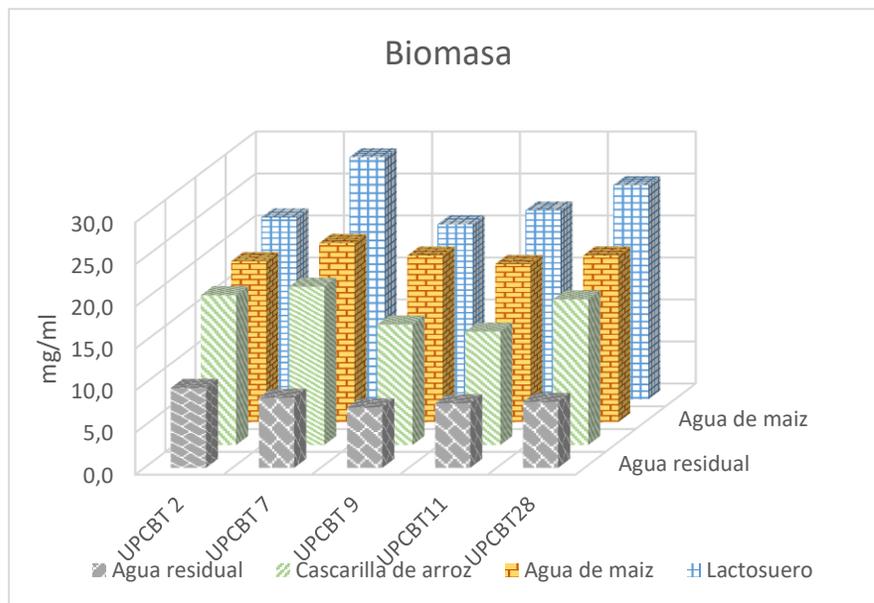
Tabla n°13: Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Lactosuero	5	23,87	A
Agua de maiz	5	19,802	B
Cascarilla de arroz	5	16,37	B
Agua residual	5	8,100	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Con relación de los datos estadísticos de la tabla #12, Hay una diferencia significativa de los medios, demostrando que el tratamiento a base de lactosuero fue el medio más productivo.

Grafica n°1: Produccion de biomasa de *Bacillus thuringiensis* en los medios de cultivos preliminares



Observando la tabla #11 y 12. El agua de maíz fue el segundo medio con mejor producción al ser tratado con la cepa UPCBT 7. Estas evidencias están acordes con lo

aportando por Escobar *et al* (2004), Fernández *et al* (2014) y Untol *et al*, (2015); demostrado que el medio de cultivo a base de maíz, es un factor clave en la producción de *Bacillus thuringiensis*; ya que es muy económico, rico en nitrógeno y factores de crecimiento para el buen desarrollo del microorganismo.

En relación con la mascarilla o salvado de arroz, el tratamiento con la cepa UPCBT 7 de *Bacillus thuringiensis* como aparece en la tabla #10 fue altamente productivo, Igualmente Nguyen *et al*, (2014). Afirma, que el salvado de arroz, el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y el $CaCl_2$, tienen una influencia significativa para incrementar el rendimiento y producción de delta endotoxinas en un 34%.

A pesar de que el agua residual aporta muy poca biomasa como se observa en la tabla #11 y el gráfico #1, es muy productiva al no estar mezclada con algún coadyuvante. A diferencia de los estudios reportados por Khanh *et al* (2009), el cual empleo agua residual de la industria del almidón como materia prima para la fermentación de Bt, en combinación de coadyuvantes ricos en carbono y NaOH, obteniendo como resultado un medio de cultivo óptimo para la producción de esporas y síntesis de proteínas insecticidas, debido a la concentración de diferentes componentes disponibles para su crecimiento. Además, según Brar *et al*. (2006). la inclusión de las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* a partir de aguas residuales es un éxito en el futuro, debido a ventajas obtenidas de resultados destacados.

El medio de cultivo a base de lactosuero al ser tratado con la cepa UPCBT 7 presentó la máxima producción frente a los demás medios de cultivo, como se establece en el gráfico #1 y la tabla #10; convirtiéndolo en el medio de cultivo óptimo para la producción a escala. Estos resultados están acordes con los de Mehta *et al* (2017)., Salazar *et al* (2015). Y Poveda y Elpidia (2013), quienes afirman, que el lactosuero es un sustrato rico en carbohidratos, vitaminas y minerales que lo hacen un medio de cultivo con alto potencial para la producción de *Bacillus turingiensis*

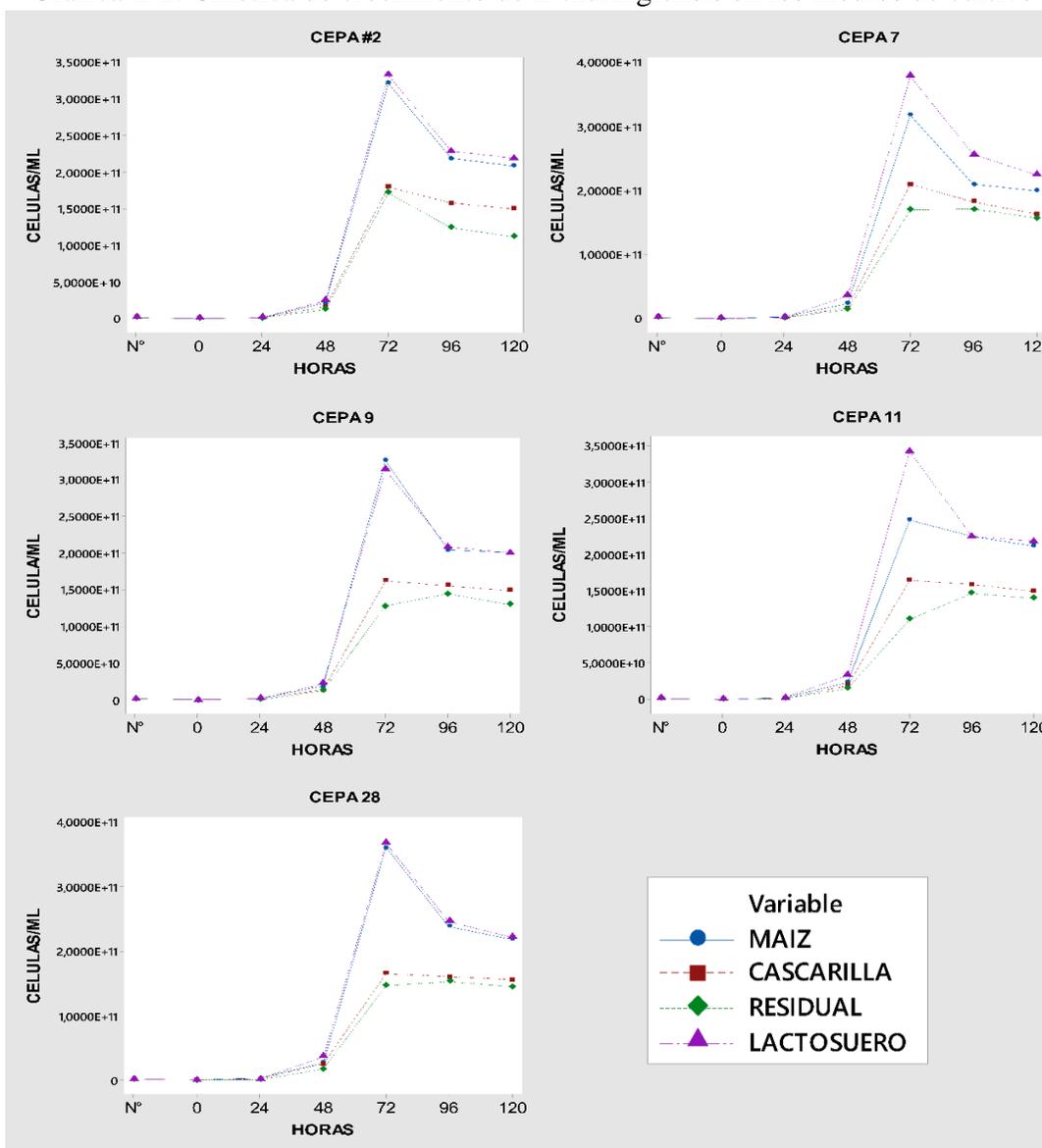
En comparación a otros sustratos Zghal *et al*. (2018), hicieron una investigación que constaba sobre la producción de bioinsecticida con *Bacillus thuringiensis* a base de subproducto agrícola con gachas y harina de soja. Logrando como resultado la producción óptima de ± 48.52 mg/L del medio del cultivo.

