



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* usando  
subproductos agroindustriales de bajo costo y alta  
disponibilidad en Venezuela

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad  
Central de Venezuela, por la bachiller  
Irene del Carmen Alvarado Seijas como  
requisito parcial para optar al título de  
Licenciado en Biología

Tutora: Lcda. Roxana Gajardo

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO - 2016

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE  
GRADO DE LA Br. IRENE DEL CARMEN ALVARADO SEIJAS**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. **Irene del Carmen Alvarado Seijas**, C.I:21.718.331, titulado "Producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* usando subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad en Venezuela", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de mayo del año 2016, dejando constar que la Profa. Roxana Gajardo actuó como coordinadora del jurado examinador.



Profa. Vincenza Cervino



Profa. Nora Malaver



Profa. Roxana Gajardo  
(Tutora)

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico principalmente a Dios quien me dio la tranquilidad y serenidad para seguir adelante en esta etapa de mi vida.

Por supuesto, a mi familia, quienes creyeron en mi capacidad de lograr este objetivo, especialmente a mi madre, quién me ha brindado todo su apoyo y amor incondicional en cada paso dado a lo largo de mi camino, motivándome a ser mejor cada día y a luchar por mis metas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar, a Dios por ser mi guía durante todo mi camino e iluminarme en cada paso, por brindarme la calidez y fortaleza necesaria para cumplir cada uno de mis logros.

También agradezco a mis padres por su amor y apoyo incondicional, especialmente a mi madre, quién ha estado de la mano conmigo en los buenos y en los malos momentos, brindadome el amor y cariño que todo hijo anhela de una madre.

A mis hermanas Gladys, Zhandra y Elizabeth, quienes fueron y siguen siendo piezas indispensables en mi vida, ellas le brindan un toque de diversión y alegría a mi día a día, especialmente a mi hermana Gladys quién trajo al mundo a Daniel, el sobrino más lindo del mundo.

A mis Tíos, quienes siempre han estado pendiente de mí en cada instante, especialmente a mi Tío Luis quien es mi segundo padre, el mejor tío que una sobrina puede tener. Gracias tío por apoyarme y quererme tanto.

A Mama Carmen, mi abuela querida, quién con su amor me crío para ser la persona que soy hoy, y sin olvidar a Papa Ramón, quién desde el cielo me cuida.

A Loana, mi mejor amiga, quién me ha demostrado que si existen los verdaderos amigos. Y sin dejar afuera a Yeisimar, quién ha sido buena amiga después de todos estos años.

A mis niñas del Laboratorio de Procesos Fermentativos, Isa y Maru quienes fueron mis compañeras fieles durante toda esta etapa en el laboratorio y quienes fuera de él, también seguían y seguirán siendo las mejores. Gracias a Daya por ser tan atenta y ayudarme tanto durante mi paso por el laboratorio. También agradezco a Marla, Yuri, Carlos, Fabiola, Zule y todos aquellos quienes desde el principio me han brindado su amistad y cariño en todo momento, los quiero a todos.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, y a la Facultad de Ciencias, por permitirme desarrollar mis estudios de Licenciatura en Biología en su institución.

A Naileth Mendéz del laboratorio de Biología molecular de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por su donación de la cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizada en esta investigación.

A la Dra. Juana Vitelli, por su colaboración prestada durante la elaboración de mi trabajo de grado, así como también a Indira por su ayuda durante mis experimentos en el CVCN.

Al Laboratorio de Cromatografía de Gases, por sus servicios y colaboración requerida para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Blas Dorta por el aporte de sus conocimientos, recomendaciones y sugerencias.

Y finalmente, agradezco a mi Tutora Roxana por su atención, preocupación, disponibilidad, enseñanza y dedicación, y por el aporte de sus conocimientos que fueron fundamentales para la realización y culminación exitosa de este trabajo de tesis. Gracias por todo su apoyo y cariño durante mi paso por el Laboratorio de Procesos Fermentativos.

# ÍNDICE

|                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------|------|
| INDICE DE FIGURAS .....                                        | viii |
| INDICE DE TABLAS .....                                         | ix   |
| INDICE DE ABREVIATURAS .....                                   | xi   |
| INTRODUCCIÓN .....                                             | 1    |
| 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                         | 1    |
| 1.1 Ciclo de Vida y Esporulación .....                         | 2    |
| 1.2 Cristal Paraesporal .....                                  | 4    |
| 1.3 Proteína Cyt .....                                         | 6    |
| 1.4 Proteína Cry .....                                         | 6    |
| 1.5 Modo de acción de la Proteína Cry .....                    | 8    |
| 1.6 Condiciones de crecimiento de <i>Bt</i> .....              | 10   |
| 1.7 Requerimientos Nutricionales de <i>Bt</i> .....            | 10   |
| 1.8 Cultivo en Batch de <i>Bt</i> .....                        | 11   |
| 1.9 Formulación de Medios de Cultivo .....                     | 12   |
| 1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> como control biológico ..... | 15   |
| 2. <i>Aedes aegypti</i> .....                                  | 16   |
| 2.1 Ciclo de vida <i>Aedes aegypti</i> .....                   | 17   |
| 3. Bioensayos .....                                            | 19   |
| 4. Análisis PROBIT .....                                       | 20   |
| ANTECEDENTES .....                                             | 21   |
| 1. INVESTIGACIONES INTERNACIONALES .....                       | 21   |
| 1.1 <i>Bt</i> como control biológico .....                     | 21   |
| 1.2 Utilización de Subproductos Agroindustriales .....         | 26   |
| 2. INVESTIGACIONES NACIONALES .....                            | 29   |
| 2.1 <i>Bt</i> como control biológico .....                     | 29   |
| 2.2 Utilización de Subproductos Agroindustriales .....         | 31   |
| JUSTIFICACIÓN .....                                            | 34   |
| OBJETIVOS .....                                                | 36   |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                     | 37   |
| MATERIALES .....                                               | 37   |
| MATERIAL BIOLÓGICO .....                                       | 37   |

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| MEDIOS DE CULTIVO .....                       | 37 |
| MÉTODOS.....                                  | 41 |
| A. Realización de Pruebas Fenotípicas.....    | 41 |
| B. Preparación de Medios de Cultivo.....      | 41 |
| C. Cultivo en Batch de <i>Bti</i> .....       | 42 |
| D. Curva de crecimiento de <i>Bti</i> .....   | 43 |
| E. Cálculos de parámetros cinéticos .....     | 44 |
| F. Obtención del Complejo Espora-Cristal..... | 44 |
| G. Bioensayos con <i>Aedes aegypti</i> .....  | 45 |
| H. Análisis estadístico.....                  | 46 |
| RESULTADOS .....                              | 47 |
| A. Pruebas fenotípicas .....                  | 47 |
| B. Curvas de crecimiento bacteriano .....     | 48 |
| C. Pruebas con Vinaza .....                   | 57 |
| D. Análisis de vinaza .....                   | 62 |
| E. Bioensayos.....                            | 67 |
| DISCUSIÓN.....                                | 71 |
| CONCLUSIONES .....                            | 92 |
| RECOMENDACIONES .....                         | 93 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                             | 94 |

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                                                                        | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Ciclo de esporulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                                                                | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en estado de esporangio. .... | 5  |
| <b>Figura 4.</b> Estructura tridimensional de la proteína Cry.....                                                                           | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Esquema del modo de acción de <i>B. thuringiensis</i> en el intestino medio de un insecto sensible.....                     | 8  |
| <b>Figura 6.</b> Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .....                                                                                 | 18 |
| <b>Figura 7.</b> Pruebas bioquímicas para verificar el fenotipo de <i>Bti</i> .....                                                          | 47 |
| <b>Figura 8.</b> Micrografía óptica en contraste de fases de un cultivo de <i>Bti</i> (1000X).....                                           | 48 |
| <b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en medio de cultivo control A80.....          | 49 |
| <b>Figura 10.</b> Curva de crecimiento de <i>Bti</i> en el medio MC1 compuesto por Concentrín 21® y sales .....                              | 52 |
| <b>Figura 11.</b> Curva de crecimiento de <i>Bti</i> en el medio MC2 compuesto por Concentrín 21® y melaza.....                              | 53 |
| <b>Figura 12.</b> Curva de crecimiento de <i>Bti</i> en el medio MC3 compuesto únicamente por Concentrín 21® .....                           | 54 |
| <b>Figura 13.</b> Curva de crecimiento de <i>Bti</i> en el medio MC4 compuesto por Concentrín 21®, melaza y sales.....                       | 56 |
| <b>Figura 14.</b> Fotografías de la vinaza vieja sometida a calor hasta peso constante. ....                                                 | 64 |



## INDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Composición de la melaza de caña de azúcar.....                                                                                      | 14 |
| <b>Tabla 2.</b> Composición promedio del Concentrín 21®. ....                                                                                        | 14 |
| <b>Tabla 3.</b> Composición de la Vinaza.. ....                                                                                                      | 15 |
| <b>Tabla 4.</b> Componentes del Medio A80. ....                                                                                                      | 37 |
| <b>Tabla 5.</b> Componentes de dos formulaciones de Medio con Subproductos Agroindustriales .                                                        | 38 |
| <b>Tabla 6.</b> Componentes de Medios de Cultivo con Subproductos Agroindustriales.....                                                              | 38 |
| <b>Tabla 7.</b> Componentes del Medio Luria Bertani (LB) .....                                                                                       | 39 |
| <b>Tabla 8.</b> Componentes del Medio Columbia .....                                                                                                 | 40 |
| <b>Tabla 9.</b> Pruebas bioquímicas realizadas sobre la cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis .....                                 | 47 |
| <b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de <i>Bti</i> .....                                   | 49 |
| <b>Tabla 11.</b> Crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis en dos formulaciones con subproductos agroindustriales, S1 y S2 ..... | 51 |
| <b>Tabla 12.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de <i>Bti</i> en MC1 .....                            | 52 |
| <b>Tabla 13.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de <i>Bti</i> en MC2.....                             | 54 |
| <b>Tabla 14.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de <i>Bti</i> en MC3.....                             | 55 |
| <b>Tabla 15.</b> Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de <i>Bti</i> en MC4.....                             | 56 |
| <b>Tabla 16.</b> Títulos de los cultivos de <i>Bti</i> a las diferentes concentraciones de vinaza .....                                              | 57 |

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 17.</b> Títulos de los cultivos de <i>Bti</i> a las diferentes concentraciones de vinaza ajustando el pH a 7 .....                                   | 58 |
| <b>Tabla 18.</b> Títulos de los cultivos de <i>Bti</i> a las diferentes concentraciones de vinaza hervida....                                                 | 59 |
| <b>Tabla 19.</b> Títulos de los cultivos de <i>Bti</i> a las diferentes concentraciones de vinaza hervida ajustando a pH 7 .....                              | 60 |
| <b>Tabla 20.</b> Títulos de los cultivos de <i>Bti</i> a las diferentes concentraciones de vinaza nueva ajustando el pH a 7 .....                             | 61 |
| <b>Tabla 21.</b> Resumen de los títulos de <i>Bti</i> obtenidos en diferentes medios de cultivo .....                                                         | 62 |
| <b>Tabla 22.</b> Análisis de vinazas suministrados por el LCG, del Instituto de Ciencias de la Tierra, UCV. ....                                              | 63 |
| <b>Tabla 23.</b> Peso seco constante de la vinaza (60 °C / 72 h) .....                                                                                        | 64 |
| <b>Tabla 24.</b> Aporte de cada elemento en el medio S1 con vinaza (20 % v/v) y en el medio A80. ....                                                         | 67 |
| <b>Tabla 25.</b> Títulos de esporas de <i>Bti</i> en los diferentes medios y concentración de esporas inoculadas en el bioensayo con <i>Ae. aegypti</i> ..... | 68 |
| <b>Tabla 26.</b> Mortalidad de larvas de <i>Ae. aegypti</i> en bioensayos para evaluar la toxicidad de <i>Bti</i> 69                                          |    |
| <b>Tabla 27.</b> Títulos de <i>Bti</i> a partir del homogenato de larvas muertas de <i>Aedes aegypti</i> en los bioensayos .....                              | 70 |

## INDICE DE ABREVIATURAS

|                                                                   |                                                 |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Bt:</b> <i>Bacillus thuringiensis</i>                          | <b>pen<sup>r</sup>:</b> Penicilina resistente   |
| <b>Bti:</b> <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> | <b>stp<sup>s</sup>:</b> Estreptomicina sensible |
| <b>Btk:</b> <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>    | <b>hem<sup>+</sup>:</b> Hemólisis positiva      |
| <b>Ae. aegypti:</b> <i>Aedes aegypti</i>                          | <b>µm:</b> Micrómetros                          |
| <b>MC1:</b> Medio de Cultivo 1                                    | <b>kDa:</b> Kilodalton                          |
| <b>MC2:</b> Medio de Cultivo 2                                    | <b>µg:</b> Microgramo                           |
| <b>MC3:</b> Medio de Cultivo 3                                    | <b>mL:</b> Mililitro                            |
| <b>MC4:</b> Medio de Cultivo 4                                    | <b>LCG:</b> Lab. Cromatografía Gaseosa          |
| <b>S1:</b> Medio Subproductos 1                                   | <b>ng:</b> Nanogramo                            |
| <b>S2:</b> Medio Subproductos 2                                   | <b>rpm:</b> Revoluciones por minuto             |
| <b>LB:</b> Medio Luria-Bertani                                    | <b>UV:</b> Ultravioleta                         |
| <b>UFC:</b> Unidades Formadoras de Colonias                       | <b>h:</b> Horas                                 |
| <b>PCR:</b> Reacción en Cadena Polimerasa                         | <b>Ca:</b> Calcio                               |
| <b>DL<sub>50</sub>:</b> Dosis letal 50                            | <b>Fe:</b> Hierro                               |
| <b>CL<sub>50</sub>:</b> Concentración letal 50                    | <b>Mg:</b> Magnesio                             |
| <b>CL<sub>90</sub>:</b> Concentración letal 90                    | <b>C:</b> Carbono                               |
| <b>Tg:</b> Tiempo generacional                                    | <b>N:</b> Nitrógeno                             |
| <b>µ<sub>máx</sub>:</b> Velocidad máxima de crecimiento           | <b>Zn:</b> Zinc                                 |
| <b>esp:</b> Esporas                                               | <b>Mn:</b> Manganeseo                           |
| <b>cél:</b> Células                                               | <b>K:</b> Potasio                               |
| <b>lb:</b> Libras                                                 | <b>Cl:</b> Cloro                                |
| <b>% p/v:</b> Porcentaje peso-volumen                             | <b>O:</b> Oxígeno                               |
| <b>% v/v:</b> Porcentaje volumen-volumen                          | <b>ARNm:</b> Ácido ribonucleico mensajero       |

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram positiva capaz de formar un cristal paraesporal que contiene  $\delta$ -endotoxinas, también llamadas proteínas Cry, las cuales son tóxicas para insectos. Por su efectividad y especificidad, *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) muestra efectos entomopatógenos sobre *Aedes aegypti*, vector principal del dengue, fiebre amarilla, fiebre chikungunya, entre otras enfermedades, tanto en Venezuela como en el mundo. Por esta razón, se hacen atractivas las investigaciones sobre las formulaciones y optimización de la producción de esta bacteria, como una estrategia de control biológico. Este trabajo tuvo como objetivo principal desarrollar un medio de cultivo a partir de subproductos agroindustriales (Melaza, Vinaza y Concentrín 21®), que permitiera el crecimiento de *Bti*, y la obtención del complejo espora-cristal. Luego, se pretendió evaluar la actividad entomopatógena de *Bt* mediante bioensayos contra larvas de *Ae. aegypti*. Se obtuvo un título de esporas por el orden de  $10^8$  esp/mL en los medios de cultivo donde se utilizó sólo melaza y Concentrín 21®. Estos títulos fueron comparables a los obtenidos en el control con el medio A80. Los medios que presentaban vinaza en su composición presentaron títulos por el orden de  $10^5$  esp/mL, por lo que no fueron utilizados para los bioensayos con *Ae. aegypti*. Los bioensayos mostraron una mortalidad del 99 % en las larvas para los medios de cultivo que contenían sólo melaza y Concentrín 21®. Concluyendo, que la melaza como fuente de carbono y energía, y el Concentrín 21® como fuente de nitrógeno, pueden ser utilizados como constituyentes dentro de formulaciones para el crecimiento de *Bti*, ya que demostró eficacia a través de la obtención de altos títulos bacterianos y de altos porcentaje de mortalidad en larvas. Por el contrario, la vinaza no se recomienda como sustituyente aportador de fuente de sales en el crecimiento de *Bti*. Los bioensayos demostraron que efectivamente *Bti* actúa como bioinsecticida para el control de *Ae. aegypti*

# INTRODUCCIÓN

## 1. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) fue aislada por primera vez en Japón por Ishiwata en 1901, en larvas enfermas del gusano de seda, *Bombyx mory* (Lepidoptera, Bombycidae) causándole una enfermedad que él llamo, la enfermedad de sotto. En 1915, Berliner, en Alemania, aisló la primera bacteria a partir de larvas del Lepidóptero *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae), la palomilla de la harina del Mediterráneo. La denominó *Bacillus thuringiensis*, en honor a la región alemana de donde la aisló: Thuringia (Sansinenea, 2012). Hoy en día, *Bacillus thuringiensis* es reconocida en todo el mundo como *Bt* por sus propiedades insecticidas.