Producción de cepas en medios de cultivos preliminares.

Para determinar la productividad de las cepas en medios de cultivos, se realizó conteo de células cada 24 horas durante 5 días. Obteniendo que las cepas 2, 7, 9, 11 y 28 de *Bacillus thuringiensis* tuvieron un desempeño significativo con valores de células/ml en medios de cultivo a base de agua de maíz, agua de arroz, agua residual tratada y lactosuero, como aparece en el gráfico # 2 y 3.

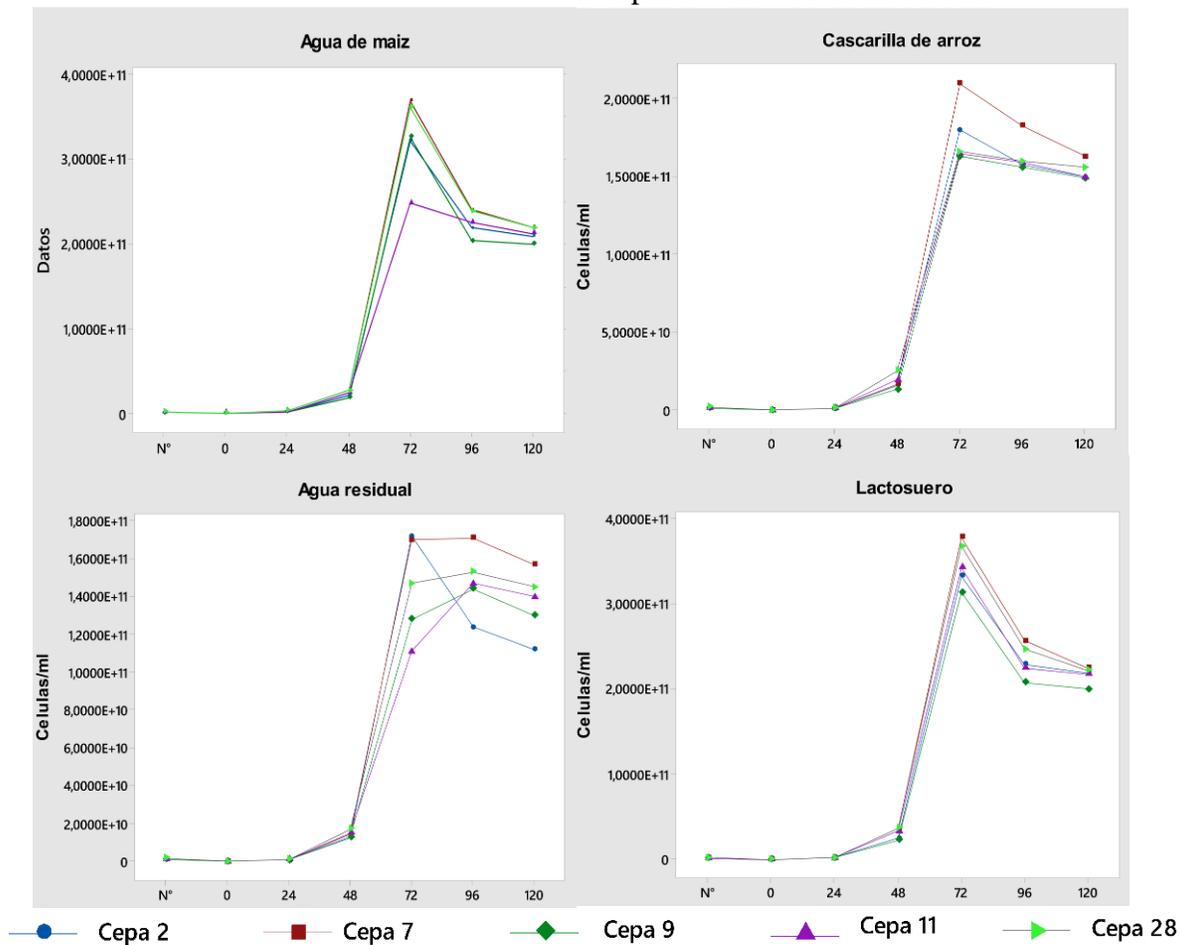
En el transcurso de esta investigación se logró evaluar la cinética de crecimiento a través del conteo de célula en cámara de Neubauer, obteniendo resultado que aparece en la gráfica #2

Grafica n°2: Cinética de crecimiento de *B thuringiensis* en los medios de cultivo



Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en medios no convencionales

Grafica n°3: Crecimiento de las cepas en los medios de cultivo



La cepa 2 llego a dar una producción de $3,22 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua de maiz, $1,80 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de cascarilla de arroz, $1,72 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua residual y $3,33 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de lactosuero, durante las primeras 72 horas de producción. La cepa 7 llego a dar una producción de $3,69 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua de maiz, $2,10 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de cascarilla de arroz, $1,70 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua residual y $3,79 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de lactosuero, durante las primeras 72 horas de producción.

La cepa 9 llego a dar una producción de $3,26 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua de maiz, $1,63 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de cascarilla de arroz, $1,28 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua residual y $3,14 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de lactosuero, durante las primeras 72 horas de producción. La cepa 11 llego a dar una producción de $2,48 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua de maiz, $1,65 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de cascarilla

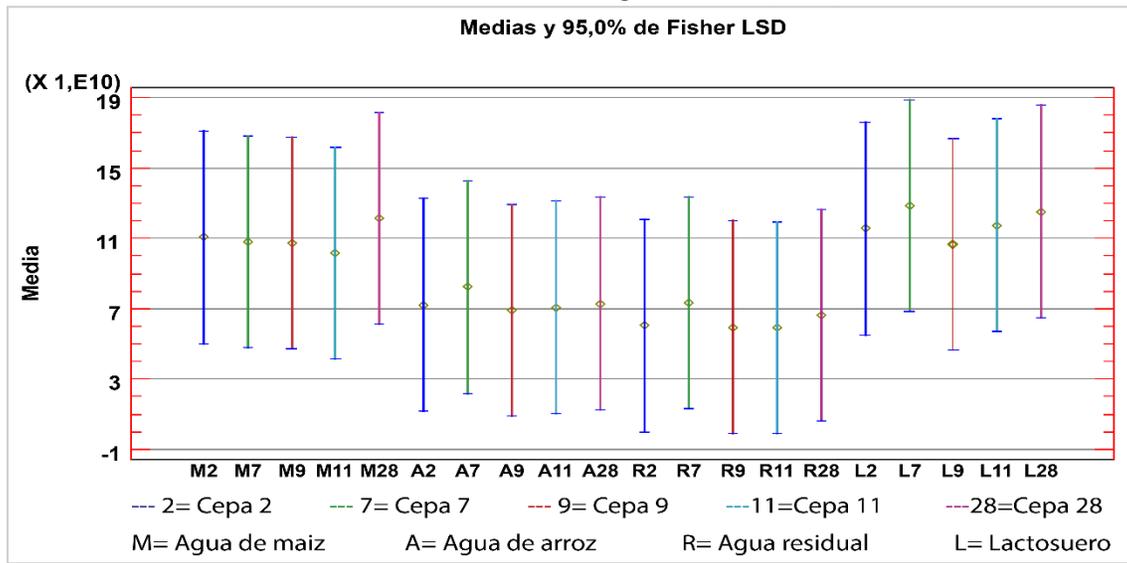
de arroz, $1,11 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua residual y $3,43 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de lactosuero, durante las primeras 72 horas de producción.

La cepa 28 llegó a dar una producción de $3,61 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua de maíz, $1,66 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de cascarilla de arroz, $1,47 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de agua residual y $3,68 \times 10^{11}$ cell/ml en el medio a base de lactosuero, durante las primeras 72 horas de producción. Se obtuvo la curva de crecimiento de las 5 cepas de *Bacillus thuringiensis* a partir de la fermentación del microorganismo en los distintos medios de cultivo, determinando la cinética de crecimiento del microorganismo en sus tres fases durante 120 horas. La fase de latencia se produjo en un tiempo de 0 a 24 horas, la fase exponencial o logarítmica de 24 a 72 horas aproximadamente y la fase estacionaria de 72 a 120 horas.

A diferencia de Navarro *et al.*, (2014). donde la fase exponencial de *Bacillus thuringiensis* en la construcción de un modelo biodinámico para estudios de producción de proteínas Cry fue de 0 a 12 horas y su fase estacionaria de 12 a 24 horas. En el que no se observó la fase de muerte ya que según Rabinovitch *et al.* (2017). El microorganismo tiene dos fases durante el desarrollo celular: la división de células vegetativas y la formación de esporas.

Obteniendo que la cepa #7 de *Bacillus thuringiensis* tuvo mayor desempeño con un promedio de $1,29 \times 10^{11}$ células/ml, en el medio de cultivo a base de lactosuero, como aparece en el gráfico #4. Que muestra la media para cada columna de datos, el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo, el error estándar al dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La gráfica también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces.

Grafica n°4: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher

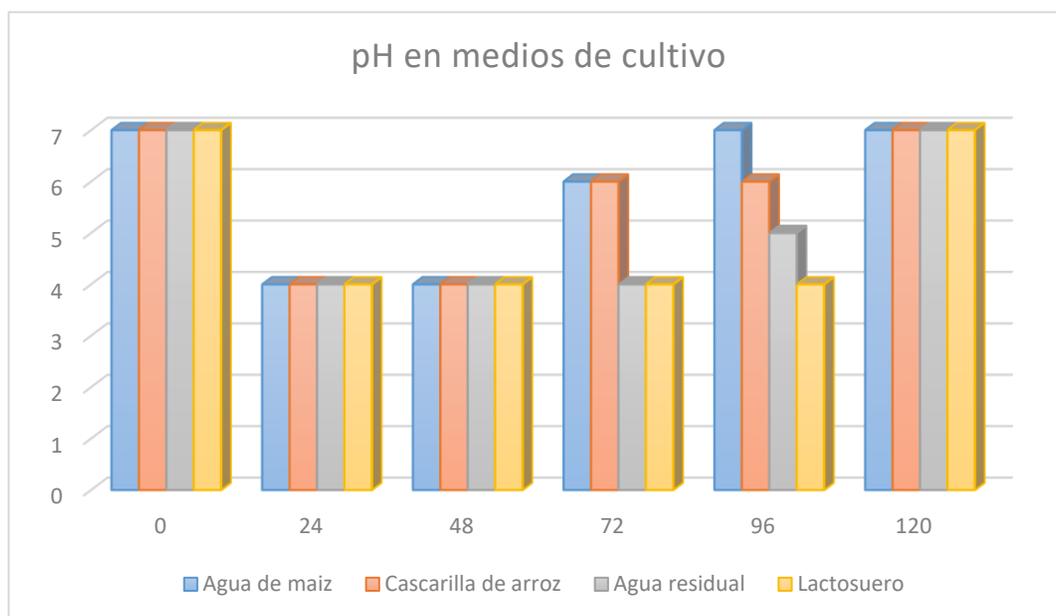


Por otra parte, se hizo la tabla ANOVA de los datos obtenidos en el gráfico #3, para descomponer la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro de grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,329466, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la razón F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 20 variables con un nivel del 95,0% de confianza. En contraste con Khedher *et al.*, (2014) donde determinaron las variables influyentes en la producción de toxinas de *Bt*, utilizando el diseño factorial Plackett-Burman en 12 experimentos para evaluar el efecto de ocho parámetros potenciales. Realizaron un análisis de regresión múltiple de los datos con el análisis estadístico, como resultado, el efecto de regresión fue estadísticamente altamente significativo entre las variables con $[(P > F) < 0.01]$ a 97.7% del nivel de confianza.

Pasadas las 120 horas de producción, se determinó la biomasa por el método de peso seco, dando como resultado; una alta producción de la cepa #7 con un valor de 28,8 miligramo (mg) por mililitro (ml), en el medio de cultivo a base de lactosuero. Tal como aparece en la gráfica #4

En la gráfica #5; se muestra el pH de los medios de cultivo con respecto al tiempo. Obteniendo que entre las 24 y las 96 horas el pH estuvo fluctuante con diferentes intervalos dependientes al medio de cultivo.

Grafica n°5: pH de los medios de cultivo preliminares



Inicialmente el pH se ajustó a 7.0, luego de las 24 a las 48 horas, los medios de cultivo bajaron hasta 4.0, de las 72 hasta las 96 horas se mantuvieron fluctuantes excepto el lactosuero, pasadas las 120 horas el pH se encontraba estable en todos los medios de cultivo. Esta investigación concuerda con la de Abad y Omar (2017). En ella afirman que el pH es un parámetro importante y que, durante el proceso, es necesario ajustar los medios de cultivo para que no sea menor a un rango de 4,0 a 5,0. Y que, además, el pH inicial debe ser de 6,8-7,2, pero baja posteriormente a las primeras 8-12 h, hasta llegar a un pH de 4,0 a 5,0. Y que consecutivamente, se incrementaría lentamente, hasta final del proceso, aproximándose a 8,0.

Por otra parte, esta investigación concuerda con Dulmage (1990); Fernandez (2014); Nguyen *et al.* (2014); Untol *et al.*, 2015; Salazar *et al.* (2015) entre otros. En la utilización y estandarización de estas fuentes de carbono y de nitrógenos para la producción de *Bacillus thuringensis*, ya que obtuvieron resultados favorables, estimándolos como medios baratos con potencial de producción a escala.

Estandarización del pre-inóculo de los cultivos de *B. thuringiensis*

En la tabla #13 se indica el número de esporas recuperadas en 1 ml junto con la Abs y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en comparación con el rango de concentración del patrón de Mac Farland. Obteniendo como resultado una aproximación del tubo 5 de la escala de Mac farland y de los números de esporas por ml con UFC por ml.

Tabla n°14: Comparación de la concentración celular con el patrón de Mac Farland.

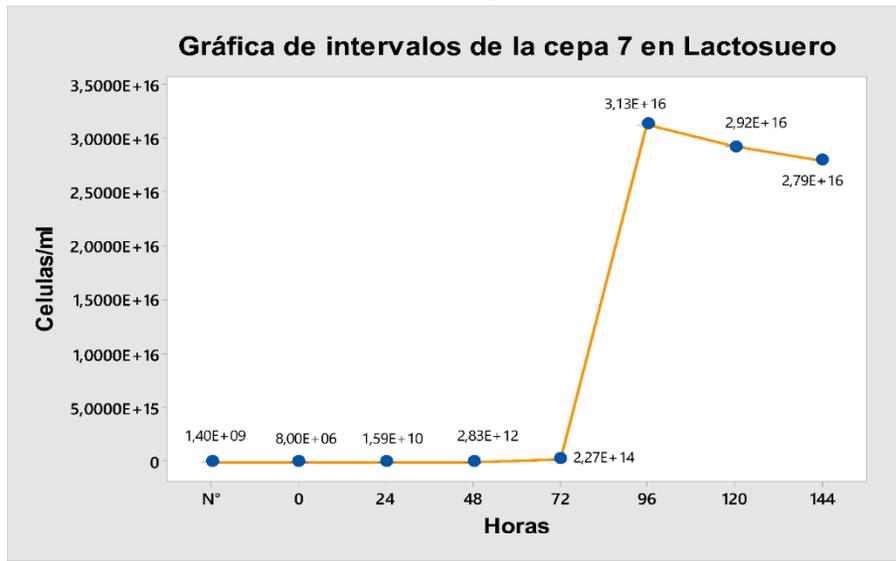
Cepa	Patrón Mac Farland	Abs patrón Mac Farland	Esporas/ml	UFC/ml
Optima	5 aproximado	0,520	14×10^8	20×10^8

Cinética de crecimiento de la producción a escala en 1 litro de la cepa #7 con medio de cultivo a base de lactosuero.