Dentro de las características de *Bt*, se conoce que es una bacteria Gram-positiva, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (Helgason *et al.*, 2000). *Bt* es de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 µm de largo por 1 a 1,2 µm de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Gordon, 1989). Se encuentra de forma natural en suelo y plantas. Se caracteriza por ser altamente cosmopolita y por la producción de un cuerpo paraesporal o cristal conformados por una o varias toxinas denominadas δ-endotoxinas (Martin y Travers, 1989; Chak *et al.*, 1994; Bernhard *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998). Estas toxinas se destacan por presentar actividad biocida contra gran variedad de artrópodos como lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, homópteros, y ácaros, (Sauka y Benitende, 2008), entre otros, así como organismos de otros *Phyla* como nemátodos, tremátodos y protozoarios (Feitelson, 1993).

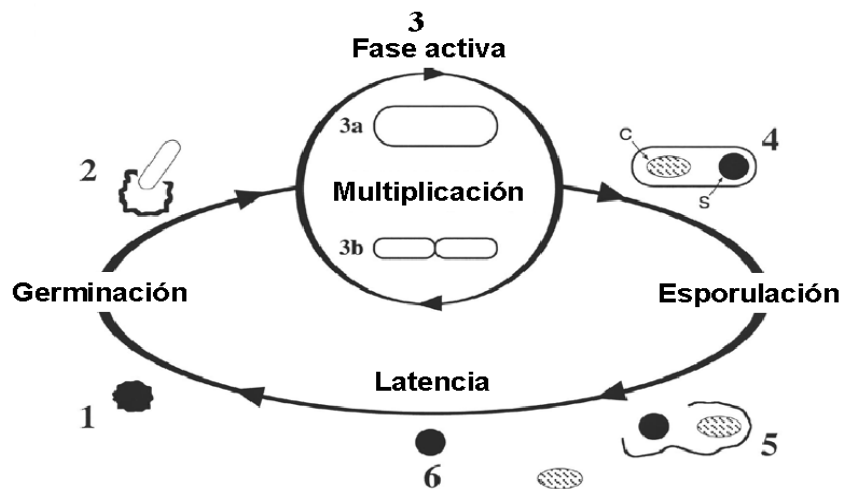
*Bacillus thuringiensis* carece de la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa por lo que no se completa el ciclo de Krebs, en su lugar se realiza el ciclo del ácido aminobutírico, dando como producto el succinato que retoma al ciclo de Krebs (Aronson, 1976).

*B. thuringiensis* puede ser fácilmente observada por microscopia óptica de contraste de fases, pudiéndose distinguir claramente los esporangios conteniendo las esporas elipsoidales de alta refringencia y cuerpos cristalinos con menor índice de refracción y muy variada morfología. Del cuerpo cristalino se han descrito morfologías bipiramidales, cuboidales, ovales, cuadrados, rectangulares, circulares, punteados y amorfos (Cerón, 2004).

*Bt* es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad de catalasa (Sneath, 1986). En medios de cultivo convencionales las colonias de *Bt* se observan en forma circular con bordes irregulares, perfil plano, color marfil claro, con aspecto harinoso y ceroso. El diámetro que alcanza en la placa depende de la densidad de colonias que posee (Maduell, 2007).

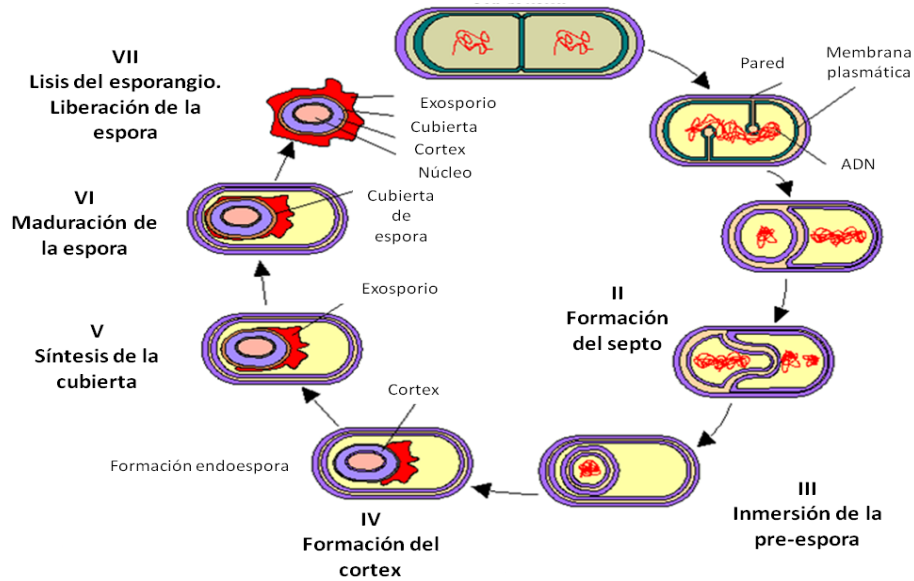
### **1.1 Ciclo de Vida y Esporulación**

Durante su ciclo de vida, *Bt* presenta dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo y la fase de esporulación (figura 1). En la fase de crecimiento vegetativo, las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min, dependiendo del medio de cultivo, y la fase de esporulación, la cual es un proceso de diferenciación de bacteria a espora. La esporulación es inducida, principalmente, por una pauperización de los recursos nutritivos presentes en el medio. El proceso dura entre 6 y 8 horas e induce toda una serie de cambios morfológicos y fisiológicos remarcables que culminan en la producción, a partir de una sola célula, de dos compartimentos bien definidos: el esporangio, que encierra el segundo compartimento, la espora (Errington, 1993).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*. 1: La bacteria se encuentra en forma de espora hasta encontrar nutrientes para su germinación, 2: Inicia la germinación de la espora por el favorecimiento de las condiciones del medio, 3: Comienza la duplicación por fisión binaria, 4: Formación de la espora (s) y del cristal (c), 5: Lisis de la bacteria y liberación del cristal y la espora, 6: Por falta de nutrientes, la bacteria entra en fase esporulativa y se mantiene en estado de latencia. Tomado de: [www.meddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/fig3.png](http://www.meddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/fig3.png)

Siete etapas definen los cambios morfológicos que ocurren durante la esporulación de *Bt* (figura 2). Durante la primera etapa, se presenta el DNA en forma de filamento axial. En la segunda etapa ocurre mitosis asimétrica que permite la formación de dos tipos de célula: la preespora y el esporangio (Reyter, 1965). En la tercera etapa, ocurre el envaginamiento de una de las formaciones asimétricas en un polo de la célula dando lugar a la formación de una incipiente membrana de la espora. El cristal, en *Bt*, comienza a ser visible en esta etapa. Durante la fase IV surge la pared primordial de la célula y se forma el córtex entre la membrana interna y externa. En la fase siguiente (Estadio V) se forman las capas de la cubierta de la espora, la cual es rodeada completamente por el exosporio. Todas las características de resistencia, físicas y químicas, de la espora son debidas a estas dos capas protectoras. En la fase VI, la espora termina de madurar y en *Bt* el cristal ha llegado a su tamaño máximo. La etapa final permite la liberación de la espora gracias a la lisis del esporangio (Estadio VII) (Errington, 1992; Stratiger y Losick, 1996).



**Figura 2.** Ciclo de esporulación de *Bacillus thuringiensis*. Tomado de: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/images/09espo2.gif>

## 1.2 Cristal Paraesporal

La característica primordial que define a la especie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es la presencia de un cuerpo paraesporal, llamado cristal, responsable de la actividad tóxica. Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y formas, como se mencionó anteriormente.

Los cristales de *Bt* pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo (West *et al.*, 1984) y, al igual que sus esporas, también pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta (Pusztai *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1993). El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular (Sauka y Benitende, 2008) (Figura 3). Los cristales producidos por *Bt* se solubilizan a pH alcalino (Gringorten *et al.*, 1992). También se requiere



un medio ambiente reductor ya que los puentes disulfuro son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas de 130 kDa (Knowles, 1994).



**Figura 3.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en estado de esporangio. C: cristal paraesporal; E: espora. Barra, 0,5  $\mu$ m. Tomado de Sauka y colaboradores (2008).

Dicho cristal es producido hacia el final de la fase de esporulación llegando a constituir alrededor de un 30 % del peso total del microorganismo (Lambert y Peferoen, 1992). Además de la  $\delta$ -endotoxina *Bt* posee la capacidad de producir otra serie de factores como la alfa y beta exotoxinas, así como varias enzimas del tipo quitinasas, fosfolipasas y proteasas, las cuales aparentemente están soportando la patogenicidad de células vegetativas durante la colonización del hospedero (Lambert y Peferoen, 1992).

Existen dos familias de  $\delta$ -endotoxinas: las proteínas Cry (Crystal) y Cyt (Cytolytic) (Juárez, 2004). Las proteínas Cry son cualquier proteína paraesporal de *Bt* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las actuales proteínas Cry (Bravo, 2004).

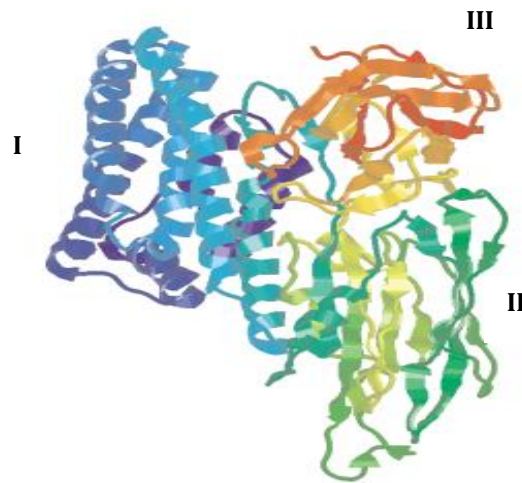
### 1.3 Proteína Cyt

Las proteínas Cyt no presentan homología a nivel de secuencia primaria, ni terciaria con las toxinas Cry. La estructura tridimensional de las toxinas Cyt presentan un solo dominio en el cual las capas externas son  $\alpha$ -hélices envolviendo a estructuras de  $\beta$ -plegada. Algunos datos indican que estas proteínas también afectan la permeabilidad de la membrana plasmática de las células del intestino (Bravo, 2004). La toxina Cyt1A se agrega en la superficie de la célula blanco pero no en solución, justo antes de unirse a la superficie de la célula. La  $\alpha$ -hélices A y C están involucradas en la interacción con la membrana y también en la interacción molecular (Gazit y Shai, 1993). Cuando se expresa independientemente la toxina Cyt, su actividad biocida en larvas de dípteros es muy baja (Crickmore *et al.*, 1995). La alta efectividad de la cepa *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* que contiene toxinas Cry y Cyt y la ausencia de insectos resistentes a esta mezcla de toxinas se debe a este fenómeno de sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt (Bravo, 2004).

### 1.4 Proteína Cry

La proteína Cry está compuesta por tres dominios estructurales discretos (Figura 4). El dominio I está formado por siete estructuras  $\alpha$ -hélice anfipáticas, donde una hélice central, hidrofóbica, está rodeada por las otras seis. Se propone que participa en la formación de poro en la membrana de las células del intestino del insecto susceptible. El dominio II está formado por tres láminas de estructuras  $\beta$  en antiparalelo y participa en la interacción con el receptor siendo así un determinante muy importante de la especificidad. Finalmente, el dominio III es un  $\beta$ -sandwich que también parece estar involucrado en especificidad y que participa en la protección a proteasas. Las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al

inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica (Knowles y Ellar, 1987).

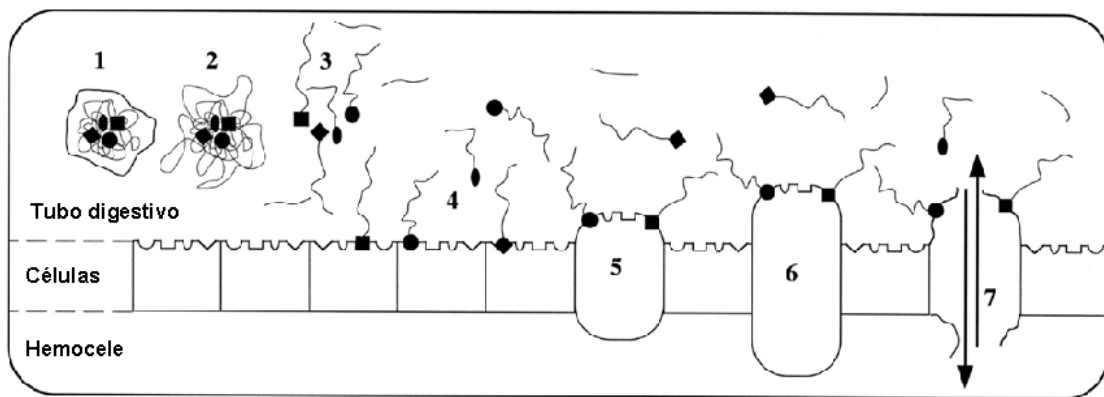


**Figura 4.** Estructura tridimensional de la proteína Cry.  
Tomada de: De Maag *et al.* (2001)

En 1989, Hofte y Whiteley propusieron una nomenclatura y clasificación de las proteínas Cry basados en la similitud de su secuencia de aminoácidos y el rango de especificidad. En esos años, las proteínas Cry I, Cry II, Cry III y Cry IV eran las específicas contra lepidópteros, lepidópteros-dípteros, coleópteros y dípteros, respectivamente. Las clases V y VI, activas contra nematodos, fueron consideradas posteriormente en la clasificación por Feitelson y colaboradores en 1992. En 1998, Schnepf y colaboradores propusieron una nueva clasificación basada solamente en la similitud de secuencias primaria entre las proteínas Cry. La nomenclatura actual de las toxinas Cry las agrupa como: 1. Proteínas tóxicas a lepidópteros grupos Cry1, Cry2 y Cry9; 2. Toxinas activas contra coleópteros grupos Cry3, Cry7 y Cry8; 3. Proteínas con actividad dual grupos Cry1B y Cry1I; 4. Proteínas con actividad nematicida, grupos Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14; 5. Proteínas tóxicas a dípteros, grupos Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las Cyt.

### 1.5 Modo de acción de la Proteína Cry

La actividad de la  $\delta$ -endotoxina está confinada al tracto digestivo de los insectos, es decir, para que las protoxinas de *B. thuringiensis* tengan efecto, el insecto debe ingerir el cristal. El órgano blanco de las toxinas de *B. thuringiensis* es el intestino medio del insecto, el cual es un epitelio tubular simple cuya arquitectura domina su interior. En la Figura 5 se representa esquemáticamente el modo de acción de *Bt*.



**Figura 5.** Esquema del modo de acción de *B. thuringiensis* en el intestino medio de un insecto sensible. En la fase 1, el cristal llega al intestino del insecto y por la acción de proteasas (2) es activada la toxina (3). La toxina activa hace contacto con receptores específicos de las células del epitelio del intestino del insecto (4). La adhesión de la toxina a la membrana plasmática crea poros (5) que inducen el desequilibrio osmótico (6) hasta producir la lisis celular (7). Cortesía de Dr. J. O. Lacoursière y Dr. J. Boisvert, Université du Québec à Trois-Rivières. Tomado de [www.meddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/fig5.png](http://www.meddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/fig5.png)

Los receptores específicos para la  $\delta$ -endotoxina están localizados en la membrana apical de la célula globular, cuya disrupción trae como resultado la formación de un poro, es decir, la interacción entre la proteína y su receptor lleva a un desbalance osmótico, que resulta en el intercambio de iones y de agua, y con ello la lisis celular (Tanada *et al.*, 1993). Otra característica importante es que el intestino de los insectos susceptibles tiene un pH del fluido lumenal de aproximadamente 12; una condición que se requiere para la disolución del cristal; usualmente soluble sólo sobre pH 9.5 (Ananda *et al.*, 1996). Cabe destacar que los sitios de

recepción difieren entre las endotoxinas y esto puede explicar las variaciones en la especificidad de insectos sensibles a las diferentes subespecies de *B. thuringiensis*.

Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño (Bravo, 2004). Causando que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, y causa como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y calciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que proliferan (Bravo, 2004). Finalmente, eliminada la barrera entre el intestino y el hemocele, se produce una disminución del pH en el intestino y un incremento del pH en el hemocele, lo cual conlleva a la germinación de las esporas y multiplicación de las células vegetativas de *B. thuringiensis* en el hemocele (Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001) y la proliferación de bacterias en la hemolinfa. La muerte de las larvas ocurre por inanición y septicemia. Entre los síntomas presentados por las larvas susceptibles se encuentran: cese de la ingesta de alimentos, la parálisis del intestino y partes bucales, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Gupta *et al.*, 1985; Aronson *et al.*, 1986). Estos cristales son capaces de producir la muerte de larvas sensibles entre los 6 minutos y 12 horas posteriores a su ingestión (Luthy y Studer, 1986; Sutherland y Khoo, 1987)

### **1.6 Condiciones de crecimiento de *Bt***

El crecimiento de *Bt* se lleva a cabo normalmente a un rango de temperatura entre 27 °C y 33 °C. Sin embargo, la producción óptima de endotoxina ocurre a los 30 °C; a más de 45 °C se produce una disminución en la producción de los cristales, y por ende en una baja actividad insecticida (Carrera, 2009). A menos de 20 °C se produce una disminución en la velocidad de crecimiento de la bacteria (Abarca *et al.*, 1992). Por su parte, el pH es un parámetro importante y es necesario ajustar los medios de cultivo para mantener este parámetro en un valor mayor a 5.0. El crecimiento se favorece en un pH entre 5.6 y 8.5 (Gutiérrez, 1993). El pH inicial debe estar entre 6.8 y 7.2, durante las primeras 8 a 12 horas. Posteriormente, el pH decrece a 5.8; dada la liberación acetato consecuencia del metabolismo de *Bt*. Cuando el acetato es consumido, el pH se incrementa lentamente. Al final del proceso en el medio de cultivo el pH oscila 7.5 y 8.0 (Fernández y Larrea, 2002). Las altas velocidades de aireación son esenciales para la formación de espora y toxina (Dulmage, 1981; Zamola *et al.*, 1981; Arcas *et al.*, 1987).