Considerando que la cepa #7 fue la que tuvo mejor rendimiento en el medio de cultivo a base de lactosuero. Se procedió a inocular la cepa 7 a escala piloto en el medio de cultivo a base de lactosuero por 144 horas, a una temperatura de 28 a 30°C y un pH en 7 para la mayor productividad de *Bacillus thuringiensis*.

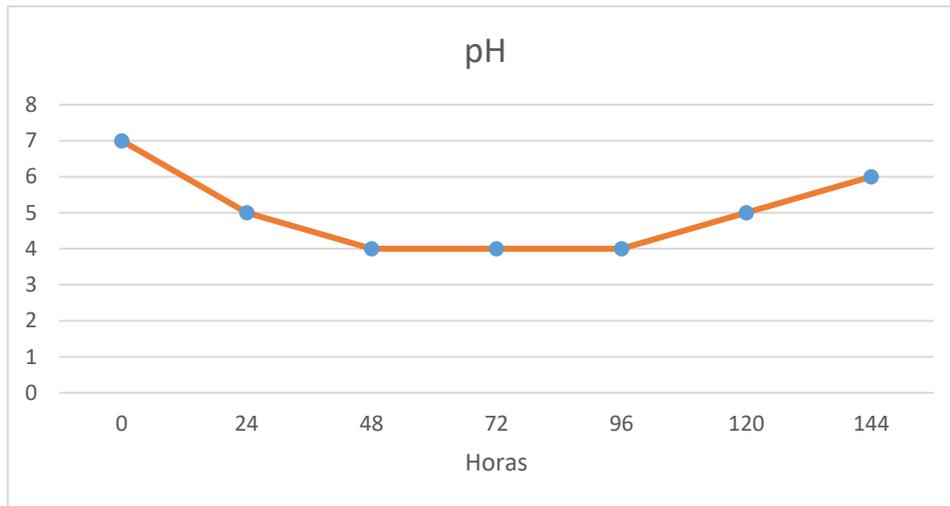
En el grafico #6. Se obtuvo, la curva de crecimiento de la cepa 7 en el medio a base de lactosuero, determinando la cinética de crecimiento del microorganismo en sus tres fases durante 144 horas. La fase de latencia en un tiempo de 0 a 24 horas, en la fase exponencial llego a dar una producción de $3,13 \times 10^{16}$ cell/ml entre 24 a 96 horas aproximadamente, la fase estacionaria se dio a partir de las 96 a las 144 horas.

Grafica n°6: Cinética de crecimiento de la cepa 7 en el medio a base de lactosuero



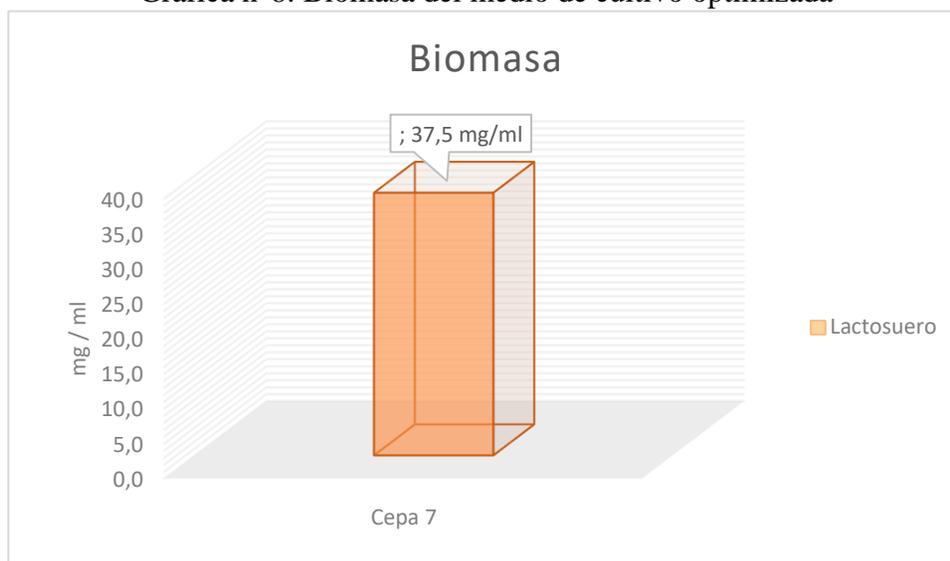
No obstante, en la gráfica #7; se muestra el pH de los medios de cultivo con respecto al tiempo. Obteniendo que entre las 24 y las 144 horas el pH estuvo fluctuante con diferentes intervalos dependientes a la producción del medio de cultivo.

Grafica n°7



Pasadas las 144 horas de producción, se determinó la biomasa por el método de peso seco, dando como resultado; la alta producción de la cepa #7 con un valor de 37,5 miligramo (mg) por mililitro (ml), en el medio de cultivo a base de lactosuero. Tal como aparece en la gráfica #8

Grafica n°8: Biomasa del medio de cultivo optimizada



Por último, estos resultados son comparables a los obtenidos por Avignone y Mignone (1995). En su investigación sobre *Bacillus thuringiensis* crecimiento y toxicidad. Consideraciones básicas y aplicadas, en el cual indicaron una alta productividad para *B. thuringiensis* de 1.6×10^{10} UFC/ml o 36.8 g/L. Por otra parte, Navarro *et al.*, (2014). En la construcción de un modelo biodinámico para la producción de proteínas Cry obtuvieron en el formulado 4, una biomasa de 13.07 g/l en un tiempo de 32 horas aproximadamente.

Igualmente, en la investigación de Fernández *et al.* (2014). En la producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* en dos medios de cultivo contra larvas de *aedes aegypti* lograron obtener una biomasa de 18.49 g/l. en un tiempo de 72 horas. Así mismo, Blas *et al.* (2014). Evaluó el efecto de la naranja de acridina en la producción de bioinsecticida, a partir de un medio a base de sanguaza. Con un resultado de $15,7 \times 10^9$ UFC y una biomasa de 2.78 g/L en un tiempo de 40 horas.

No obstante, el aprovechamiento de los nutrientes en el medio a base de lactosuero por parte de la cepa 7 puede ser comparado con la investigación hecha por Salazar *et al.* (2015). Cuando evaluaron subproductos industriales para la producción de la cepa GP139 de *Bacillus thuringiensis* y la patogenicidad cuando se aplica a las ninfas de *Bemisia tabaci*.

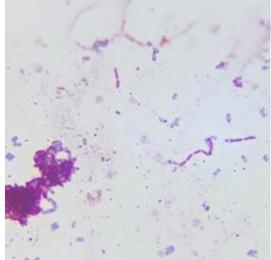
Como resultado se llegó a $4,95 \times 10^8$ Cel/ml y una biomasa de 78 g/L de proteína total con el medio de suero más sacarosa.

Además, se puede decir que el rendimiento del medio de cultivo a base de lactosuero es por la cantidad de nutrientes disponible que posee, ya que estudios realizados por Poveda y Elpidia (2013). Afirma que la mayor biodisponibilidad de nutrientes, es debido a que el lactosuero posee aproximadamente un 90% del calcio, potasio, fósforo, sodio y magnesio presente en la leche, además, es rico en carbohidratos, vitaminas y minerales los cual hace que el lactosuero sea un medio de cultivo con un potencial de alta producción a escala.

Pureza de la cepa de *B. thuringiensis* producida a escala piloto

La pureza de la cepa que se utilizó para la mayor producción en el medio de cultivo seleccionado, se hizo a través de las características macroscópicas aisladas en agar TSA y microscópicas después de las 144 horas de producción, dando como resultado una semejanza con la cepa 7 como aparece en la tabla #14.