### **1.7 Requerimientos Nutricionales de *Bt***

Es necesario formular un medio de cultivo apto para el crecimiento, esporulación y formación de los cristales de *Bt*, pues de ello depende la calidad tóxica del cristal (Mercado *et al.*, 1998). El medio de cultivo empleado debe contener una fuente de carbono que suministra la energía para los procesos anabólicos, una fuente de nitrógeno y sales minerales, para el crecimiento, esporulación y síntesis de las endotoxinas (Escobar *et al.*, 2004).

Como componente que aporta la fuente de carbono en un medio se emplean la glucosa, fructosa, almidones y melazas (Peñalver, 2005; Anderson, 2011; García, 2014). La ausencia de carbohidratos metabolizables causa una defectuosa esporulación y formación de la protoxina

(Escobar *et al.*, 2004). En el caso de las fuentes de nitrógeno, se ha reportado que este microorganismo requiere de aminoácidos esenciales y otras formas orgánicas de nitrógeno las cuales pueden ser la harina de maíz, trigo, pescado, soya, extracto de levadura y caseína (Gutiérrez, 1993). Los microelementos que deben agregarse son el calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio (Palacios, 1993). En un proceso aeróbico, como en el caso de *Bt*, el oxígeno es un suministro clave. Debido a la baja solubilidad del oxígeno en soluciones acuosas, la transferencia continua de este elemento de la fase gas a líquido para mantener el metabolismo oxidativo de las células es decisiva (Amicarelli *et al.*, 2006).

### **1.8 Cultivo en Batch de *Bt***

Un microorganismo sólo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible y si los factores ambientales son adecuados. En un cultivo en batch o cultivo por lotes, el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos, hasta niveles que inhiben el crecimiento. En estos cultivos, los nutrientes no se renuevan y, por consiguiente, el crecimiento es exponencial sólo durante unas pocas generaciones (Tortora *et al.*, 2007).

En un cultivo en batch o cultivo por lotes de *Bt*, el aumento en la masa celular, como consecuencia del cambio en el número de células por unidad de tiempo ( $\mu_{\text{máx}}$ ), permite establecer una curva típica de crecimiento en la que se pueden observar las diferentes fases de la misma. Inicialmente, se tendrá la fase de latencia, en la cual las bacterias se adaptan al medio donde fueron inoculadas. Esta fase no siempre existe, y su presencia dependerá del medio donde se haya cultivado el pre-inoculo. Luego, en la fase exponencial, las células comienzan a dividirse a su velocidad máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ), y su tiempo de generación, que es el

tiempo en el cual toda la población se duplica, llega a un mínimo constante (Tortora *et al.*, 2007). Durante la fase exponencial, a nivel experimental relacionando el incremento de la biomasa a través del tiempo, puede calcularse la  $\mu_{\text{máx}}$  como la pendiente de la curva que se genera. El crecimiento de *Bt*, y por ende la pendiente de la curva ( $\mu_{\text{máx}}$ ), depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura, pH, la biomasa producida y el tiempo de generación. Finalmente, el crecimiento cesa, ya sea por agotamiento de nutrientes, por acumulación de producto inhibitorio o algún cambio en el ambiente fisicoquímico. Esta etapa se conoce como fase estacionaria, durante la cual la biomasa permanece constante (Ramírez *et al.*, 2010).

En el desarrollo de un bioinsecticida con base en *Bt*, la fase estacionaria es muy importante. Durante esta fase las células vegetativas pasan a la fase esporulativa, por lo que se espera ocurra la formación del complejo espора-cristal. Es por tanto, de real interés debido a que dichos cristales contienen la toxicidad que le confiere a *Bt* la característica de bioinsecticida.

### **1.9 Formulación de Medios de Cultivo**

La optimización de un medio de cultivo es un factor fundamental para incrementar tanto el rendimiento como la productividad en un proceso de fermentación. Este tipo de desarrollo permite realizar escalamientos a nivel industrial que usualmente suelen requerir de gran inversión monetaria. La utilización de *Bt* como insecticida requiere de formulaciones de medios de cultivo óptimos que permitan el correcto crecimiento de la bacteria.

En este sentido, la formulación de medios de cultivo con subproductos agroindustriales es una estrategia para la disminución de los costos al momento de realizar el escalamiento a



nivel industrial. Para ello, se tendrá que satisfacer el suministro con una fuente de carbono adecuada, una fuente de nitrógeno y requerimientos minerales (Maldonado, 1994).

El papel de *Bt* en la naturaleza ha sido una pregunta que quizás se han venido planteando un gran número de investigadores en todo el mundo. Desde principios de la década de 1920, con el desarrollo de los primeros intentos de emplear este microorganismo como estrategia de control de una plaga agrícola (*Ostrinia nubilales*, plaga de los cereales), en el sureste Europeo (Frankenhuyzen, 1993). Por lo que existe interés por encontrar aislamientos con nuevas y mejores actividades, así como de mejorar las formulaciones de productos comerciales existentes, y de generar productos de última generación. La formulación de medios de cultivo para el crecimiento de *B. thuringiensis* debe tener en cuenta los requerimientos necesarios para el desarrollo del complejo espora-cristal, el cual es el factor de interés para su utilización como insecticida.

Dentro de los subproductos agroindustriales que se han usado en el diseño de medios de cultivo para *Bt* se encuentran el agua de maceración de maíz y la melaza (Brazón, 1998), y Concentrín 21® (Peñalver, 2005), suero de leche y almidón (Içgen *et al.*, 2002), lodos de aguas residuales (Vidyarthi *et al.*, 2002), harina de pescado (Zouari *et al.*, 2002), haba de soja (Yezza *et al.*, 2005), entre otros.

Entre los sustitutos de la glucosa, usados con mayor frecuencia como fuente de carbono, se encuentra la melaza. Este jarabe o líquido denso y viscoso, es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali, que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado, así como los formados durante el proceso de manufacturación del azúcar (Peñalver, 2005). La composición porcentual de la melaza se encuentra en la Tabla 1 (Vega *et al.*, 2008).

**Tabla 1.** Composición de la melaza de caña de azúcar. Tomado de Vega y colaboradores (2008)

| COMPONENTE                             | COMPOSICIÓN (%) |
|----------------------------------------|-----------------|
| AGUA                                   | 20              |
| SACAROSA                               | 35              |
| GLUCOSA                                | 7               |
| LEVULOSA                               | 9               |
| OTRAS SUSTANCIAS REDUCTORAS            | 3               |
| OTROS CARBOHIDRATOS                    | 4               |
| CENIZAS                                | 12              |
| COMPUESTOS NITRÓGENADOS                | 4,5             |
| COMPUESTOS NO NITRÓGENADOS             | 5               |
| CERAS, ESTEROIDES Y ESTEROFOSFOLÍPIDOS | 0,4             |

Por su parte, el Concentrín 21® es una mezcla deshidratada de agua de maceración de maíz y germen desgrasado de maíz (Ver composición en Tabla 2), que se ha usado en formulaciones de medios de cultivos para *Bt* como fuente de nitrógeno en sustitución del extracto de levadura (Peñalver, 2005).

**Tabla 2.** Composición promedio del Concentrín 21®. Tomado de Peñalver (2005).

| MUESTRA               | SIN ESTERILIZAR | ESTERILIZADO |
|-----------------------|-----------------|--------------|
| HUMEDAD               | 5.30            | 2.03         |
| CENIZAS               | 1.16            | 0.78         |
| GRASAS                | 4.70            | 5.30         |
| FIBRA CRUDA           | 9.05            | 15.87        |
| PROTEÍNAS (NITRÓGENO) | 20.62           | 23.75        |
| CARBOHIDRATOS         | 58.54           | 52.70        |

De igual manera, la vinaza es un subproducto agroindustrial que ha sido utilizada como fuente de sales en la formulación de un medio de cultivo para el crecimiento de *Bt* (Peñalver, 2005). La vinaza se origina durante la destilación del alcohol a partir de la melaza de caña de azúcar y es producido por Ron Santa Teresa C.A., Edo. Aragua, Venezuela. La composición de la vinaza se encuentra reflejada en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Composición de la Vinaza. Tomado de Peñalver (2005).

| COMPONENTE                                           | PROMEDIO PORCENTUAL |
|------------------------------------------------------|---------------------|
| SÓLIDOS TOTALES                                      | 11.63               |
| MATERIA ORGÁNICA                                     | 11.00               |
| NITRÓGENO TOTAL (N)                                  | 0.18                |
| ANHÍDRIDO FOSFÓRICO (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) | 0.04                |
| ÓXIDO DE POTASIO (K <sub>2</sub> O)                  | 1.01                |
| ÓXIDO DE CALCIO (CaO)                                | 0.22                |
| ÓXIDO DE MAGNESIO (MgO)                              | 0.10                |
| AZUFRE (S)                                           | 0.0046              |
| HIERRO (Fe)                                          | 0.0005              |
| MANGANESO (Mn)                                       | 0.001               |
| AGUA                                                 | 88                  |

### **1.1 *Bacillus thuringiensis* como control biológico**

El control biológico se define como el uso de microorganismos capaces de combatir efectos no deseados de plagas en los cultivos agrícolas y en salud pública (Martínez, 2005). Se considera entonces como una aplicación natural, cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre (Carrera, 2009). Entre los agentes microbianos utilizados dentro de esta estrategia se encuentran los virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos (Maduell, 2007).

*Bt* es comúnmente utilizado hoy en día como control de plagas por sus claras ventajas sobre insecticidas químicos, como alta especificidad, inocuidad sobre el medio ambiente y lento desarrollo de resistencia (Ochoa *et al.*, 2009). Las células esporuladas y cristales de *Bt* pueden producirse con métodos convencionales, haciéndolas competitivas en costo con relación a los insecticidas químicos (Gallegos, 1985). Actualmente, el potencial de *Bt* se ha reconocido ampliamente alrededor del mundo, de tal forma que las industrias en muchos países producen una o más formulaciones, principalmente con la subespecie *kurstaki* (*Btk*),

usada en el control de insectos lepidópteros, y con la subespecie *israelensis* (*Bti*) contra dípteros.

## **2. *Aedes aegypti***

*Aedes aegypti* es un insecto que se encuentra distribuido en todo el mundo, donde las larvas y pupas siempre son acuáticas (Faust *et al.*, 1974). Este díptero figura entre los vectores de enfermedades importantes de los miembros de la subfamilia *Culicidae* (Porter *et al.*, 1993). *B. thuringiensis* var. *israelensis* se presenta como una alternativa atractiva para el control de *A. aegypti*, pues tiene la capacidad de causar septicemia a la fase larval del insecto entre el tercer y cuarto estadio, mediante la apertura de poros en la membrana de las células del epitelio intestinal.

Entre las enfermedades transmitidas por este vector se encuentran el dengue, la fiebre hemorrágica, la fiebre amarilla, la Chikungunya y actualmente el virus Zika, las cuales representan un serio problema de salud pública en todo el mundo, con un número de personas infectadas cada año entre 50 y 100 millones en más de 100 países (OMS, 2013). La incidencia del dengue ha aumentado exponencialmente en los últimos 35 años a escala mundial (Armas *et al.*, 2008). Según una estimación reciente, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año (intervalo creíble del 95 %: 284 a 528 millones), de los cuales 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (cualquiera que sea la gravedad de la enfermedad) (Bhatt *et al.*, 2013). Hasta Junio del año 2015 se contabilizaron en Venezuela, 12.596 casos de dengue, 13.128 casos de infectados por Chikungunya y 60.933 casos de Malaria según la Sociedad Venezolana de Salud Pública y la Red Defendamos la Epidemiología (Fuente: La Razón).

Las enfermedades causadas por la picada al hombre de *Ae. aegypti*, pueden en algunos casos, cursar en forma asintomática, o producir síntomas en común como fiebres elevadas (40 °C), dolor de cabeza intenso, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos y/o salpullido, todo esto, dentro de un periodo de incubación de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado. Destacándose entre estos síntomas, fuertes dolores musculares y articulares que pueden ser recurrentes en el caso de la fiebre Chikungunya (Periago *et al.*, 2007).

## **2.1 Ciclo de vida *Aedes aegypti***

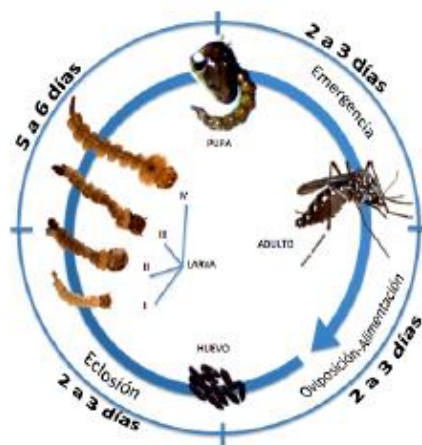
El ciclo de vida de *Ae. aegypti* dura entre 15 y 30 días (Figura 6). Los huevos son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa en 48 horas, si el ambiente es húmedo y cálido, pero puede prolongarse hasta cinco días con temperaturas más baja. Los huevos eclosionan en un lapso de 2 a 3 días (Montero, 2009).

Las larvas que emergen inician un ciclo de 4 estadios larvales y son exclusivamente acuáticas. La fase larval es el período de mayor alimentación y crecimiento. La duración de esta etapa depende de la temperatura, la disponibilidad de alimentos y la densidad de larvas que ocupan el espacio. En condiciones óptimas, con temperaturas de 25 a 29 °C, el período desde la eclosión hasta la pupación puede ser de 5 a 6 días. Los tres primeros estadios larvales se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto demora más tiempo con mayor aumento de tamaño y peso. Las larvas de *Ae. aegypti* pueden diferenciarse a simple vista de las larvas de otras especies por un sifón más corto que el de la mayoría de los otros culícidos (Montero, 2009).

Las pupas no se alimentan y presentan un estado de reposo donde se producen importantes modificaciones anatómico-fisiológicas hasta la emergencia de los adultos. En esta

fase, estos insectos reaccionan inmediatamente a estímulos externos tales como vibraciones y se desplazan activamente en el espacio que ocupan. Las pupas se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad. Este período dura de 1 a 3 días en condiciones favorables, con temperaturas entre 28 y 32 °C. La pupa tiene en la base del tórax un par de tubos respiratorios o trompetas que atraviesan la superficie del agua y permiten la respiración. En la base del abdomen poseen un par de remos, paletas o aletas natatorias que sirven para el nadar (Montero, 2009).

Al emerger de la pupa, el insecto adulto permanece en reposo permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y las alas. Dentro de las 24 horas siguientes a la emergencia pueden aparearse iniciándose la etapa reproductora del insecto. La alimentación sanguínea en las hembras es necesaria como fuente de proteína para el desarrollo de los huevos. La oviposición generalmente, se produce hacia el final de la tarde. La hembra grávida es atraída hacia recipientes oscuros o sombreados con paredes duras, sobre las que deposita sus huevos y prefiere aguas relativamente limpias con poco contenido de materia orgánica (Montero, 2009).



**Figura 6.** Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. El adulto pone los huevos en recipientes con agua donde estos eclosionan. La larva se desarrolla y se convierte en pupa en el agua y de esta pupa emerge el adulto.  
Tomado de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/inte>

### 3. Bioensayos

El uso de bioensayos como medio de prueba para cuantificar la actividad insecticida de preparaciones de *B. thuringiensis* fue reportado por Splittstoesser y McEwen (1961) y posteriormente entre Dimalge *et al.* (1971) establecieron un método estándar para expresar la actividad insecticida de este microorganismo utilizando un insecto blanco (Martínez, 2004).

Un bioensayo corresponde a la evaluación del efecto de un estímulo determinado, ya sea químico o físico, sobre una población de organismos vivos. En forma más específica, un bioensayo de insecticidas se puede definir como todo aquel experimento en donde se mide la potencia de un producto usando como referencia una colonia estandarizada de insectos (Busvine, 1971).

Un bioensayo con *B. thuringiensis* esencialmente mide la interacción entre un insecto blanco específico y la proteína evaluada. De acuerdo con esto, la respuesta más fácil de observar en un insecto es la mortalidad y la expresión más empleada de la actividad tóxica de un aislamiento de *Bt* es la concentración letal medio o  $CL_{50}$ . La  $CL_{50}$  es un parámetro que indica la concentración a la cual se origina la muerte del 50 % de la población de insectos evaluados (Martínez, 2004). En bioensayos con dípteros el ingrediente activo se mezcla con el agua en la cual se colocaran las larvas de la especie blanco, ya sean insectos de la familia Culicidae (Mosquitos) o Simuliidae (Moscas negras) (Lacey, 1997).

En el caso de bioensayos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* con dípteros, los factores como instar evaluado, temperatura y pH del agua, densidad de larvas por recipiente, disponibilidad de alimento y luminosidad, pueden alterar la actividad del producto evaluado (Becker y Margalit, 1993). Respecto a los tiempos de evaluación, estos van según las variables que se

estén midiendo. En el caso específico de bioensayos con dípteros, la lectura se hace a las 24 y 48 horas (Rodríguez *et al.*, 1993).

#### **4. Análisis PROBIT**

El análisis PROBIT proporciona los valores de diferentes concentraciones letales. En general un bioensayo se registra tanto el número total de insectos evaluados ( $n$ ) como el número de muertos ( $r$ ). La información resultante o dato, se expresa entonces como proporción ( $r/n$ ) o como porcentaje  $(r/n) \times 100$ . De acuerdo con esto, se considera el método de análisis PROBIT como el más apropiado para evaluar este tipo de datos. Esta metodología permite evaluar las toxicidades del ingrediente activo y de los productos formulados con *Bt*, realizar pruebas de significancia, establecer límites de confiabilidad y obtener la potencia relativa entre diferentes productos (Frutos, 1996).



## ANTECEDENTES

### 1. INVESTIGACIONES INTERNACIONALES

#### 1.1 *Bt* como control biológico

El uso de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos se inició en los años 30 contra el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera, Pyralidae*). El primer producto comercial salió en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporeine®. En Estados Unidos se comercializó por primera vez en 1957, bajo el nombre de Thuricide®. Desde entonces se ha desarrollado la producción en forma masiva en varios países de todo el mundo (Whalon y Wingerd, 2003).

En 1976, se aisló en la región de Negev, Israel, un bacilo de larvas del mosquito *Culex sp.*, el cual se designó con el nombre de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Goldberg y Margalit, 1977). Esta variedad mostró ser altamente efectiva para el control de plagas de salud pública, como el díptero *Aedes aegypti* (*Diptera, Culicidae*), vector del dengue (Arcas, 1996).

En el 2006, Ibargutxi y colaboradores evaluaron concentraciones de 100 µg de toxina de *Bacillus thuringiensis* por mililitro de dieta artificial, en larvas de *Earias insulana*. Estos investigadores concluyeron que seis de las toxinas Cry estudiadas (Cry1Ca, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ja, Cry2Aa, y Cry2Ab) no eran tóxicas en absoluto para dichas larvas. Por su parte, las proteínas Cry1Aa, Cry1Ja y Cry2Aa no causaron mortalidad, pero si causaron inhibición significativa en el crecimiento. Mientras que las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Da, Cry1Ia y Cry9Ca si presentaron toxicidad frente a larvas de *E. insulana*. Los investigadores calcularon los valores de la dosis letal 50 (CL<sub>50</sub>), definida como la cantidad mínima de microorganismos patógenos que producen la muerte al 50 % de la población estudiada, en

dos colonias de *E. insulana*. En la colonia proveniente de Egipto, las toxinas Cry9Ca y Cry1Ia variaron desde 0,39 hasta 21,13 µg/mL, respectivamente. Adicionalmente, en la colonia de insecto proveniente de España obtuvieron valores de CL<sub>50</sub>, para Cry9Ca y Cry1Da, que variaron desde 0,20 a 4,25 µg/mL, respectivamente. Los resultados indicaron que la potencia relativa de las toxinas provenientes de Egipto fue más alta para las proteínas Cry9Ca y Cry1Ab, siendo ambas significativamente más tóxicas que Cry1Ac y Cry1Ba, seguido por Cry1Da y finalmente Cry1Ia. En la población del insecto proveniente de España, Cry9Ca fue la más tóxica, seguida en orden decreciente por Cry1Ac y Cry1Ba, y la menos tóxica fue Cry1Da.

En el 2009, Ortegón y Carvajal evaluaron la efectividad del uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como control biológico para larvas de *Ae. aegypti*, el principal vector del dengue en Colombia. Ellos desarrollaron tres réplicas de pruebas *in vitro*, en cajas de petri con 10 larvas de *Ae. aegypti* en cada una, a las cuales le aplicaron concentraciones de 0,01; 0,05; 0,10; 0,14 y 0,18 mg .L<sup>-1</sup> de endosporas de la bacteria y las dejaron actuar por 24 h, para determinar la concentración adecuada a usar *in situ*. La concentración obtenida de la prueba *in vitro* la utilizaron en una prueba *in situ* con dos réplicas, aplicada en albercas domiciliarias de 1000 L de agua cada una. Encontraron que la concentración de 0,14 mg.L<sup>-1</sup> de endosporas produjo en 24 h una mortalidad promedia *in vitro* e *in situ* del 100 % y 98 %, respectivamente. Concluyendo que la concentración de *B. thuringiensis* var. *israelensis* puede ser usado como alternativa de control para larvas de *Ae. aegypti*.

En el 2010, Da Costa y colaboradores seleccionaron cepas de *B. thuringiensis* que fueran eficaces contra *Ae. aegypti*, a partir de una colección bacteriana que contenía 1.073 aislados obtenidos en diferentes localizaciones del territorio brasileño. Para la determinación de la CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> (cantidad mínima de microorganismos patógenos que producen muerte al 90 % de

la población estudiada), los aislamientos fueron evaluados por bioensayos selectivos y cuantitativos. De los 45 aislamientos bacterianos sometidos a los bioensayos selectivos, 13 causaron 100 % de mortalidad en larvas de *Ae. aegypti*. A partir del análisis de toxicidad sobre este insecto se hizo la selección de un conjunto de cepas que ellos concluyeron tienen el potencial de ser utilizado en la formulación de nuevos bioinsecticidas.

Galvis (2013) aisló a partir de muestras de suelo, 13 cepas nativas de *B. thuringiensis* identificadas mediante medios selectivos y el sistema BBL CRYSTAL, diseñado para la identificación de bacterias aerobias Gram-positivas aisladas frecuentemente de muestras clínicas, en la caracterización molecular utilizando cebadores específicos para la identificación de los genes *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4*. Ocho aislados presentaron el gen *cry3* y dos aislados el gen *cry4*. Estos dos últimos aislados fueron utilizados por Galvis en un bioensayo en larvas de *Ae. aegypti* para determinar su efecto tóxico, mostrando que en el ensayo preliminar de toxicidad el aislado BtUDES2 presentó una letalidad del 56,67 %. En la apreciación de la concentración letal del mismo aislado, se determinó una concentración letal media de  $11,4333 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y concentración letal total de  $17,1542 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , lo que concuerda con lo propuesto por la OMS, que dispone que los preparados *B. thuringiensis* var. *israelensis* tienen una  $\text{CL}_{50}$  para larvas de *Ae. aegypti* de aproximadamente  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  en agua.

Elleuch y colaboradores (2014), evaluaron nuevos aislados de *B. thuringiensis* con la finalidad de buscar cepas originales activas contra dípteros y capaces de producir nuevas toxinas que podrían ser utilizadas como una alternativa de la cepa H14 comercial (*Btk*). A través de una caracterización bioquímica y molecular revelaron una notable diversidad entre las cepas estudiadas. Utilizando el método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

detectaron los genes *cry40* y *cry54* en cuatro aislamientos. De las cepas estudiadas, tres mostraron actividades débiles contra las larvas de *Ae. aegypti*. Los investigadores encontraron que los complejos espora-cristal, de las cepas que presentaron actividad contra *Ceratitis capitata* (Díptero) presentaron una CL<sub>50</sub> de aproximadamente 50 µg/cm<sup>2</sup>. Todas las cepas estudiadas mostraron niveles de mortalidad importantes utilizando sobrenadantes de los cultivos contra las larvas de *C. capitata*. Esto sugiere que estas cepas producen una amplia gama de factores solubles activos contra larvas de este insecto.

En el año 2015, Narváez planteó aislar cepas de *Bacillus* nativas de suelos y compost de la provincia de Pichincha, y comprobar el efecto acaricida de estos aislados hacia *Tetranychus urticae* (Araña roja). En total obtuvo 166 aislados que clasificaron en 15 grupos morfológicos. Este autor, encontró una gran variación en la diversidad de las bacterias presente en cada muestra y en cada ambiente. Además, evaluó la acción acaricida, el efecto en la oviposición y el efecto sobre las ninfas de 22 de las bacterias aisladas, incluyendo un control positivo y uno negativo, con 5 repeticiones por tratamiento. Evaluó los datos a las 120 y 168 horas después de la aplicación de los cultivos bacterianos. De los 22 aislados evaluados en la capacidad acaricida, 4 cepas, mostraron mayor número de individuos muertos, a las 120 horas y fueron escogidas como cepas con alto potencial acaricida. Concluyó que 3 de las cepas evaluadas tuvieron efecto negativo en la oviposición de las hembras tratadas a las 120 horas. Además, dos cepas mostraron efecto sobre las ninfas a las 168 horas.

Vázquez y colaboradores (2015), evaluaron y caracterizaron cinco cepas mexicanas de *B. thuringiensis* con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* mediante bioensayos, perfiles proteicos, patrones de DNA plasmídico, y PCR. Los bioensayos mostraron que dos de las cinco cepas estudiadas, mostraron alta toxicidad hacia *S. frugiperda*,

con  $CL_{50}$  de 137,2 y 197,2  $ng \cdot cm^{-2}$ , respectivamente, al compararse con el estándar comercial HD-1 ( $CL_{50}$  de 142  $ng \cdot cm^{-2}$ ). Asimismo, el resto de las cepas evaluadas mostraron menores niveles de toxicidad con  $CL_{50}$  de 338,2; 474,5; y 523,8  $ng \cdot cm^{-2}$ , respectivamente. Concluyeron que al menos dos cepas poseen potencial para ser utilizados como agentes de control biológico contra el gusano cogollero en México.

Soares da Silva y colaboradores (2015) investigaron el uso de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en el Estado de Amazonas, en Brasil, para el control biológico del vector del dengue *Aedes aegypti*. De 25 muestras de suelo recogidas en nueve municipios, se obtuvieron 484 colonias bacterianas, 57 de estas colonias fueron identificados como *B. thuringiensis*. Seis aislados, mostraron actividad insecticida, y sólo un aislado presentó los cinco genes investigados *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, y *cry11Ba*. Dos de las cepas evaluadas, con valores de  $CL_{50}$  más bajos, mostraron igual toxicidad en comparación con los estándares. Con base en sus resultados, concluyeron que los aislados de *B. thuringiensis* encontrados en Amazonas son potenciales en la constitución de nuevos medios de control biológico para *Ae. aegypti*, debido a su actividad larvica y la posibilidad de contener nuevas combinaciones de toxinas.

Actualmente, la utilización de bioinsecticidas como *Bti* no es la única estrategia que se están generando para el control de mosquitos que son plagas de salud pública, como en el de *Aedes aegypti*. En algunos países están realizando estudios de modificación genética de estos mosquitos para controlar de otra manera este problema y contribuir a la disminución de la incidencia de esta enfermedad en el mundo. *Wolbachia pipientis*, es una bacteria intracelular de herencia materna que se encuentra naturalmente en una amplia gama de especies de artrópodos incluyendo aproximadamente 40 % de todas las especies de insectos (Zug *et al.*,

2012). *Wolbachia* es mejor conocida por su capacidad para inducir diversas anomalías en la reproducción de sus anfitriones que dan lugar a su difusión a través de las poblaciones de acogida de invertebrados (Werren *et al.*, 2008). Es una bacteria intracelular obligada, que está siendo desarrollado como una estrategia de control biológico contra el dengue, ya que limita la replicación del virus en el mosquito. La cepa wMel de *Wolbachia*, se ha introducido en el mosquito vector, *Aedes aegypti*, y ha demostrado invadir y extenderse cerca de donde ocurrieron las emisiones en el campo (Ye *et al.*, 2015). En estudios de laboratorio, la infección *Wolbachia* en mosquitos *Aedes* y *Anopheles* ha demostrado que interfiere con la replicación de una amplia gama de patógenos, incluyendo virus, nematodos filarias, bacterias y parásitos de la malaria (Moreira *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 2011). La variación natural en la aptitud de mosquitos debido a la competencia dependiente de la densidad de los recursos alimenticios limitados pueden influir en la invasión de *Wolbachia* (Hancock *et al.*, 2016).

## **1.2 Utilización de Subproductos Agroindustriales**

Vidyardhi y colaboradores, en el 2002, evaluaron el crecimiento y rendimiento de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* en un medio con extracto de levadura y soja (TSY), un medio compuesto por lodo y aguas residuales, y un medio comercial basado harina de soja. El recuento de las esporas viables (VS) en un medio de lodo fue comparable a la obtenida en su laboratorio con medios comerciales. La entomotoxicidad del líquido de fermentación en lodo contra el gusano del abeto *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), el insecto forestal más destructivo en América del Norte de las especies arbóreas Abeto Balsámico y Abeto Blanco, era comparable a la formulación comercial de *Bt* disponible en el mercado. Además, observaron un valor mayor de entomotoxicidad en un medio de lodo que en los TSY o el medio comercial basado en harina de soja. Encontraron que los valores

obtenidos en el recuento VS y en el de rendimiento de la entomotoxicidad dependían de la concentración de sólidos del lodo en el medio, señalando un valor óptimo de concentración de sólidos para la producción de *Bt* de 25 g/L (base de peso seco). Una baja relación C:N en el lodo secundario y una alta relación C:N en el lodo mezclado le resultaron en una entomotoxicidad superior.

Posteriormente, en el 2010, Valicente y colaboradores evaluaron el crecimiento de *B. thuringiensis* en tres medios de cultivo líquido, que se mantuvieron en agitación continua (200 rpm) durante un período de 96 horas a 30 °C. El medio 1 estaba formado por el medio comercial Luria Bertani (LB), suplementado con sales ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) y 0,2 % de glucosa. El medio 2 estaba compuesto por glucosa de maíz 1,5 %, harina de soja 0,5 %, y sales ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ). Por último, el medio 3, estaba constituido por una suspensión al 4 % de heces porcinas a base de estiércol líquido y glucosa 0,2 %. Estos investigadores evaluaron el pH en cada medio, así como también las esporas viables expresadas en UFC/mL, biomasa celular y esporas totales producidas. Los resultados obtenidos revelaron que los medios 1 y 2 presentaron tendencia a pH básico y el medio 3 propenso a pH ácido. Adicionalmente, los medios 1 y 2 mostraron un número de esporas viables igual a  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL, luego de 96 horas de crecimiento. La biomasa celular total más alta, se produjo en el medio 2 (1,18 g/L). El medio 1 mostró la mayor concentración de esporas total ( $1,4 \times 10^9$  esporas/mL), luego de 96 horas de crecimiento. En este trabajo concluyeron que la eficacia contra el primer instar larvario de *S. frugiperda* mostró que los tres medios donde creció *Bt* produjo una mortalidad de más de 60 % en las concentraciones más altas.

En el año 2013, Khedher y colaboradores, como un primer paso, elaboraron un diseño para evaluar los efectos de los ocho componentes del medio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , almidón, soja, NaCl,

MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub>) sobre la producción de  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* obteniendo como resultado que el almidón, soja y cloruro de sodio mostraron efectos significativos en la producción de bioinsecticidas. Posteriormente, seleccionaron estos parámetros para una mayor optimización del diseño propuesto. Los resultados obtenidos revelaron que el medio de cultivo óptimo para la producción de  $\delta$ -endotoxina consta de 30 g/L de almidón, 30 g/L de soja y 9 g/L de cloruro de sodio. Al compararlos con el medio de producción basal, se observó una mejora en la producción de  $\delta$ -endotoxina de hasta 50 %. Por otra parte, el rendimiento relativo de esporas de *B. thuringiensis* mejoró notablemente mediante el uso del medio barato optimizado (148,5 mg  $\delta$ -endotoxinas/g de almidón) en comparación con el rendimiento obtenido en el medio basal (94,46 mg  $\delta$ -endotoxinas/g de almidón). Por lo tanto, concluyeron que el uso de un medio de cultivo barato optimizado parecía ser una buena alternativa para una producción de bajo costo de bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis* a escala industrial.

Paredes y colaboradores en el año 2014, evaluaron el efecto del poder residual de tres formulaciones con *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* sobre el porcentaje de mortalidad en larvas de *Ae. aegypti*. Prepararon tres formulaciones de *Bti* con 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 *Ae. aegypti* a 0,1 g de cada formulación. La mortalidad de larvas fue registrada mediante observación directa a las 48 horas de aplicados los tratamientos. Posteriormente, un lote nuevo de 25 larvas de *Ae. aegypti* se introdujo en los contenedores a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días post aplicación de las formulaciones. Los resultados mostraron que el poder residual se incrementa con la formulación *Bti* - harina de maíz morado al 2 % de i.a. produciendo un CL<sub>50</sub> hasta los 28 días post aplicación. Por otro lado la formulación *Bti* – carragenina al 2 % de i.a., produjo el mínimo poder residual que se expresa en un CL<sub>50</sub> a los 2 días de aplicado el tratamiento. Por



su parte, la formulación *Bti*-maíz morado-carragenina logró una CL<sub>50</sub> hasta los 18 días post aplicación. Concluyendo que se lograron aumentar el poder residual de *Bti* al formularlo con harina de maíz morado a 2 % i.a.

## **2. INVESTIGACIONES NACIONALES**

### **2.1 *Bt* como control biológico**

En 2002, Moser y colaboradores evaluaron en el campo, la efectividad y persistencia de una formulación granulada de *Bacillus sphaericus* sobre larvas de *Anopheles aquasalis*. Además, evaluaron dos dosis comerciales (2 g/m<sup>2</sup> y 3 g/m<sup>2</sup>) de una formulación granulada de *Bacillus sphaericus* (Vectolex® CG 7.5 %). Esta formulación les proporcionó un muy buen control de las poblaciones larvarias de *An. aquasalis*. Las dos dosis presentaron un efecto similar contra estas larvas en los hábitats expuestos a pleno sol, de pH relativamente ácido y abundante vegetación emergente, llegando a producir un porcentaje de reducción larvaria mayor del 91 % durante 7 días post-tratamiento. A los 14 días post-tratamiento, la mortalidad fue igual al 94 % e igual o mayor del 66 % a los 21 días post-tratamiento.