Tabla n°15: características macroscópicas y microscópicas de la cepa 7

Capa	Macroscópica	Microscópica	
		Tinción de Gram	Verde de malaquita
7	 <p>Colonias de color crema, secas, de forma irregular y bordes lobulados</p>	 <p>Bacilos Grampositivo</p>	 <p>Bacilos no deformes con esporas centrales y terminales</p>

En cuanto a la caracterización bioquímica, se encontró que la cepa es negativa para la prueba de producción de sulfuro, utilización de indol y citrato. Además, fue positiva para el rojo de metilo (Rm), voges-proskauer (VP), hidrólisis del almidón, hidrólisis de la gelatina,

hidrólisis de la caseína, hidrolisis de la urea, prueba de catalasa y oxidasa. Presentes en la tabla #15.

Tabla n°16: Caracterización bioquímica de *B thuringiensis*

Prueba	Cepa 7
Sulfuro	-
Indol	-
Motilidad	+
Rojo de metilo (prueba MR)	+
Voges-proskeur (Prueba VP)	+
Utilización del citrato	-
Hidrólisis de almidón	+
Gelatina hidrolizada	+
Caseína hidrolítica	+
Ureasa	+
Triple azúcar hierro (TSI)	A/A
Prueba Oxidasa	+
Prueba Catalasa	+
Prueba lecitinasa	+

(+) Reacción positiva, (-) Reacción negativa, (A/A) Acido/Acido.

Para la fermentación de carbohidrato, la cepa 7 de Bt fue capaz de fermentar la glucosa, xilosa, manitol, sacarosa y fructosa, produciendo acido evidenciado por el cambio de color producto del rojo de fenol al virar de color rosa a color amarillo (Tabla #16).

Tabla n°17: Fermentación de azucres por *Bacillus thuringiensis*

Cepas	Glucosa	Sacarosa	Xilosa	Manitol	Fructosa
7	+	+	+	+	+

(+) Reacción positiva, (-) Reacción negativa.

CONCLUSIÓN

Estadísticamente la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, determino que en los resultados obtenidos por el conteo de esporas, todos los medios de cultivos demostraron no tener una diferencia significativa. Por lo tanto, son aptos para el desarrollo de *Bacillus thuringiensis*, en especial el lactosuero y el maíz, ya que poseen un alto potencial nutricional disponible para lograr un mayor rendimiento en la producción de *Bt* a escala industrial.

Se logró determinar el medio de cultivo óptimo a través de la producción de biomasa y la cuantificación de esporas, durante 120 horas en los 20 tratamientos compuestos de agua de maíz, agua de cascarilla de arroz, agua residual y lactosuero con 5 cepas de *Bacillus thuringiensis*, logrando determinar que el lactosuero fue el medio de cultivo más productivo para su crecimiento, teniendo en cuenta variables como el pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno.

La cinética de crecimiento de las 5 cepas de *Bacillus thuringiensis* en los 20 tratamientos, logró establecer que la cepa 7 fue la que mayor producción de esporas obtuvo, en un lapso de 120 horas. No obstante, todas las cepas tuvieron un máximo rendimiento en la fase exponencial a partir de las 24 hasta las 72 horas de producción.

Por último, se determinó la mayor productividad de *Bacillus thuringiensis* en escala de 1 litro. Logrando que la cepa 7 en el medio de cultivo a base de lactosuero, a través del conteo de esporas, diera un máximo rendimiento de $3,13 \times 10^{16}$ cell/ml en la fase exponencial, a partir de las 24 hasta las 96 horas de producción. Además, una biomasa máxima de 37,5 mg/ml en un tiempo de 144 horas.

RECOMENDACIONES

La implementación de nuevas matrices y combinaciones de las mismas, para lograr una mayor producción de bacillus thuringiensis.

La aplicación de una curva de calibración para la estandarización del pre-inoculo e inoculo.

La determinación del crecimiento microbiano a través de la combinación del peso seco, conteo celular, conteo de células viables y densidad óptica.

La implicación del perfil fisicoquímico de cada cultivo antes y después de ser inoculado, para determinar el grado de nutricional degradado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad Tirado & Alex Omar. (2017). Proyecto de Pre-Factibilidad de Instalación de una Planta de Producción de Bioinsecticida (*Bacillus thuringiensis*) a Partir de Suero de Leche. Tesis de maestría. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Perú.
- Abarca C., & Quintero, R. (1992). Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *aisawai*. Universidad: ciencia y tecnología, 2(3), 51-53.
- Alva R & Vargas F. (2015). Efecto del agua residual de harina de pescado en la producción de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Trujillo.
- Arenas A & Carvajal L. (2012). Influencia de los cambios climáticos en la definición del sexo en *Aedes aegypti* y su impacto en las epidemias de Dengue, Rev. Facultad de Salud - RFS Vol.4 (2). p.p11-24
- Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. (2014). *Bacillus thuringiensis* Is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. *Insects*, 5(1), 62–91.
<http://doi.org/10.3390/insects5010062>
- Arthurs, S., & Dara, S. K. (2019). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 13-21.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>
- Avignone R. Yantorno J. & Ertola R. (1990). Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 27-31
- Avignone y Mignone. (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Basic and applied considerations. *Molecular Biotechnology*. Volume 4: 55.
<https://doi.org/10.1007/BF02907471>

- Ballardo C. (2016). Valorización de residuos sólidos orgánicos como sustrato para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* mediante fermentación en estado sólido: Aplicación a la Fracción Orgánica de Residuos Municipales para la producción de compost con efecto biopesticida. (Tesis doctoral). Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Bava, R., Castagna, F., Piras, C., Musolino, V., Lupia, C., Palma, E., Britti, D., & Musella, V. (2022). Entomopathogenic Fungi for Pests and Predators Control in Beekeeping. *Veterinary sciences*, 9(2), 95. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020095>
- Bebber, D. P., Holmes, T., Smith, D., & Gurr, S. J. (2014). Economic and physical determinants of the global distributions of crop pests and pathogens. *The New Phytologist*, 202(3), 901–910. <http://doi.org/10.1111/nph.12722>
- Belousova, M. E., Malovichko, Y. V., Shikov, A. E., Nizhnikov, A. A., & Antonets, K. S. (2021). Dissecting the Environmental Consequences of *Bacillus thuringiensis* Application for Natural Ecosystems. *Toxins*, 13(5), 355. <https://doi.org/10.3390/toxins13050355>
- Beltrán, L., Díaz, S., Berdugo, C., Buitrago, G., Zamora, A., & Moreno, N. (1998). Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1), 28-34.
- Ben Khedher, S., Jaoua, S., & Zouari, N. (2013). Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 927–933.
- Ben Khedher, S., Jaoua, S., & Zouari, N. (2014). Overcome of Carbon Catabolite Repression of Bioinsecticides Production by Sporeless *Bacillus thuringiensis* through Adequate Fermentation Technology. *Biotechnology Research International*, 2014, 698587. <http://doi.org/10.1155/2014/698587>

- Ben-Dov, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*, 6(4), 1222–1243. <http://doi.org/10.3390/toxins6041222>
- Benelli G. (2015a). Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol. Res.* 114 2801–2805. [10.1007/s00436-015-4586-9](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4586-9)
- Benelli G. (2015b). Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitol. Res.* 114 3201–3212. [10.1007/s00436-015-4656-z](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4656-z)
- Bernhard, K. (1986). Studies on the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *FEMS Microbiology Letters*, 33(2–3), 261–265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01283.x>
- Biggel, M., Jessberger, N., Kovac, J., & Johler, S. (2022). Recent paradigm shifts in the perception of the role of *Bacillus thuringiensis* in foodborne disease. *Food Microbiology*, 105(104025), 104025. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104025>
- Blas W, Zavaleta G, Saldaña J, Huamána J, Lezama P & Tuesta L. (2017). Naranja de Acridina, obtención de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante y producción de bioinsecticida por fermentación con sanguaza. *Revista Científica Pakamuros*, 3(1), 10.
- Blas, W., Rodríguez, J., Pedro, J., Vigo, W., Moya, W., & Sánchez, L. (2011). Producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis mutante en un medio fermentativo a base de sanguaza. *REBIOL*, 31(2), 8.
- Bomar, L., Maltz, M., Colston, S., & Graf, J. (2011). Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *mBio*, 2(2), e00012-11. doi:10.1128/mBio.00012-11
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>

- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(4), 423–435.
<http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bukhari, D. A., Kanwal, T., Iftikhar, S., & Rehman, A. (2022). The potential mosquitocidal activity of cry4A toxic region crystal protein gene from local isolates of *Bacillus thuringiensis* against *Aedes aegypti*. *Journal of King Saud University. Science*, 34(6), 102191. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102191>
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2019). *Microbiology: A laboratory manual, loose leaf edition* (12th ed.). Pearson.
- Castagnola, A., & Stock, S. P. (2014). Common Virulence Factors and Tissue Targets of Entomopathogenic Bacteria for Biological Control of Lepidopteran Pests. *Insects*, 5(1), 139–166. <http://doi.org/10.3390/insects5010139>
- Castañeda E, Consuelo L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *NOVA*. 2016; 13 (26): 53-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.1751>
- Castro-Ramirez, I., Rocha-Amador, D. O., Ruiz-Vera, T., Alegría-Torres, J. A., Cruz-Jiménez, G., Enciso-Donis, I., & Costilla-Salazar, R. (2022). Environmental and biological monitoring of organochlorine pesticides in the city of Salamanca, Mexico. *Environmental geochemistry and health*, 10.1007/s10653-022-01368-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01368-9>
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987–1998. <http://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>

- Cheremisinoff, N. P., & Rosenfeld, P. E. (Eds.). (2011). DDT and related compounds. En Handbook of Pollution Prevention and Cleaner Production: Best Practices in the Agrochemical Industry (pp. 247-259). Elsevier.
- Collins, E. L., Phelan, J. E., Hubner, M., Spadar, A., Campos, M., Ward, D., Acford-Palmer, H., Gomes, A. R., Silva, K., Ferrero Gomez, L., Clark, T. G., & Campino, S. (2022). A next generation targeted amplicon sequencing method to screen for insecticide resistance mutations in *Aedes aegypti* populations reveals a *rdl* mutation in mosquitoes from Cabo Verde. PLoS neglected tropical diseases, 16(12), e0010935. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010935>
- Cuartas Otálora, P., & Villamizar Rivero, L. (2016). Interacciones de los Virus Entomopatógenos y su Efecto sobre la Actividad Biológica. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 7(2), 220-239. doi:<https://doi.org/10.18359/rfcb.2056>
- De la Cruz, I. N. B., Bautista Jing, R., & Teves Franco, G. (2015). Isolation and Identification of *Bacillus thuringiensis* from Harpape Haydeniana and its Entomotoxic evaluation against *Aedes* and *Culex* larvae. International Research Journal of Biological Sciences. Vol. 4(3), 21-26.
- Devidas, PC, Pandit, BH y Vitthalrao, PS (2014). Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*. The Scientific World Journal, 2014, 273030. <http://doi.org/10.1155/2014/273030>
- Dhawan M. (2018). Evaluation of cost effective methodology for the isolation of *Bacillus thuringiensis* and its toxin production. Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences. 4. 464-478. Doi: 10.26479/2018.0403.41.
- Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf, H., & Ferré, J. (2017). Assessment of the Antimicrobial Activity and the Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Algeria. Toxins, 9(4), 139. <http://doi.org/10.3390/toxins9040139>

- 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>
- Duarte F. (2012). El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. *Contabilidad y Negocios*, 7 (14), 81-100.
- Ennouri, K., Ben Ayed, R., Triki, M. A., Ottaviani, E., Mazzarello, M., Hertelli, F., & Zouari, N. (2017). Multiple linear regression and artificial neural networks for delta-endotoxin and protease yields modelling of *Bacillus thuringiensis*. *3 Biotech*, 7(3), 187. <http://doi.org/10.1007/s13205-017-0799-1>
- Escobar J, Pardo E, Buitrago G & López L. (2004). Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. *Revista colombiana de biotecnología*, 6(2), 43-53.
- Evangelista, D. A. (2024). Insects, 60% of all biodiversity. In *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 504–516). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822562-2.00069-4>
- Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Seale, J. W., & Franklin, S. (2014). Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 23(11), 1491–1497. <http://doi.org/10.1002/pro.2536>
- Falakdin, P., Terzaghi, E., Raspa, G., & Di Guardo, A. (2022). Predicting the regional contamination evolution of DDT for 100-years with a new gridded spatial and dynamic multimedia fate model. *The Science of the Total Environment*, 845(157190), 157190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157190>
- Fatin, S., Noormasshela U.A., Nor Azwady, A.A., Rusea, G., Muskhazli, H. (2016). *Bacillus thuringiensis* Entomotoxicity Activity in Wastewater Sludge-Culture

Medium towards *Bactrocera dorsalis* and their Histopathological Assessment, Sains Malaysiana, 45(4), 589-594.

Fernández G, Maldonado M, Molina Z, Santos M, Quiroz H & Flores M. (2014).

Producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* israelensis en dos medios de cultivo contra larvas de *Aedes aegypti*. Entomología Mexicana, 1: 173-176.

Fonseca G., A., Peña Ch., G., Trejo L., A. G., Lina G., L. P., Rodríguez B., L. Á. & Hernández V., V. M. (2013). Patogenicidad y virulencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos sobre *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae). Acta Zoológica Mexicana (n.s.), 29(3): 534-543.

Gallegos G. (1985). Producción y toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo para control de insectos, plaga lepidopteros. Maestría tesis, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Garcia C., Berry, C., Tse, C., Fernández-Fernández, A., Osuna, A., & Vílchez, S. (2018). The parasporal crystals of *Bacillus pumilus* strain 15.1: a potential virulence factor? Microbial Biotechnology, 11(2), 302–316. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12771>

Ghribi, D., Zouari, N., & Jaoua, S. (2005). Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. Journal of applied microbiology, 98(4), 823-831.

Giraldo G, Pérez M, Morales C & Ocampo C. (2008). Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. Biomédica 2008;28:224-33.

Gomaa, EZ (2012). Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol. The Journal of Microbiology , 50 (1), 103-111. DOI 10.1007/s12275-012-1343-y

Gómez M. (1989). La delta endotoxina de *Bacillus thuringiensis* GM-2 (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Gomis J., Scaramal Ricietto, A. P., & Ferré, J. (2018). A Genomic and Proteomic Approach to Identify and Quantify the Expressed *Bacillus thuringiensis* Proteins in the Supernatant and Parasporal Crystal. *Toxins*, 10(5), 193.
<http://doi.org/10.3390/toxins10050193>
- Gonzalez-Vazquez, M. C., Vela-Sanchez, R. A., Rojas-Ruiz, N. E., & Carabarin-Lima, A. (2021). Importance of Cry Proteins in Biotechnology: Initially a Bioinsecticide, Now a Vaccine Adjuvant. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(10), 999.
<https://doi.org/10.3390/life11100999>
- Gu, J., Ye, R., Xu, Y., Yin, Y., Li, S., & Chen, H. (2021). A historical overview of analysis systems for *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Cry proteins. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 165(106137), 106137. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106137>
- Guégan, J.-F., de Thoisy, B., Gomez-Gallego, M., & Jactel, H. (2023). World forests, global change, and emerging pests and pathogens. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 61(101266), 101266.
<https://doi.org/10.1016/j.cosust.2023.101266>
- Hoyos, A. M. G. (2021). *Transiciones agroecológicas: prácticas y experiencias en Colombia*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. Bogotá D.C, Colombia. ISBN 978-628-7522-16-9.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50.
<http://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- Jaiswal, D. K., Gawande, S. J., Soumia, P. S., Krishna, R., Vaishnav, A., & Ade, A. B. (2022). Biocontrol strategies: an eco-smart tool for integrated pest and diseases management. *BMC microbiology*, 22(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02744-2>

- Jallouli, W., Driss, F., Fillaudeau, L., & Rouis, S. (2020). Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki since 1990: Focus on bioprocess parameters. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 98, 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.023>
- Kanost, M. R., Arrese, E. L., Cao, X., Chen, Y.-R., Chellapilla, S., Goldsmith, M. R., ... Blissard, G. W. (2016). Multifaceted biological insights from a draft genome sequence of the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76, 118–147. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.005>
- kersh A., Ahmed, A. M., Al-sheikh Yazeed A., Tripet, F., Ibrahim, M. S., & Metwalli, A. A. M. (2016). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). *Parasites & Vectors*, 9, 647. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1922-6>
- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. *Biology*, 11(12), 1763. <https://doi.org/10.3390/biology11121763>
- Khanh KD, Tyagi RD, Valéro JR y Surampalli RY (2009). Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32 (4), 511-519. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0271-z>
- Kiyoshi K. (2014). Seminar of the Institute of Cellular Physiology: Diversity of parasite mitochondria as a drug target. Graduate School of Medicine, The University of Tokyo.
- Koneman, E. W. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color*. Buenos Aires [etc.: Panamericana].