Posteriormente en el 2002, en la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Carmona aisló y caracterizó parcialmente una cepa de *B. thuringiensis* denominada UCLA-10. Realizó bioensayos cualitativos contra larvas de primer instar de gusano cogollero de maíz, *S. frugiperda* (Lepidoptera), utilizando el complejo espora-cristal. Este trabajo reveló niveles de toxicidad equivalentes a los del control positivo de una cepa estándar. Los resultados encontrados sugieren la existencia en Venezuela de cepas con alta toxicidad hacia esta importante plaga que afecta la producción del principal cereal de consumo en el país. Además,

reveló la importancia de continuar con la búsqueda de cepas de *Bt* que puedan ser utilizadas como agentes biológicos para el control de insectos plaga.

Seguidamente en la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” en el año 2004, Ramos y colaboradores evaluaron siete cepas nativas de *B. thuringiensis* mediante bioensayos frente a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) y, utilizando geles de SDS-PAGE, reconocieron proteínas de aproximadamente 130 kDa en cada una de las muestras. Estas proteínas derivaron de una inclusión paraesporal de forma bipiramidal típica de las proteínas del tipo Cry1. Los bioensayos que realizaron señalaron a la cepa HD-1 (*Btk*) como la más tóxica, con un 90 % de mortalidad en las larvas, seguida por la cepa UCLA-46 con 73 %. La cepa UCLA-41 mostró sólo un 63 % de mortalidad, pero su efecto sobre el crecimiento de las larvas fue similar a la cepa HD-1.

En Venezuela se han realizado otros estudios en el área de control de mosquitos y se ha determinado que los factores que tienen que ver con las conductas de la larva también afectan la actividad. Por ejemplo, en la Universidad Central de Venezuela en el año 2005, Delgado estudió el efecto sobre *An. aquasalis* (Curry) (Diptera: Culicidae) de 4 formulaciones de *Bti*: Vectobac AS®, Vectobac G®, Teknar® y un micro-encapsulado, en relación a algunos factores que proporcionan información sobre el comportamiento alimenticio de la larva como la densidad de la población de larvas, la duración del cuarto instar y la presencia de alimento. También se evaluó el efecto de la radiación UV y la temperatura. Según los resultados obtenidos, los factores más influyentes en la efectividad de estas formulaciones de *Bti* son la exposición a la radiación UV y aquellos que tienen que ver con las conductas alimentarias de la larva.

Anderson (2011), de la Universidad Simón Bolívar, tuvo como objetivo principal de su investigación realizar un estudio piloto para caracterizar y evaluar 14 aislados nativos de *Bt* en suspensión acuosa crecidos en medios con y sin almidón, sobre poblaciones de larvas (Estadio III – Estadio IV) de *Ae. aegypti*, bajo condiciones de laboratorio. Para ello, realizaron bioensayos, evaluando los efectos del aislado de *Bt*, la disponibilidad del alimento larval, la temperatura y la presencia o ausencia de almidón en la aplicación, todo esto, sobre el porcentaje de mortalidad larval de dos cepas del mosquito (una cepa de referencia (Rock) y una de campo (Trujillo)). Esto dio como resultado, que los aislados locales ensayados no presentaron actividad dipterocida con respecto a la actividad presentada por la bacteria de referencia (*Bti*). Sin embargo, empleando *Bti* frente a dichas larvas, observaron una respuesta significativa con el aumento de la temperatura ( $P= 0,0026$ ) y la presencia de almidón en la preparación ( $P = 0,0023$ ), mientras que la cepa susceptible del insecto mostró una respuesta diferencial ( $P= 0,026$ ) respecto a la disponibilidad de alimento. Anderson también verificó, una diferencia significativa en la susceptibilidad de ambas cepas de insecto frente a *Bti* ( $P= 0,0033$ ). Los resultados le permitieron concluir que es necesario evaluar los parámetros ecológicos del criadero, como la temperatura del agua y la disponibilidad de alimento, antes de aplicar *Bt* en campo. Asimismo, factores intrínsecos a la productividad y aplicación de *Bt*, evidenciaron que el almidón aumenta la actividad dipterocida de la preparación.

## **2.2 Utilización de Subproductos Agroindustriales**

Las actividades en el Laboratorio de Procesos Fermentativos (LPF) se enmarcan dentro del área de las fermentaciones, dirigidas a la producción de insumos de interés industrial a través del uso de sistemas de cultivos sumergidos y cultivos en estado sólido. El laboratorio tiene como interés principal el desarrollo de procesos fermentativos para la producción industrial

de bioinsecticidas bacterianos y fúngicos, así como de agentes antagonistas, de uso creciente en nuestro país en el control biológico de plagas y enfermedades agrícolas.

En 1998, en el LPF, Brazón diseñó y optimizó un medio de cultivo para la producción de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* a partir de subproductos agroindustriales de bajo costo como agua de maceración de maíz y melaza de caña de azúcar. Adicionalmente, utilizó un medio de cultivo constituido por una solución mineral basal suplementada con glucosa y extracto de levadura como medio de referencia (Arcas, 1985). Los cultivos se realizaron tanto por lote como bajo condiciones de flujo continuo. Se obtuvo como resultado, un recuento de  $0,8 \times 10^{12}$  esporas/L a concentraciones de melaza y agua de maceración de maíz de 5 g/L en base a sólidos, en cada caso. Luego de transcurridas 70 horas bajo condiciones de tasas de dilución de  $0,416 \text{ h}^{-1}$  y  $0,5 \text{ h}^{-1}$  en cultivo continuo, obtuvo  $6,32 \times 10^{12}$  y  $3,28 \times 10^{12}$  cél/L, respectivamente. Mediante el uso del sistema de cultivo continuo logró incrementar la producción con ayuda de pulsos de melaza a una producción de esporas de  $3 \times 10^{12}$  esporas/L. En este trabajo se demostró la factibilidad de uso de algunos subproductos agroindustriales de bajo costo para la producción de *B. thuringiensis*, con rendimientos similares e incluso superiores a los que se obtienen mediante el uso de medios sintéticos convencionales.

Posteriormente, en el mismo laboratorio, Peñalver (2005) elaboró medios de cultivo usando como referencia el medio formulado por Brazón (1998) e incorporando el subproducto Concentrín 21®, para la producción de la misma cepa. Se elaboraron 5 medios de cultivo: Medio 1 (Sales:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Medio 2 (Sales y agua de maceración de maíz), Medio 3 (Sales y melaza), Medio 4 (Sales y Concentrín 21®) y Medio 5 (Concentrín 21®). Se obtuvo que las concentraciones de esporas en los diferentes medios fueron similares entre sí ( $10^9$  esporas/mL), exceptuando el medio 1 que se mantuvo en el orden de  $10^5$  esp/mL. Los resultados obtenidos por Peñalver demuestran

que es necesaria una fuente de carbono y energía para el crecimiento óptimo de la bacteria. Las respuestas esporulativas dada por el medio Brazón y los medios 2, 3, 4 y 5 de Peñalver fueron altamente significativas y dichos subproductos permiten la producción en masa de *Btk*. Finalmente, Peñalver evaluó la toxicidad de esta cepa frente a larvas de *Spodoptera frugiperda*, obteniendo una mayor mortalidad en aquellos medios que estaban suplementados con sales, por lo que concluye que son un suplemento necesario para la producción de los cristales en *Bt*.

## JUSTIFICACIÓN

El control de insectos plagas y la falta de efectividad de los insecticidas químicos dan origen a nuevas áreas de investigación, que por su carácter multidisciplinario plantean la necesidad de nuevos enfoques y criterios. Es por esta razón que el uso de insecticidas basados en microorganismos ha adquirido gran importancia tanto en el campo de las investigaciones científicas como en las ciencias económicas y sociales, ya que los logros y avances tienen repercusión directa sobre la población.

Dentro de las cepas de *Bt*, la bacteria *Bti* se caracteriza por ser efectiva contra dípteros, es decir, funciona en el control de plagas que afectan la salud pública, como en culicido *Aedes aegypti* (Ochoa *et al.*, 2009). Este vector se ha reportado como el transmisor de varias enfermedades que afectan a países tropicales y subtropicales de todo el mundo, entre ellas el dengue, la fiebre amarilla, la fiebre chikungunya y, en últimos reportes, el virus zika.

En todo el mundo, las primeras aproximaciones en la evaluación de la efectividad que pueda tener una cepa de *Bti* sobre el díptero se llevan a cabo cultivando la bacteria en medios definidos, que garanticen la efectiva producción del cristal tóxico (Arcas, 1985). Sin embargo, para la producción de bioinsecticidas a gran escala se debe implementar el uso de productos que sean de bajo costo y que tengan disponibilidad inmediata. Por esta razón, los subproductos agroindustriales se convierten en la principal alternativa dentro de las formulaciones a nivel industrial.

En Venezuela son pocas las investigaciones llevadas a cabo en torno a *Bt*. En consecuencia, el desarrollo de formulaciones de bioinsecticidas con base en *Bt*, desarrolladas utilizando subproductos agroindustriales, se ve aun más afectado. En el Laboratorio de Procesos Fermentativos, ubicado en el Instituto de Biología Experimental, se han desarrollado algunas

aproximaciones, de las cuales todas se han evaluado sobre la cepa *Btk* (efectiva para combatir plagas de lepidópteros) (Brazón, 1998 y Peñalver, 2005). No obstante, se necesitan estudios que estén dirigidos a las evaluaciones de formulaciones de medios cultivos desarrollados para el crecimiento de la cepa *Bti*, la cual es efectiva contra dípteros. Los resultados podrían servir para el desarrollo de un bioinsecticida de producción nacional que permita el control de *Ae. aegypti* y así minimizar el impacto de las enfermedades transmitidas por este vector. Por tanto, en este trabajo se propone evaluar medios de cultivo formulados con subproductos agroindustriales, partiendo de los medios de referencia formulados por Brazón (1998) y Peñalver (2005), que permitan un alto rendimiento en la obtención del complejo esporacristal de *Bti* y valores altos de mortalidad en bioensayos sobre *Ae. aegypti*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Producir la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* utilizando subproductos de bajo costo y alta disponibilidad en Venezuela y determinar su capacidad entomopatogénica frente a larvas de *Aedes aegypti*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en tanque agitado de mezcla completa, operado por lote utilizando el medio de referencia A80 (Arcas, 1984) para evaluar parámetros cinéticos.
- Modificar el medio A80 con subproductos agroindustriales para evaluar la producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a través de la capacidad esporulativa.
- Evaluar la capacidad entomopatogénica de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, crecida en medio con subproductos agroindustriales, sobre larvas de *Aedes aegypti*.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- ❖ Cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* proveniente del Laboratorio de Biología Molecular, Postgrado de Fitopatología, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Edo. Lara.
- ❖ Larvas en el tercer estadio de *Aedes aegypti*, provenientes del insectario del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

#### MEDIOS DE CULTIVO

**Condiciones de esterilización:** El proceso de esterilización consiste en someter todos los materiales y medios de cultivo a utilizar en una autoclave a 15 libras de presión, por 15 minutos, a 121 °C.

**Medio de Cultivo de referencia A80:** Medio rico definido y de referencia diseñado por Arcas (1984) para el crecimiento y efectiva formación del complejo espora-cristal de cepas de *Bt*. La composición se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Componentes del Medio A80 (Arcas, 1984).

|            | COMPUESTO                            | CANTIDAD (g/L) |
|------------|--------------------------------------|----------------|
| SOLUCIÓN A | (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>    | 1              |
|            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1              |
|            | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1              |
|            | EXTRACTO DE LEVADURA                 | 5              |
| SOLUCIÓN B | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 1              |
|            | MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O  | 0,03           |
|            | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,04           |
| SOLUCIÓN C | GLUCOSA                              | 5              |

**Medio con Subproductos Agroindustriales:** Medios formulados en el Laboratorio de Procesos Fermentativos, a partir del medio A80 para el crecimiento de *Btk* (Peñalver, 2005), y usado en este trabajo para evaluar el crecimiento de *Bti*. La composición se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Componentes de dos formulaciones de Medio con Subproductos Agroindustriales (Vol. Final=150 mL)

| COMPUESTO      | MEDIO SUBPRODUCTOS 1 (S1) | MEDIO SUBPRODUCTOS 2 (S2) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| MELAZA         | 0,75 g                    | 0,75 g                    |
| VINAZA         | 30 mL                     | 25 mL                     |
| CONCENTRÍN 21® | 1,5 g                     | 1,8 g                     |
| AGUA DESTILADA | 120 mL                    | 125 mL                    |

**Medio con Subproductos Agroindustriales:** Medio formulado en el Laboratorio de Procesos Fermentativos a partir de melaza y Concentrín 21® para evaluar el crecimiento bacteriano y la producción del cristal paraesporal de *Bti*. La composición de los medios se encuentra reflejada en la Tabla 6

**Tabla 6.** Componentes de Medios de Cultivo con Subproductos Agroindustriales

| CULTIVO                         | COMPUESTO                                       | CANTIDAD (g/L) |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|
| <b>Medio de Cultivo 1 (MC1)</b> | Concentrín 21 ®                                 | 10 g           |
|                                 | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1 g            |
|                                 | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1 g            |
|                                 | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 1 g            |
|                                 | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 1 g            |
|                                 | MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O             | 0,03 g         |
|                                 | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O            | 0,04 g         |

**Continuación Tabla 6.-** Componentes de Medios de Cultivo con Subproductos Agroindustriales

| CULTIVO                             | COMPUESTO                                       | CANTIDAD (g/L) |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|
| <b>Medio de Cultivo 2<br/>(MC2)</b> | Concentrín 21 ®                                 | 10 g           |
|                                     | Melaza                                          | 5 g            |
| <b>Medio de Cultivo 3<br/>(MC3)</b> | Concentrín 21 ®                                 | 10 g           |
| <b>Medio de Cultivo 4<br/>(MC4)</b> | Concentrín 21 ®                                 | 10 g           |
|                                     | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1 g            |
|                                     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1 g            |
|                                     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 1 g            |
|                                     | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 1 g            |
|                                     | MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O             | 0,03 g         |
|                                     | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O            | 0,04 g         |
|                                     | Melaza                                          | 5 g            |

**Medio LB:** Medio rico usado para evaluar el crecimiento de *Bt* en placas. La composición se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Componentes del Medio Luria Bertani (LB)

| COMPUESTO            | CANTIDAD (g/L) |
|----------------------|----------------|
| EXTRACTO DE LEVADURA | 5              |
| TRIPTONA             | 10             |
| NaCl                 | 10             |
| AGAR                 | 20             |

**Medio Columbia:** Medio nutritivo que permite el aislamiento y cultivo de microorganismos exigentes, por lo que se utiliza como base para la preparación de placas de agar sangre. Su composición se encuentra reflejada en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Componentes del Medio Columbia

| COMPUESTO                       | CANTIDAD (g/L) |
|---------------------------------|----------------|
| DIGERIDO PANCREÁTICO DE CASEÍNA | 12             |
| PEPTONA                         | 5              |
| EXTRACTO DE LEVADURA            | 3              |
| EXTRACTO DE CARNE               | 3              |
| ALMIDÓN DE MAÍZ                 | 1              |
| CLORURO DE SODIO                | 5              |
| AGAR                            | 13,5           |

**Solución Salina (0,85 %):** Es una solución compuesta por 8,5 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada.

**Tween 80 (0,01 %):** Es un emulsionante mejorado que mantiene al complejo espora-cristal en suspensión. Para su preparación, se agregó 0,1 mL de Tween en 1 L de agua destilada.

**Penicilina (2 g/L):** Antibiótico empleado en el tratamiento de infecciones por bacterias sensibles. Para su preparación, se pesaron 200 mg de penicilina y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Una vez disuelto, se filtraron con una membrana porosa para así eliminar la mayor cantidad de contaminación posible. Luego fue almacenada en la nevera hasta su utilización. Al momento de preparar las placas de penicilina (100 mg/L), se tomaron 25 mL de la solución madre de penicilina (2 g/L) y se disolvieron en 475 mL de Agar LB previamente esterilizado. Posteriormente, con el medio constituido, se sirvieron las placas las cuales fueron conservadas en la nevera a 4 °C hasta su utilización.

**Estreptomicina (2 g/L):** Es un antibiótico con alta capacidad antimicrobiana. Para su preparación, se mezclaron 200 mg de estreptomicina en 100 mL de agua destilada. Una vez mezcladas, se filtraron a través de una membrana porosa. Al momento de preparar las placas, se tomaron 12,5 mL de solución madre de estreptomicina y se mezclaron con 487,5 mL de

agar LB, previamente esterilizado. Una vez constituido se sirvieron las placas con una concentración final de estreptomicina (50 mg/L), y posteriormente almacenadas a 4 °C hasta el momento de su uso.

**Agar Sangre (10 %):** Es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes. La preparación de placas de agar sangre consiste en disolver 25 mL de sangre de carnero en 250 mL de Medio Columbia (Ver composición Tabla 8) previamente esterilizado. Una vez constituido, se sirvieron las placas para luego ser almacenadas a 4 °C para su conservación.

## **MÉTODOS**

### **A. Realización de Pruebas Fenotípicas**

Al momento de realizar las pruebas fenotípicas, es necesario tomar en consideración que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* es una bacteria penicilina resistente, estreptomicina sensible y de hemólisis positiva. Para comprobar su fenotipo, se activó la cepa liofilizada de *Bti* en caldo LB. A las 24 horas, se tomó un spot del cultivo de *Bti* activado y se inoculó una gota en una placa de penicilina. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento para las placas de estreptomicina y agar sangre. Luego de esto, las placas se incubaron por 24 horas a 30 °C.

### **B. Preparación de Medios de Cultivo**

Se preparó el medio A80 de referencia usado como control en este trabajo, el cual está compuesto de tres soluciones, una solución A, una solución B y una solución de glucosa. La solución A aporta la fuente de nitrógeno al medio. La solución B está compuesta por sales que contribuyen a la formación del complejo espora-cristal. Finalmente, la solución de glucosa

participa como la fuente de carbono y energía. Las soluciones A y B requieren de un proceso de esterilización de 15 lb de presión, 121 °C durante 15 minutos, a diferencia de la solución de glucosa, se procedió a esterilizar a 10 lb de presión durante 15 minutos, para evitar que la glucosa se caramelize. Una vez esterilizadas las soluciones y en condiciones estériles, el medio se reconstituyó teniendo en cuenta que al agregar la solución B a la solución A se debió añadir gota a gota y en agitación para evitar la precipitación de las sales. Seguidamente, se agregó la glucosa y se inoculó el 10 % de volumen total de cultivo con la cepa de *Bti*.

El medio de cultivo a partir de subproductos agroindustriales se preparó en igualdad de condiciones que el medio de referencia A80, es decir, en condiciones de esterilidad se agregaron 30 mL de vinaza, como fuente de sales; 0,75 g de melaza, como fuente de carbono y energía; y 1,8 g de Concentrín 21®, como fuente de nitrógeno, para su posterior utilización como medio de cultivo para el crecimiento de *Bti*.

Adicionalmente, se prepararon los medios MC1, MC2, MC3 y MC4 en condiciones de esterilidad de acuerdo a lo indicado en la tabla 6 para un volumen final de 100 mL, y se inocularon con *Bti* para su posterior evaluación. Se preparó además una batería de medios de cultivo compuestos por 1,8 g de Concentrín 21® y por diferentes concentraciones de vinaza, que iban desde 2,5 mL hasta 30 mL, completando con agua destilada para un volumen final de 100 mL.

### **C. Cultivo en Batch de *Bti***

Se preparó un pre-inóculo a partir de la punción de una cepa caracterizada y pura de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. El preinoculo correspondió al 10 % del volumen final del medio de cultivo. Dicha cepa se cultivó en caldo LB y se dejó crecer a 30 °C durante toda la noche para su posterior inoculación en el medio a utilizar, ya sea A80 o de subproductos.

Con la finalidad de obtener la cinética del crecimiento de *Bti*, se procedió a inocular el medio con la bacteria. Del cultivo recién inoculado se tomó 1 mL para realizar diluciones seriadas en solución salina (0,85 % p/v) con un volumen final de 10 mL. Posteriormente, de la dilución  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  se sembraron con rastrillo en placas de LB para determinar la concentración inicial de células vegetativas. Luego, ambas diluciones fueron sometidas a choque térmico (80 °C por 10 minutos seguidos de 5 minutos en hielo) y nuevamente sembradas en agar LB para evaluar así la concentración de espores iniciales en este periodo de crecimiento. El procedimiento anterior representa el punto cero de la curva de crecimiento. Una vez sembrado  $T_0$ , el cultivo se incubó a una temperatura de 30 °C y se colocó en agitación para garantizar el suministro de oxígeno. Al transcurrir una hora se repitió la siembra del cultivo, con choque y sin choque. Este procedimiento se repitió cada hora, durante 8 horas consecutivas, para observar la fase exponencial de crecimiento. Luego, a las 24, 48 y 72 horas, se repitió el procedimiento anterior para obtener la fase estacionaria de crecimiento. Todas las placas sembradas, para cada tiempo, se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

#### **D. Curva de crecimiento de *Bti***

Para la realización de la curva de crecimiento bacteriano fue necesario realizar el conteo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada una de las placas de agar LB que fueron sembradas con cada uno de los cultivos utilizados para el crecimiento de *Bti* (Ver Tablas 4, 5 y 6). Posteriormente, se calcularon los títulos de cada hora evaluada y se procedió a realizar la curva de crecimiento microbiano, entendida como el logaritmo neperiano del número de células viables respecto al tiempo expresado en horas. El título bacteriano se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título Bacteriano} = \frac{\text{Unidades Formadoras de Colonias (UFC)}}{\text{Volumen de siembra}} \times \text{Factor de Dilución}$$

(UFC/mL)

### E. Cálculos de parámetros cinéticos

Utilizando la curva de crecimiento bacteriano se procedió a calcular la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) para cada uno de los cultivos a utilizar en el crecimiento de *Bti*. Este cálculo se realizó a partir de la pendiente de las mismas mediante la ecuación de la recta en la fase exponencial. Seguidamente, con la  $\mu_m$  se calculó el tiempo generacional mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo generacional} = \frac{\ln(2)}{\mu_m}$$

Finalmente, se realizó una comparación de estos parámetros cinéticos entre los cultivos que permitió evaluar la eficacia de la formulación del medio con subproductos agroindustriales respecto al medio A80.

### F. Obtención del Complejo Espora-Cristal

Una vez pasadas las 72 horas de la inoculación del cultivo con *Bti*, se procedió a tomar un volumen del mismo en tubos falcon, previamente esterilizados, con capacidad de 50 mL para posteriormente realizar una primera centrifugación a 7660 xg por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en solución salina (0,85 % p/v). Este lavado se repitió tres veces bajo las mismas condiciones. Finalmente, se descartó el último sobrenadante y se almacena el complejo espora-cristal aislado en la nevera a 4 °C hasta el momento de su utilización en los bioensayos.



### **G. Bioensayos con *Aedes aegypti***

El complejo espora-cristal de *Bti* se resuspendió en 5 mL de Solución Salina (0,85 % p/v). Se realizaron bioensayos con larvas del tercer estadio del díptero *Aedes aegypti*. Para ello se colocó una larva en cada recipiente de 25 mL de capacidad, para un total de 25 larvas por tratamiento, incluyendo los controles. A cada recipiente se le agregaron 10 mL de Tween 80 (0,01 % p/v) estéril más 0,2 mL del complejo espora-cristal aislado de cada medio de cultivo a evaluar. En el caso de los controles negativos, se agregaron 10 mL Tween 80 o 10 mL de agua destilada, previamente esterilizados, en cada envase con su respectiva larva. Transcurridas las 24 horas, se realizó la evaluación de los tratamientos, a través de la obtención del número de larvas muertas que a través del cálculo de la mortalidad acumulada, se calculó la efectividad de *Bti* para cada uno de los cultivos.

Por último, se tomaron 7 larvas por tratamiento, se desinfectaron en su exterior con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % para luego realizar 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril. Luego del lavado, se procedió a la maceración de las 7 larvas en 0,5 mL de agua destilada estéril. Una vez maceradas las larvas, se tomaron 0,1 mL del homogenato y se sembró con rastrillo en placas de penicilina, garantizando que sólo vaya a crecer las bacterias resistentes a este antibiótico y no otra. Luego a las 24 horas, se observó el crecimiento de colonias con el fenotípico característico de *Bti* con la finalidad de comprobar que la mortalidad observada en los tratamientos era debida al efecto entomopatógeno de la bacteria.

## H. Análisis estadístico

Los valores de mortalidad acumulada fueron corregidos por medio de la ecuación de Abbott y examinados por análisis Probit.

$$\text{Mortalidad real} = \frac{(Po - Pc) * 100}{(100 - Pc)}$$

Donde Po correspondió a la mortalidad que se observó en el tratamiento y Pc es la mortalidad en los controles.

## RESULTADOS

En la producción de *Bti* utilizando subproductos agroindustriales se obtuvieron los siguientes resultados:

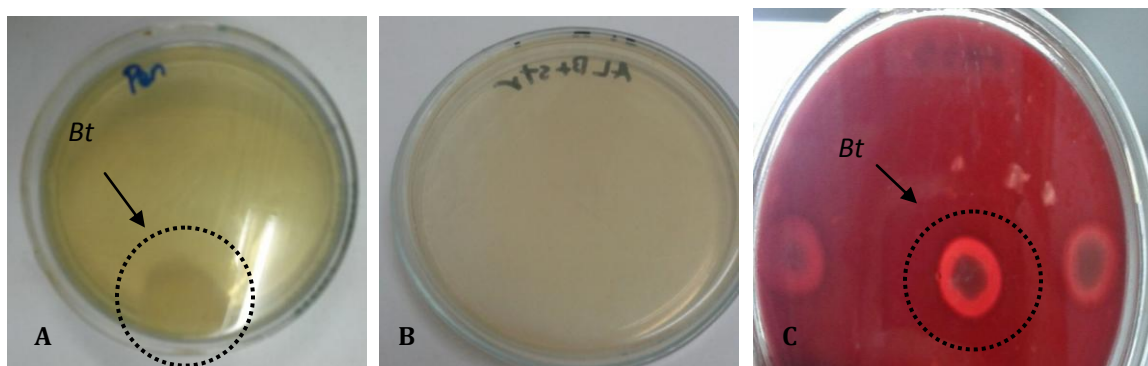
### A. Pruebas fenotípicas

A través de pruebas bioquímicas, con siembra en placas se pudo verificar el fenotipo característico de *Bt*, el cual se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Pruebas bioquímicas realizadas sobre la cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

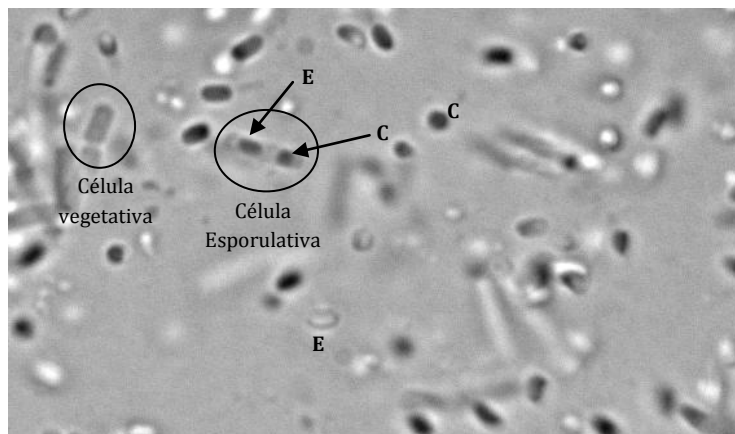
| PRUEBA         | RESULTADO           |
|----------------|---------------------|
| ESTREPTOMICINA | NO HUBO CRECIMIENTO |
| PENICILINA     | HUBO CRECIMIENTO    |
| AGAR SANGRE    | HEMÓLISIS +         |

En la Figura 7, se puede observar el resultado expresado en la tabla 9.



**Figura 7.** Pruebas bioquímicas para verificar el fenotipo de *Bti*. A: Agar LB-penicilina, B: Agar LB-Estreptomycin, C: Agar sangre

Además se verificó la presencia del cuerpo paraesporal al hacer la observación en un microscopio óptico de un cultivo en fase estacionaria a las 72 horas (Figura 8).

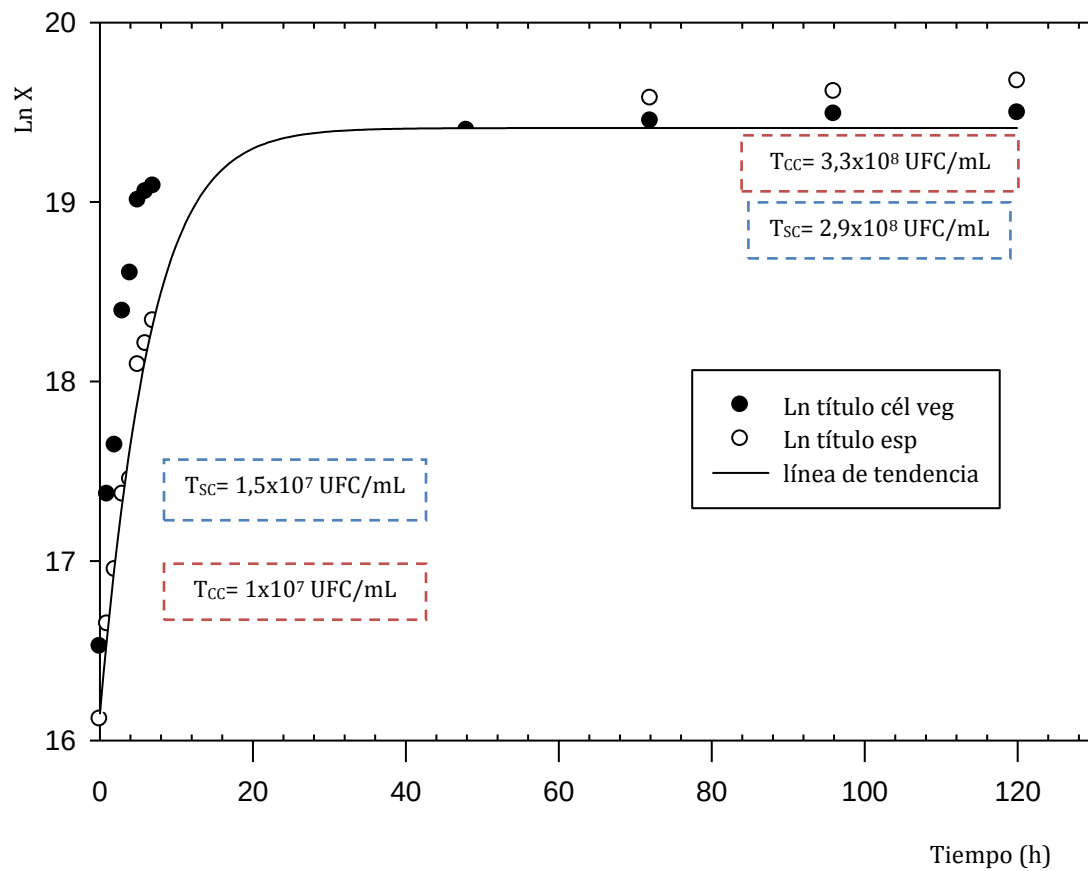


**Figura 8.** Micrografía óptica en contraste de fases de un cultivo de Bti (1000X). E: Espora, C: Cristal.

En la figura 8 se pudo observar que el cultivo de *Bti*, en fase estacionaria, a las 72 horas, presentaba esporangios que contenían en su interior la espora refringente y el cristal paraesporal. También fue posible visualizar que la espora no deformaba el perfil bacilar. Además, se pudieron observar algunas células vegetativas, esporas y cristales libres, y detrito celular.

## **B. Curvas de crecimiento bacteriano**

Una vez comprobado el fenotipo de la cepa de *Bti*, se realizó, en primer lugar, la curva de crecimiento de *Bti* a partir del medio control A80. Obteniéndose un comportamiento como el mostrado en la Figura 9.



**Figura 9.** Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en medio de cultivo control A80. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○). T<sub>sc</sub>: Título sin choque térmico. T<sub>cc</sub>: Título con choque térmico.

Los parámetros cinéticos cálculos a partir de la curva de crecimiento de *Bti* en el medio A80, se encuentran representados en la tabla 10.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de *Bti*

| Medio | TRATAMIENTO | $\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> ) | Tg (h) |
|-------|-------------|---------------------------------------|--------|
| A80   | SC          | 0.5873                                | 1.2    |

SC: Sin choque;  $\mu_{\text{máx}}$ : velocidad máxima de crecimiento bacteriano; Tg: Tiempo generacional

Inicialmente, en la curva de crecimiento, sin someter el cultivo a choque térmico, se observó un aumento exponencial de los títulos bacterianos, observándose un valor de ( $1,9 \times 10^8$  cél/mL) a las 7 primeras horas de evaluación. Esto implica un aumento proporcional de las células vegetativas al transcurso del tiempo. En esta fase exponencial de crecimiento se calcularon los parámetros cinéticos mostrados en la tabla 10. Al pasar las 48 horas de incubación, se comienza a distinguir la fase estacionaria, pues los títulos aumentan lentamente hasta alcanzar las 96 horas ( $2,9 \times 10^8$  cél/mL), momento en que se detuvo la evaluación.

Con el fin de demostrar la cinética de las esporas, el cultivo se sometió a un choque térmico para observar la presencia de este tipo celular durante la evaluación. Se distinguió un aumento progresivo de esporas resistentes al calor, pero con una pendiente menor al obtenida sin este tratamiento, durante las primeras evaluaciones. Luego de las 48 horas de incubación, al alcanzar la fase estacionaria, el título de esporas siguió aumentando. Todo esto se traduce en que en la curva de crecimiento sin choque térmico inicialmente correspondieron a la presencia de células vegetativas y a medida que transcurrió el tiempo este tipo celular es sustituido por las esporas hacia el final de la curva. A partir de las 72 horas, los títulos vienen dado por la presencia casi exclusiva de las esporas termorresistentes ( $3,3 \times 10^8$  cél/mL).