- Kumari, P., Jasrotia, P., Kumar, D., Kashyap, P. L., Kumar, S., Mishra, C. N., Kumar, S., & Singh, G. P. (2022). Biotechnological Approaches for Host Plant Resistance to Insect Pests. *Frontiers in genetics*, 13, 914029.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.914029>
- Labaude, S., & Griffin, C. T. (2018). Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects*, 9(2), 72.
<http://doi.org/10.3390/insects9020072>
- Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 208-36.
- Lahuerta, Z. L., & Pérez-Gracia, M. T. (2012). Using digital photography to implement the McFarland method. *Journal of the Royal Society, Interface*, 9(73), 1892–1897.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0809>
- Li, L., Chen, Z., & Yu, Z. (2017). Mass Production, Application and Market Development of *Bacillus thuringiensis* Biopesticides in China. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* (pp. 185-212). Springer, Cham.
- Liu, L., Li, Z., Luo, X., Zhang, X., Chou, S. H., Wang, J., & He, J. (2021). Which Is Stronger? A Continuing Battle Between Cry Toxins and Insects. *Frontiers in microbiology*, 12, 665101. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665101>
- Liu, X., Zuo, M., Wang, T., Sun, Y., Liu, S., Hu, S., ... Ding, X. (2015). Proteomic analysis of the influence of Cu²⁺ on the crystal protein production of *Bacillus thuringiensis* X022. *Microbial Cell Factories*, 14, 153. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0339-9>
- Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–163). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Lozano, G. E., Beatriz, S. R., Cervantes, F. M., María, G. N. P., & Francisco, J. M. C. (2018). Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial

- populations. *African Journal of Microbiology Research*, 12(31), 736–740.
<https://doi.org/10.5897/ajmr2018.8893>
- Mall, D., Larsen, A. E., & Martin, E. A. (2018). Investigating the (Mis)Match between Natural Pest Control Knowledge and the Intensity of Pesticide Use. *Insects*, 9(1), 2.
<http://doi.org/10.3390/insects9010002>
- Martemyanov, V. V., Belousova, I. A., Pavlushin, S. V., Dubovskiy, I. M., Ershov, N. I., Alikina, T. Y., ... Glupov, V. V. (2016). Phenological asynchrony between host plant and gypsy moth reduces insect gut microbiota and susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *Ecology and Evolution*, 6(20), 7298–7310.
<http://doi.org/10.1002/ece3.2460>
- Martinez M. (1990). Evaluacion de medios de cultivos para la producción de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis*. Var kurstaki. (Tesis doctoral) Instituto superior de ciencias agropecuarias. Managua.
- Martínez-Zavala, S. A., Barboza-Pérez, U. E., Hernández-Guzmán, G., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2020). Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials. *Frontiers in microbiology*, 10, 3032.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03032>
- Mehta, V., Patel, E., Vaghela, K., Marjadi, D., & Dharaiya, N. (2017). Production of biopolymer from dairy waste: An approach to alternate synthetic plastic. *BioSciences*, vol:6 (4): 1-8.
- Narvaéz, A. (2015). Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* sp nativas de suelos de la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro *Tetranychus urticae*. Tesis de Grado. Quito, Ecuador.
- Navarro K., & Pérez-Guevara, F. (2014). Construction of a biodynamic model for Cry protein production studies. *AMB Express*, 4, 79. <http://doi.org/10.1186/s13568-014-0079-y>

- Navarro-Mtz, A. K., & Pérez-Guevara, F. (2014). Construction of a biodynamic model for Cry protein production studies. *AMB Express*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0079-y>
- Navarro-Mtz, A. K., Martinez-Garcia, R., Urzua-Valenzuela, M., Roldan-Sabino, C., Kakazey, M., & Juarez-Arellano, E. A. (2019). High-energy ball milling treatment of soybean for *Bacillus thuringiensis* culture media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(3), 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.02.010>
- Nguyen Thi Hoa, Tang Thi Chinh, Dang Thi Mai Anh, Ngo Dinh Binh, Le Thi Minh Thanh. (2014). Optimization of Fermentation Medium Compositions from Dewatered Wastewater Sludge of Beer Manufactory for *Bacillus Thuringiensis* Delta Endotoxin Production. *American Journal of Agriculture and Forestry*. Vol. 2, No. 5, 2014, pp. 219-225. doi: 10.11648/j.ajaf.20140205.12
- Nicoletti M. (2020). New solutions using natural products. *Insect-Borne Diseases in the 21st Century*, 263–351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818706-7.00007-3>
- Noureldeen, A., Kumar, U., Asad, M., Darwish, H., Alharthi, S., Fawzy, M. A., Al-Barty, A. M., Alotaibi, S. S., Fallatah, A., Alghamdi, A., Albogami, B., & Alkashgry, N. (2022). Aphicidal activity of five plant extracts applied singly or in combination with entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus budapestensis* against rose aphid, *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of King Saud University. Science*, 34(8), 102306. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102306>
- Novoa H & Robles H. (2016). Efecto de las concentraciones del extracto acuoso de harina de *Glycine max* “soya” sobre la producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo. Peru.
- Oberhardt, M. A., Zarecki, R., Gronow, S., Lang, E., Klenk, H. P., Gophna, U., & Ruppin, E. (2015). Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings. *Nature communications*, 6, 8493. doi:10.1038/ncomms9493

- Ocampo, C. B., Calderon, G. I. G., Perez, M., & Morales, C. A. (2008). Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. *Biomédica*, 28(2), 224-233.
- Olubusola A. Odeniyi, Olakunle J. & Adeola. (2017). Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 104, Part A, 2017, Pages 407-413, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.041>.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. doi:10.3390/toxins6123296.
- Pathaichindachote, W., Rungrod, A., Audtho, M., Soonsanga, S., Krittanai, C., & Promdonkoy, B. (2013). Isoleucine at position 150 of Cyt2Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* plays an important role during membrane binding and oligomerization. *BMB Reports*, 46(3), 175–180. <http://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.3.100>
- Peralta C, & Palma L. (2017). Is the Insect World Overcoming the Efficacy of *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*. 9(1), 39. <http://doi.org/10.3390/toxins9010039>
- Pérez-Vegas, A., Pérez-López, M., Barcala, E., Romero, D., & Muñoz, P. (2022). Organochlorine residues in muscle of European eels (*Anguilla anguilla*) from four Spanish Mediterranean wetlands and coastal lagoons. *Marine pollution bulletin*, 186, 114408. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114408>
- Pineda C. & Vélez S. (2018). Optimización de las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*. (Tesis doctoral). Facultad de ingeniería y ciencias agropecuarias. Universidad de Las Américas - UDLA Quito.