Una vez conocido el comportamiento de *Bti* en el medio A80, se realizaron dos curvas de crecimiento bacteriano a partir los subproductos agroindustriales S1 y S2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en dos formulaciones con subproductos agroindustriales, S1 y S2

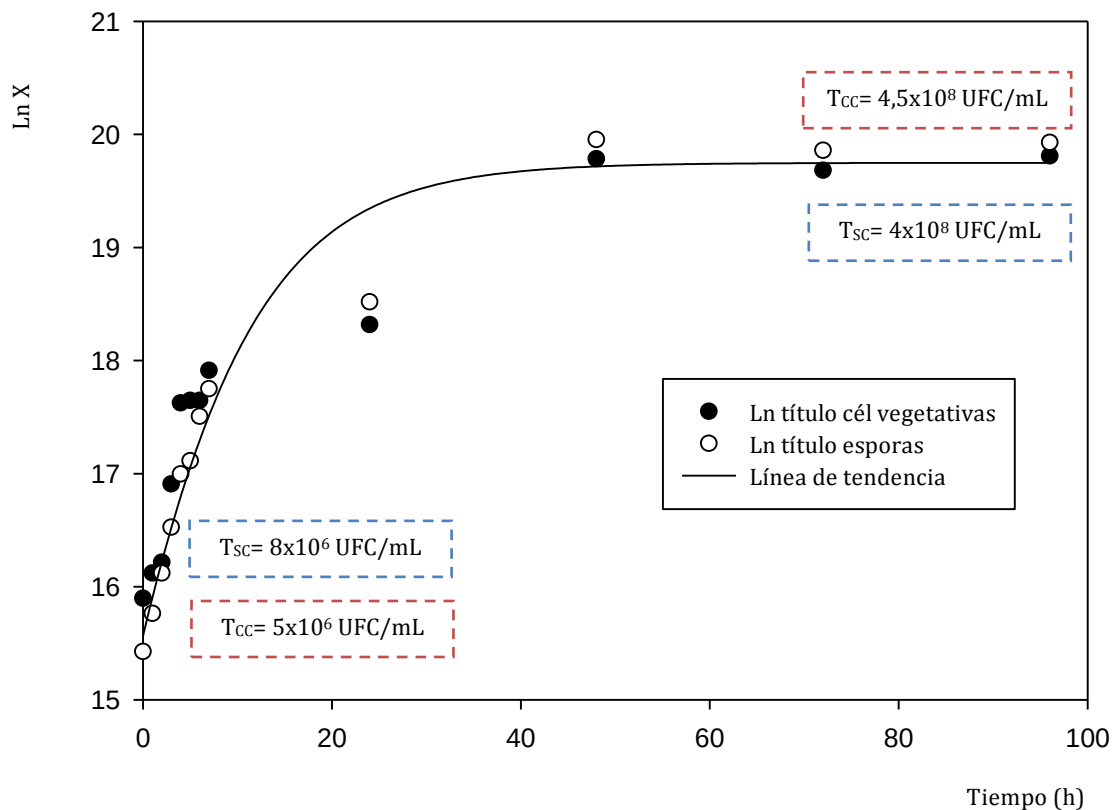
| TIEMPO (h) | SUBPRODUCTOS 1 (S1) |                    | SUBPRODUCTOS 2 (S2) |                    |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|            | Sin choque térmico  | Con choque térmico | Sin choque térmico  | Con choque térmico |
| 0          | 0                   | 1x10 <sup>6</sup>  | 0                   | 0                  |
| 1          | 2x10 <sup>6</sup>   | 2x10 <sup>6</sup>  | 1x10 <sup>6</sup>   | 0                  |
| 2          | 0                   | 2x10 <sup>6</sup>  | 1x10 <sup>6</sup>   | 0                  |
| 3          | 2x10 <sup>6</sup>   | 2x10 <sup>6</sup>  | 0                   | 0                  |
| 4          | 3x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 0                   | 0                  |
| 5          | 2x10 <sup>6</sup>   | 1x10 <sup>6</sup>  | 4x10 <sup>6</sup>   | 0                  |
| 6          | 1x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 0                   | 0                  |
| 7          | 3x10 <sup>6</sup>   | 1x10 <sup>6</sup>  | 0                   | 0                  |
| 24         | 1x10 <sup>6</sup>   | 1x10 <sup>6</sup>  | 0                   | 0                  |
| 48         | 0                   | 1x10 <sup>6</sup>  | 0                   | 0                  |
| 72         | 1x10 <sup>6</sup>   | 1x10 <sup>6</sup>  | 1x10 <sup>6</sup>   | 0                  |

Se observa en la tabla 11 que al hacer la evaluación de la presencia de esporas en el medio S1 no hubo variación en los títulos obtenidos a las 0 y a las 72 horas de incubación. Además, los títulos a las 72 horas, al aplicar choque térmico y sin aplicarlo, fueron los mismos.

Por otro lado, el crecimiento en el medio S2 sólo pudo ser evidenciado sin exponer el cultivo al calor. Al aplicar choque térmico, en ninguno de los tiempos evaluados, se contabilizaron esporas.

A partir de los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento de *Bti*, en los medios S1 y S2, se plantearon nuevas composiciones de medios, con la finalidad de evaluar los tres subproductos agroindustriales constituyentes de dichos medios y poder determinar cuál de estos pudiera estar afectando, en particular, la cinética de las esporas resistentes al calor.

En principio, se plantearon 4 medios de cultivo. Un primer medio de cultivo (MC1) compuesto por Concentrín 21® y las sales del medio A80. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.



**Figura 10.** Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC1 compuesto por Concentrín 21® y sales Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○).  
T<sub>sc</sub>: Título sin choque térmico. T<sub>cc</sub>: Título con choque térmico.

Al realizar los cálculos de los parámetros cinéticos a partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Bti* en MC1, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de *Bti* en MC1

| Medio | TRATAMIENTO | $\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> ) | Tg (h) |
|-------|-------------|---------------------------------------|--------|
| MC1   | SC          | 0.7044                                | 1.0    |

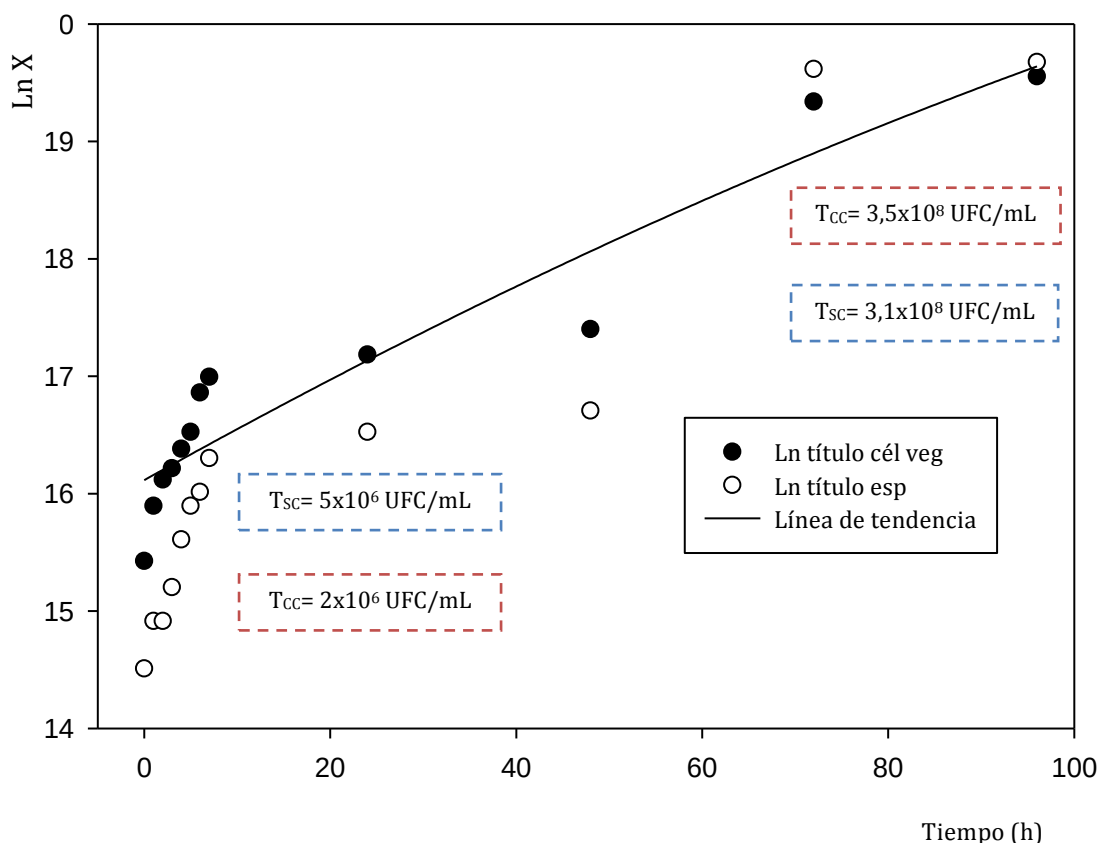
SC: Sin choque;  $\mu_{\text{máx}}$ : velocidad máxima de crecimiento bacteriano; Tg: Tiempo generacional

En la figura 10 se observa un aumento de los títulos de manera exponencial en las primeras horas de evaluación. En esta etapa del crecimiento, se calcularon los valores de la  $\mu_{\text{máx}}$  y Tg



(Tabla 12). Seguidamente, se observa la fase estacionaria con una duración de 48 horas. En esta fase, el título de las esporas resistentes al calor se igualó al título obtenido sin aplicar choque térmico.

Adicionalmente, se planteó el medio MC2 compuesto por melaza y Concentrín 21®. El resultado de la curva de crecimiento se encuentra reflejado en la Figura 11.



**Figura 11.** Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC2 compuesto por Concentrín 21® y melaza. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○).  $T_{sc}$ : Título sin choque térmico.  $T_{cc}$ : Título con choque térmico.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Bti* en MC2 se encuentran reflejados en la Tabla 13.

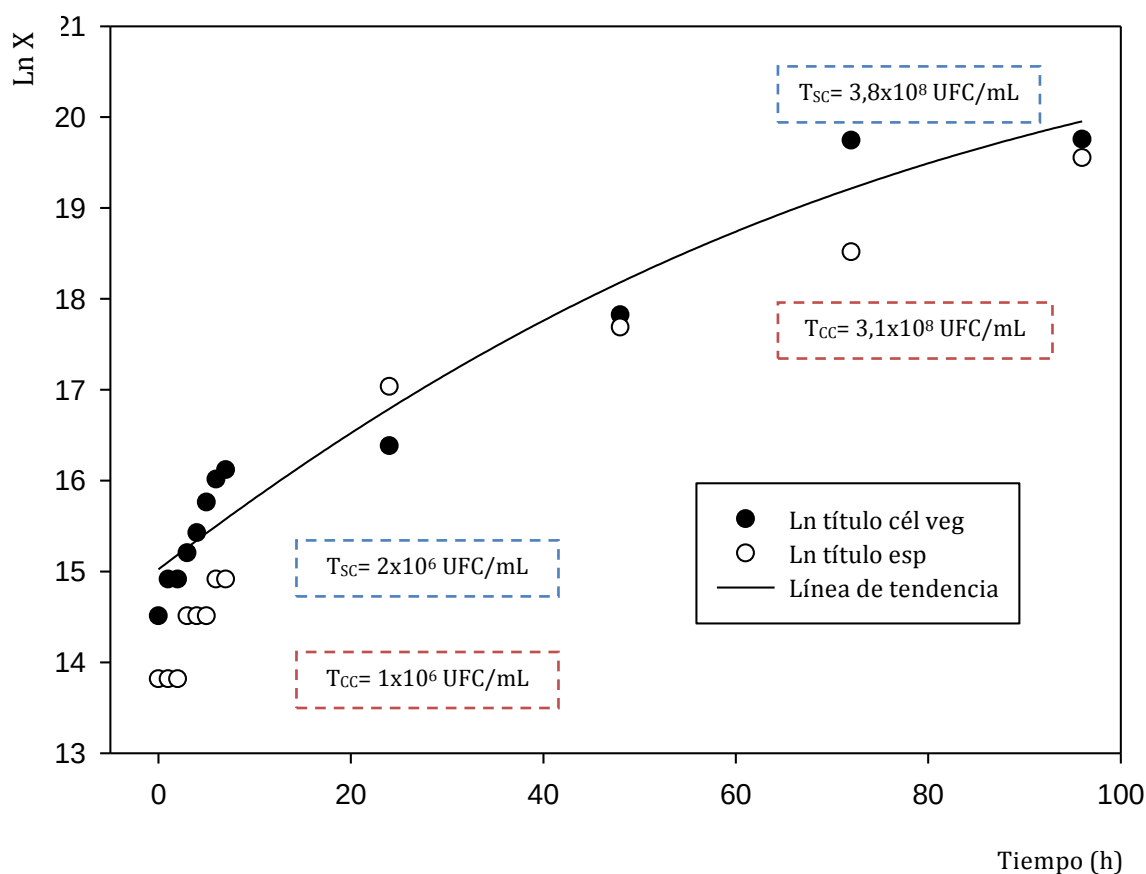
**Tabla 13.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de *Bti* en MC2

| Medio | TRATAMIENTO | $\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ ) | Tg (h) |
|-------|-------------|----------------------------------------|--------|
| MC2   | SC          | 0.2013                                 | 3.4    |

SC: Sin choque;  $\mu_{\text{máx}}$ : velocidad máxima de crecimiento bacteriano; Tg: Tiempo generacional

En la figura 11 se puede observar la cinética de crecimiento de *Bti* en MC2, donde hubo un aumento de los títulos en las primeras horas. Al final del crecimiento, se alcanzó la fase estacionaria, en la cual los títulos son muy similares al aplicar choque térmico y sin aplicarlo ( $T_{\text{SC}} = 3,1 \times 10^8$  cél/mL y  $T_{\text{CC}} = 3,5 \times 10^8$  cél/mL).

Por otro lado, también se evaluó el crecimiento de *Bti* en el medio MC3, compuesto únicamente por Concentrín 21®. La cinética del crecimiento se encuentra en la Figura 12.



**Figura 12.** Curva de crecimiento de *Bti* en el medio MC3 compuesto únicamente por Concentrín 21® Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando a choque térmico (○).  $T_{\text{SC}}$ : Título sin choque térmico.  $T_{\text{CC}}$ : Título con choque térmico.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Bti* en MC3 se encuentran reflejados en la Tabla 14.

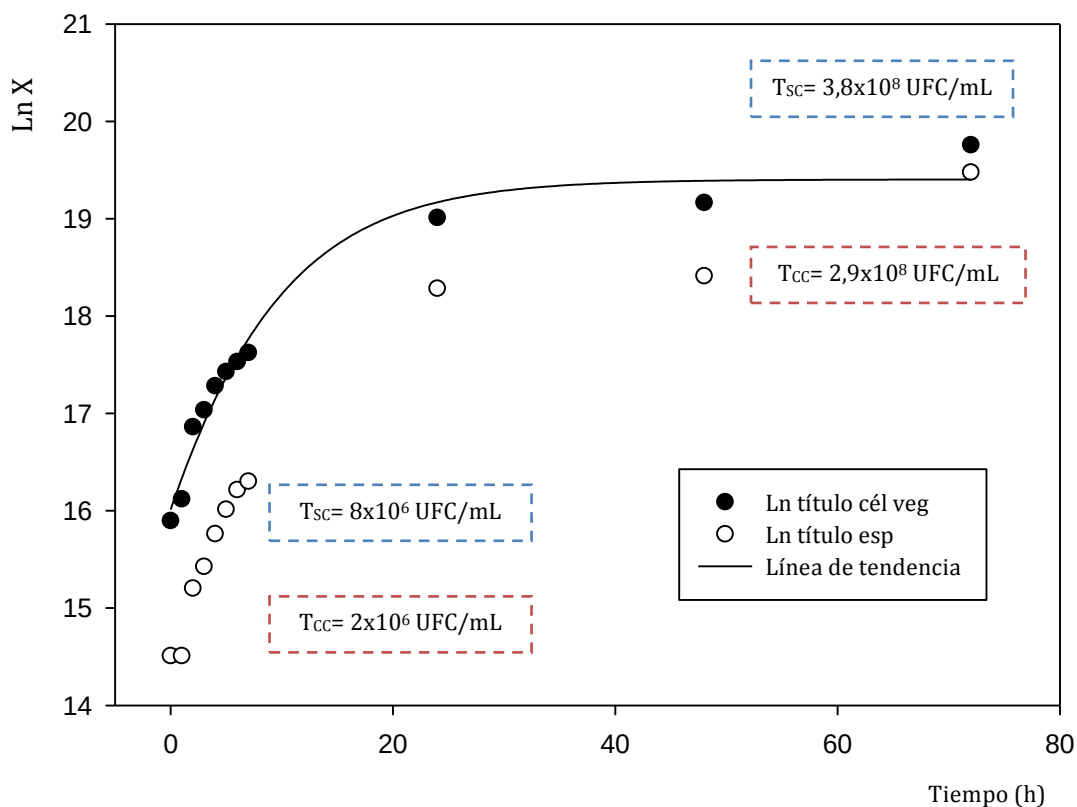
**Tabla 14.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de *Bti* en MC3

| MEDIO | TRATAMIENTO | $\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ ) | Tg (h) |
|-------|-------------|----------------------------------------|--------|
| MC3   | SC          | 0.2324                                 | 3.0    |

SC: Sin choque;  $\mu_{\text{máx}}$ : velocidad máxima de crecimiento bacteriano; Tg: Tiempo generacional

En el crecimiento de *Bti* en el medio MC3 mostrado en la figura 12, no se observó un aumento poco acelerado de los títulos bacterianos hasta las 24 horas. A partir de este tiempo y hasta las 72 horas, el aumento del título bacteriano es más notable. Luego de las 72 horas, se evidencia la fase estacionaria. Al final de la evaluación, el título de las esporas termorresistentes fue similar al título obtenido sin choque térmico ( $T_{\text{SC}} = 3,8 \times 10^8$  cél/mL y  $T_{\text{CC}} = 3,1 \times 10^8$  cél/mL).

Por último, el crecimiento de *Bti* en el medio MC4, compuesto por melaza, Concentrín 21® y sales definidas (del medio A80), también fue evaluado. Los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento en dichos medios se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** Curva de crecimiento de Bti en el medio MC4 compuesto por Concentrín 21<sup>®</sup>, melaza y sales. Sin aplicar choque térmico (●) y aplicando choque térmico (○). Tsc: título sin aplicar choque térmico. Tcc: Título con choque térmico

Los resultados obtenidos en el cálculo de los parámetros cinéticos calculados se encuentran reflejados en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Parámetros cinéticos obtenidos a partir de la fase exponencial de crecimiento de Bti en MC4

| Medio | TRATAMIENTO | $\mu_{\text{máx}}$ (cél/h) | Tg (h) |
|-------|-------------|----------------------------|--------|
| MC4   | SC          | 0.3038                     | 2.3    |

SC: Sin choque;  $\mu_{\text{máx}}$ : velocidad máxima de crecimiento bacteriano; Tg: Tiempo generacional

Como se observa en la figura 13, en las primeras horas, los títulos bacterianos aumentan lentamente a medida que transcurre el tiempo de incubación. Los parámetros cinéticos fueron calculados en esta primera etapa. A las 24 horas, los títulos aumentan de forma exponencial donde posteriormente alcanzan la fase estacionaria, a las 72 horas ( $3,8 \times 10^8$  cél/mL). La

presencia de esporas termorresistentes se observó con el comportamiento esperado; al inicio de la evaluación, títulos de esporas por debajo de los títulos de las células vegetativas, y al final de la curva, títulos similares (con y sin tratamiento térmico).