- Pineda López, C. C., & Vélez Salas, S. (2018). *Optimización de las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de Bacillus Thuringiensis*. Universidad de las Américas, Quito [Tesis de pregrado].
<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/9182>
- Pinos, D., Andrés-Garrido, A., Ferré, J., & Hernández-Martínez, P. (2021). Response Mechanisms of Invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Proteins. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 85(1), e00007-20.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-20>
- Piper, A. M., Batovska, J., Cogan, N. O. I., Weiss, J., Cunningham, J. P., Rodoni, B. C., & Blacket, M. J. (2019). Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience*, 8(8), giz092.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giz092>
- Plasencia O, & Villanueva E. (2015). Efecto de cuatro medios de producción sobre el crecimiento, esporulación y producción de cristales a partir de cuatro cultivos de *Bacillus thuringiensis*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú.
- Poveda E & Elpidia. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 397-403.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>
- Puerto A, & Suárez S. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2014;52 (3):372-387.
- Půža, V., & Tarasco, E. (2023). Interactions between Entomopathogenic Fungi and Entomopathogenic Nematodes. *Microorganisms*, 11(1), 163.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010163>
- Quan, M., Xie, J., Liu, X., Li, Y., Rang, J., Zhang, T., ... Ding, X. (2016). Comparative Analysis of Genomics and Proteomics in the New Isolated *Bacillus thuringiensis* X022 Revealed the Metabolic Regulation Mechanism of Carbon Flux Following

Cu²⁺ Treatment. *Frontiers in Microbiology*, 7, 792.

<http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00792>

Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* (pp. 1-18). Springer, Cham. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_1

Ragavendran, C., Mariappan, T., & Natarajan, D. (2017). Larvicidal, Histopathological Efficacy of *Penicillium daleae* against Larvae of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* Plus Biotoxicity on *Artemia nauplii* a Non-target Aquatic Organism. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 773. <http://doi.org/10.3389/fphar.2017.00773>

Reid, S., de Malmanche, H., Chan, L., Popham, H., & van Oers, M. M. (2023). Production of entomopathogenic viruses. En J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas, & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Mass Production of Beneficial Organisms* (pp. 375-406). Elsevier.

Romero Bozzetta, J. L., Canales Carrera, E. E., Menezes Huacachi, P. K., & Herbozo Rondán, S. F. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. *BIG BANG FAUSTINIANO*. 6(1): 15 - 18.

Salazar-Magallón, JA, Hernández-Velázquez, VM, Alvear-García, A., Arenas-Sosa, I., y Peña-Chora, G. (2015). Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology*, 68 (1), 103-109.

Santos, E. N., Menezes, L. P., Dolabella, S. S., Santini, A., Severino, P., Capasso, R., Zielinska, A., Souto, E. B., & Jain, S. (2022). *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. *Biochimie*, 192, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.10.003>

- Sauka D. (2017). *Bacillus thuringiensis*: ¿nuevas aplicaciones para un viejo conocido?. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Revista Argentina de Microbiología. 49(2):123-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.05.001>
- Schapovaloff M, Angeli L, Urrutia M, López M. (2015). Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina, Revista Argentina de Microbiología, Volume 47, Issue 2,138-142, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.005>.
- Seong, K. M., Mittapalli, O., Clark, J. M., & Pittendrigh, B. R. (2019). A review of DDT resistance as it pertains to the 91-C and 91-R strains in *Drosophila melanogaster*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 161, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.003>
- Tetreau, G., Andreeva, E. A., Banneville, A. S., De Zitter, E., & Colletier, J. P. (2021). How Does *Bacillus thuringiensis* Crystallize Such a Large Diversity of Toxins?. Toxins, 13(7), 443. <https://doi.org/10.3390/toxins13070443>
- Tufts, JAM, Calfee, MW, Lee, SD et al. World J Microbiol Biotechnol (2014). *Bacillus thuringiensis* as a surrogate for Bacillus anthracis in aerosol research. 30: 1453. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1576-x>
- Turnbull, P. C., Sirianni, N. M., LeBron, C. I., Samaan, M. N., Sutton, F. N., Reyes, A. E., & Peruski, L. F. (2004). MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. Journal of clinical microbiology, 42(8), 3626-34.
- Untol E, Zavaleta G, Saldaña J, Blas W & Muro J. (2015). Effect of residual power of three formulations H-14 *Bacillus thuringiensis* var. israelensis grown in "sanguaza" on the percentage of mortality in larvae of *Aedes aegypti*. SCIENDO. 17(1): 89-103.

- Valicente, F. H., Tuelher, E., Leite, M. I., Freire, F., & Vieira, C. M. (2010). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. doi: 10.18512/1980-6477/rbms.v9n1p1-11
- Valtierra L, Ayala V & Pedraza M. (2017). Caracterización Genética y Fisiológica de Mutantes de *Bacillus subtilis* deficientes en los sistemas de reparación de DNA Ung, YwqL y MMR. *Jóvenes en la Ciencia*. 2. 437-440.
- Vanderkar M, & Dulmage H. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H14, UNDP/World Bank / WHO, Geneva. Suiza, pp. 95-197.
- Vázquez Ramírez, M., Rangel-Núñez, J., Ibarra, J., Del Rincón-Castro, & M. (2015). Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 40 (6), 397-402.
- Viana, J. L., Lobo, K. dos S., Vieira Neta, M. dos R. A., Duarte, I. C. S., Delforno, T. P., Silva, J. S. da, Pinheiro, V. C. S., Roque, R. A., & Tadei, W. P. (2021). Identification techniques and culture media for the growth of *Bacillus thuringiensis* used to control vector mosquitoes: mini review. *Research, Society and Development*, 10(7), e51510716916. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16916>
- Wang, R., Qu, C., Li, M., Shi, C., Li, W., Zhang, J., & Qi, S. (2021). Health risks of exposure to soil-borne dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs): A preliminary probabilistic assessment and spatial visualization. *The Science of the Total Environment*, 772(144949), 144949. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144949>
- Wang, X., Li, Z., Li, X., Qian, H., Cai, X., Li, X., & He, J. (2016). Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism Is Unrelated to the Sporulation and Parasporal Crystal Protein Formation in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 836. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00836>

- Wielkopolan, B., & Obrepalska, S. A. (2016). Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. *Planta*, 244(2), 313–332.
<https://doi.org/10.1007/s00425-016-2543-1>
- Xiao, Y., & Wu, K. (2019). Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 374(1767), 20180316.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0316>
- Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732–2770.
<http://doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Yang, X., Zhao, S., Liu, B., Gao, Y., Hu, C., Li, W., Yang, Y., Li, G., Wang, L., Yang, X., Yuan, H., Liu, J., Liu, D., Shen, X., Wyckhuys, K. A. G., Lu, Y., & Wu, K. (2023). Bt maize can provide non-chemical pest control and enhance food safety in China. *Plant biotechnology journal*, 21(2), 391–404. <https://doi.org/10.1111/pbi.13960>
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99–117.
doi:10.1002/rmb2.12024
- Zapata, A., & Ramirez-Arcos, S. (2015). A comparative study of McFarland turbidity standards and the densimat photometer to determine bacterial cell density. *Current Microbiology*, 70(6), 907–909. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0801-2>
- Zavaleta G, Saldaña J, Blas W, Muro J. (2014). Efecto del poder residual de tres formulaciones con *Bacillus thuringiensis* h-14 var. Israelensis cultivado en “sanguaza” sobre el porcentaje de mortalidad en larvas de aedes aegypti. *Trujillo Peru. revistas unitru*. Vol. 17, Núm. 1 (2014).
- Zegeye, E. D., & Aspholm, M. (2022). Efficient Electrotransformation of *Bacillus thuringiensis* for Gene Manipulation and Expression. *Current Protocols*, 2(11).
<https://doi.org/10.1002/cpz1.588>

- Zghal, R. Z., Kharrat, M., Rebai, A., Khedher, S. B., Jallouli, W., Elleuch, J., & Tounsi, S. (2018). Optimization of bio-insecticide production by Tunisian *Bacillus thuringiensis israelensis* and its application in the field. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.002>
- Zhao, X., Hendriks, M., Deleu, E., Spanoghe, P., Höfte, M., van Overbeek, L., & Uyttendaele, M. (2023). Prevalence, attachment ability and strength of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on tomato. *Food Microbiology*, 104235, 104235. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104235>
- Zheng, C., Yu, Z., Du, C., Gong, Y., Yin, W., Li, X., Li, Z., Römling, U., Chou, S.-H., & He, J. (2020). 2-Methylcitrate cycle: a well-regulated controller of *Bacillus* sporulation. *Environmental Microbiology*, 22(3), 1125–1140. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14901>