### C. Pruebas con Vinaza

Las pruebas con vinaza se realizaron con la finalidad de evaluar el crecimiento de *Bti* con este subproducto como fuente de sales. En primer lugar, se planteó una batería de medios con diferentes concentraciones de vinaza, con el objetivo de conocer aquella que permitiría el crecimiento de *Bti* y sobretodo que garantizara la formación del complejo espora-cristal. Las evaluaciones se hicieron en el momento de inoculación del medio y luego en la fase estacionaria, a las 72 horas. Como fuente de carbono y nitrógeno se utilizó el Concentrín 21® (1,8 % p/v). Los resultados se exponen en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Títulos de los cultivos de *Bti* a las diferentes concentraciones de vinaza

|                  |      | Título Bacteriano (UFC/mL) |                     |                    |                     |
|------------------|------|----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Medio            | pH   | Sin choque térmico         |                     | Con choque térmico |                     |
|                  |      | T <sub>0</sub>             | T <sub>72</sub>     | T <sub>0</sub>     | T <sub>72</sub>     |
| MC1              | 5,2  | 7x10 <sup>6</sup>          | 4,8x10 <sup>8</sup> | 5x10 <sup>6</sup>  | 4,5x10 <sup>8</sup> |
| MC2              | 4,29 | 5x10 <sup>6</sup>          | 5x10 <sup>6</sup>   | 5x10 <sup>6</sup>  | 3x10 <sup>6</sup>   |
| MC3              | 4,03 | 3x10 <sup>6</sup>          | 3x10 <sup>6</sup>   | 2x10 <sup>6</sup>  | 3x10 <sup>6</sup>   |
| V <sub>2,5</sub> | 4,5  | 1x10 <sup>7</sup>          | 8x10 <sup>7</sup>   | 0                  | 0                   |
| V <sub>5</sub>   | 4,7  | 1x10 <sup>7</sup>          | 1x10 <sup>7</sup>   | 0                  | 0                   |
| V <sub>7,5</sub> | 4,98 | 2x10 <sup>6</sup>          | 6x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 1x10 <sup>6</sup>   |
| V <sub>10</sub>  | 5,01 | 2x10 <sup>7</sup>          | 5x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 0                   |
| V <sub>15</sub>  | 5,04 | 2x10 <sup>6</sup>          | 2,7x10 <sup>7</sup> | 0                  | 7x10 <sup>6</sup>   |
| V <sub>20</sub>  | 5,07 | 0                          | 1x10 <sup>7</sup>   | 0                  | 1x10 <sup>6</sup>   |
| V <sub>25</sub>  | 5,07 | 4x10 <sup>6</sup>          | 2x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 0                   |
| V <sub>30</sub>  | 5,09 | 2x10 <sup>6</sup>          | 0                   | 0                  | 0                   |

V<sub>x</sub>: Medio compuesto por 1,8 g de Concentrín 21®, donde x representa la concentración de vinaza (% v/v).

T<sub>0</sub>: Tiempo de inoculación, T<sub>72</sub>: Tiempo a las 72 horas.

Se observa una variabilidad en los títulos obtenidos para las diferentes concentraciones de vinaza, cuando no se aplicó tratamiento térmico al cultivo. Se resalta que al someter el cultivo a choque térmico, a las 72 horas de incubación, cinco de éstos no mostraron presencia de esporas termorresistentes ( $V_{2,5}$ ,  $V_5$ ,  $V_{10}$ ,  $V_{25}$  y  $V_{30}$ ) . En aquellos cultivos donde hubo crecimiento, los títulos fueron menores a los obtenidos en el  $T_{72}$  sin choque térmico.

Al no obtener los resultados esperados en este experimento, se especuló que la vinaza podría tener un pH fuera del rango óptimo para el crecimiento de *Bti*, y que por este motivo, pudiera actuar como inhibidor del crecimiento. Por esta razón, se prepararon nuevamente las baterías de medios con diferentes concentraciones de vinaza ajustando el pH a 7. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Títulos de los cultivos de Bti a las diferentes concentraciones de vinaza ajustando el pH a 7

|           |      | Título Bacteriano (UFC/mL) |                   |                    |                 |
|-----------|------|----------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| Medio     | pH   | Sin choque térmico         |                   | Con choque térmico |                 |
|           |      | $T_0$                      | $T_{72}$          | $T_0$              | $T_{72}$        |
| MC1       | 5,2  | $1 \times 10^7$            | $1 \times 10^8$   | $6 \times 10^6$    | $9 \times 10^7$ |
| MC2       | 4,29 | $6 \times 10^6$            | Incont.           | $4 \times 10^6$    | $3 \times 10^8$ |
| MC3       | 4,03 | $4 \times 10^6$            | $3,8 \times 10^8$ | $3 \times 10^6$    | $9 \times 10^7$ |
| $V_{2,5}$ | 4,5  | $6 \times 10^6$            | $4 \times 10^6$   | 0                  | $3 \times 10^6$ |
| $V_5$     | 4,7  | $9 \times 10^6$            | $1 \times 10^6$   | 0                  | $2 \times 10^6$ |
| $V_{7,5}$ | 4,98 | $1 \times 10^6$            | $2 \times 10^6$   | 0                  | $2 \times 10^6$ |
| $V_{10}$  | 5,01 | $1 \times 10^7$            | 0                 | 0                  | $3 \times 10^6$ |
| $V_{15}$  | 5,04 | $1 \times 10^6$            | 0                 | 0                  | 0               |
| $V_{20}$  | 5,07 | 0                          | $1 \times 10^6$   | 0                  | 0               |
| $V_{25}$  | 5,07 | $3 \times 10^6$            | 0                 | 0                  | $1 \times 10^6$ |
| $V_{30}$  | 5,09 | $1 \times 10^6$            | $1 \times 10^6$   | 0                  | $2 \times 10^6$ |

$V_x$ : Medio compuesto por 1,8 g de Concentrín 21®, donde x representa la concentración de vinaza (% v/v).

$T_0$ : Tiempo de inoculación,  $T_{72}$ : Tiempo a las 72 horas.

En la tabla 17, se observa que los títulos obtenidos sin aplicar choque térmico, a las 72 horas, fueron menores a los observados en el  $T_0$  de inoculación, y los que no fueron menores

se mantuvieron en el mismo orden de magnitud. Además, al aplicar choque térmico, a las 72 horas, se obtuvieron títulos menores a los observados en el  $T_0$ , para las diferentes concentraciones de vinaza.

En vista de que al abrir los medios que contenían vinaza se percibía un fuerte olor a alcohol se decidió realizar una nueva prueba. Este ensayo consistió en hervir la vinaza durante 30 minutos a baja llama. Al dejar enfriar se repitió nuevamente el proceso de siembra,  $T_0$  y  $T_{72}$ , con y sin choque térmico. Se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Títulos de los cultivos de *Bti* a las diferentes concentraciones de vinaza hervida

| Medio            | Título Bacteriano (UFC/mL) |                   |                    |                   |
|------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                  | Sin choque térmico         |                   | Con choque térmico |                   |
|                  | $T_0$                      | $T_{72}$          | $T_0$              | $T_{72}$          |
| V <sub>2,5</sub> | 8x10 <sup>6</sup>          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 3x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>5</sub>   | 3x10 <sup>6</sup>          | 0                 | 0                  | 2x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>7,5</sub> | 1x10 <sup>6</sup>          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |
| V <sub>10</sub>  | 0                          | 0                 | 0                  | 2x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>15</sub>  | 2x10 <sup>6</sup>          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 2x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>20</sub>  | 0                          | 3x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |
| V <sub>25</sub>  | 0                          | 0                 | 0                  | 1x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>30</sub>  | 0                          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |

V<sub>x</sub>: Medio compuesto por 1,8 g de Concentrín 21®, donde x representa la concentración de vinaza (% v/v).

$T_0$ : Tiempo de inoculación,  $T_{72}$ : Tiempo a las 72 horas.

Al hacer las evaluaciones del crecimiento de *Bti* en diferentes concentraciones de vinaza hervida con el objetivo de evaluar la presencia de esporas termorresistentes, se obtuvo que los títulos, a las 72 horas de evaluación, fueron menores a los observados al  $T_0$  de inoculación en casi todos los medios.

Adicionalmente, se ajustó el pH a un valor igual a 7 en la vinaza hervida a diferentes concentraciones. Los resultados se encuentran reflejados en la siguiente tabla 19.

**Tabla 19.** Títulos de los cultivos de *Bti* a las diferentes concentraciones de vinaza hervida ajustando a pH 7

| Medio            | Título Bacteriano (UFC/mL) |                   |                    |                   |
|------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                  | Sin choque térmico         |                   | Con choque térmico |                   |
|                  | T <sub>0</sub>             | T <sub>72</sub>   | T <sub>0</sub>     | T <sub>72</sub>   |
| V <sub>2,5</sub> | 5x10 <sup>6</sup>          | 3x10 <sup>6</sup> | 0                  | 2x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>5</sub>   | 2x10 <sup>6</sup>          | 0                 | 0                  | 2x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>7,5</sub> | 0                          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |
| V <sub>10</sub>  | 0                          | 0                 | 0                  | 2x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>15</sub>  | 1x10 <sup>6</sup>          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |
| V <sub>20</sub>  | 0                          | 1x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |
| V <sub>25</sub>  | 0                          | 0                 | 0                  | 1x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>30</sub>  | 0                          | 2x10 <sup>6</sup> | 0                  | 0                 |

V<sub>x</sub>: Medio compuesto por 1,8 g de Concentrín 21<sup>®</sup>, donde x representa la concentración de vinaza (% v/v).

T<sub>0</sub>: Tiempo de inoculación, T<sub>72</sub>: Tiempo a las 72 horas.

Se observa que se obtuvieron comportamientos similares en el crecimiento de *Bti* con medios con vinaza hervida ajustando el pH respecto a la vinaza hervida sin ajustar esta variable.

Con base en los resultados obtenidos al utilizar la vinaza del laboratorio, se especuló que probablemente los aspectos del procesamiento de la muestra de vinaza en la empresa Ron Santa Teresa C.A. eran diferentes en cada ronda de destilación, y por lo tanto la vinaza se ve afectada por esas variables (época del año, condiciones de riego de la caña, entre otros). Por esta razón, se hizo una nueva solicitud de un lote de vinaza a la misma empresa. La muestra con la que se hicieron los primeros ensayos fue denominada “vinaza vieja” para distinguirla de la “vinaza nueva”.

Por consiguiente, se realizó nuevamente una batería de diferentes concentraciones utilizando la vinaza nueva sin ajustar el valor de pH. Los valores de pH obtenidos para cada concentración de vinaza nueva dieron similares a los obtenidos en la vinaza vieja. Asimismo, los resultados de los títulos de *Bti* obtenidos a partir de diferentes concentraciones de vinaza nueva, presentaron un comportamiento similar utilizando la vinaza vieja. Por este motivo, se



decidió evaluar la batería de medios a partir de vinaza nueva pero esta vez, ajustando el valor de pH a 7, para observar así el comportamiento de la bacteria bajo estas condiciones. Los resultados obtenidos se encuentran expresados en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Títulos de los cultivos de *Bti* a las diferentes concentraciones de vinaza nueva ajustando el pH a 7

| Medio            | Título Bacteriano (UFC/mL) |                     |                    |                   |
|------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
|                  | Sin choque térmico         |                     | Con choque térmico |                   |
|                  | T <sub>0</sub>             | T <sub>72</sub>     | T <sub>0</sub>     | T <sub>72</sub>   |
| V <sub>2,5</sub> | 4x10 <sup>6</sup>          | 2x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 0                 |
| V <sub>5</sub>   | 1x10 <sup>6</sup>          | 4x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 1x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>7,5</sub> | 1x10 <sup>6</sup>          | 3x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 3x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>10</sub>  | 3x10 <sup>6</sup>          | 8x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 1x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>15</sub>  | 1x10 <sup>6</sup>          | 1,1x10 <sup>7</sup> | 0                  | 1x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>20</sub>  | 0                          | 1,4x10 <sup>7</sup> | 0                  | 1x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>25</sub>  | 1x10 <sup>6</sup>          | 0                   | 0                  | 4x10 <sup>6</sup> |
| V <sub>30</sub>  | 2x10 <sup>6</sup>          | 7x10 <sup>6</sup>   | 0                  | 4x10 <sup>6</sup> |

V<sub>x</sub>: Medio compuesto por 1,8 g de Concentrín 21®, donde x representa la concentración de vinaza (% v/v).

T<sub>0</sub>: Tiempo de inoculación, T<sub>72</sub>: Tiempo a las 72 horas.

En la tabla 20, se observa que sin aplicar choque térmico los títulos iniciales presentaron valores similares luego de 72 horas. No obstante, tampoco se observó aumento, y en algunos casos hubo disminución de los títulos a las 72 horas, aplicando choque térmico respecto a los reflejados inicialmente en T<sub>0</sub> sin aplicar este tratamiento.

En resumen, el crecimiento de *Bti* utilizando la vinaza como fuente de sales no representó la mejor opción para obtener un alto título de esporas, que son de gran interés en este trabajo. Sin embargo, se pudo observar que los medios MC1, MC2, MC3 y MC4 que presentaban Concentrín 21® y melaza como subproductos agroindustriales constituyentes del medio, si reflejaron altos títulos esporulativos. Por consiguiente, estos medios representan una excelente opción para el crecimiento de *Bti*. En la tabla 21 se representan los resultados obtenidos durante los experimentos con los medios elegidos para realizar los bioensayos.

**Tabla 21.** Resumen de los títulos de Bti obtenidos en diferentes medios de cultivo

| MEDIOS              | $\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> ) | Tg (h) | Tratamiento | Títulos (UFC/mL)    |                     |
|---------------------|---------------------------------------|--------|-------------|---------------------|---------------------|
|                     |                                       |        |             | T <sub>0</sub>      | T <sub>96</sub>     |
| A80                 | 0,5873                                | 1,2    | SC          | 1,5x10 <sup>7</sup> | 2,9x10 <sup>8</sup> |
|                     |                                       |        | CC          | 1x10 <sup>7</sup>   | 3,3x10 <sup>8</sup> |
| MC1 (C21-Sales)     | 0,7044                                | 1,0    | SC          | 8x10 <sup>6</sup>   | 4x10 <sup>8</sup>   |
|                     |                                       |        | CC          | 5x10 <sup>6</sup>   | 4,5x10 <sup>8</sup> |
| MC2 (C21-Mel)       | 0,2013                                | 3,4    | SC          | 5x10 <sup>6</sup>   | 3,1x10 <sup>8</sup> |
|                     |                                       |        | CC          | 2x10 <sup>6</sup>   | 3,5x10 <sup>8</sup> |
| MC3 (Melaza)        | 0,2324                                | 3,0    | SC          | 2x10 <sup>6</sup>   | 3,8x10 <sup>8</sup> |
|                     |                                       |        | CC          | 1x10 <sup>6</sup>   | 3,1x10 <sup>8</sup> |
| MC4 (Mel-Sales-C21) | 0,3038                                | 2,3    | SC          | 8x10 <sup>6</sup>   | 3,8x10 <sup>8</sup> |
|                     |                                       |        | CC          | 2x10 <sup>6</sup>   | 2,9x10 <sup>8</sup> |

SC: Sin choque térmico, CC: Con choque térmico,  $\mu_{\text{máx}}$ : Velocidad máxima de crecimiento, Tg: Tiempo generacional, T<sub>0</sub>: Tiempo cero, T<sub>96</sub>: Tiempo a las 96 horas

#### D. Análisis de vinaza

Luego del análisis de los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las diferentes concentraciones de vinaza evaluadas y de probar este subproducto obtenido en tiempos diferentes, se destaca el hecho de que la vinaza no puede ser utilizada como fuente de sales para el crecimiento de *Bti*. Para corroborar esta afirmación se enviaron muestras de vinaza vieja, vinaza hervida y vinaza nueva para su análisis en el Laboratorio de Cromatografía Gaseosa (LCG), del Instituto de Ciencias de la Tierra, Universidad Central de Venezuela. Los resultados de los análisis se encuentran reflejados en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Análisis de vinazas suministrados por el LCG, del Instituto de Ciencias de la Tierra, UCV.

| Elementos                                               | Porcentaje            |                       |
|---------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                         | Vinaza Vieja          | Vinaza Nueva          |
| <b>Ca</b> (% P/P) $\pm 0.0025$                          | 0,0574                | 0,0104                |
| <b>Mg</b> (% P/P) $\pm 0.0011$                          | 0,0586                | 0,003                 |
| <b>Fe</b> (% P/P) $\pm 0.0015$                          | 0,0292                | 0,0038                |
| <b>Zn</b> (% P/P) $\pm 1.05 \times 10^{-5}$             | $1,12 \times 10^{-3}$ | $1,40 \times 10^{-4}$ |
| <b>Mn</b> (% P/P) $\pm 1.05 \times 10^{-5}$             | $1,01 \times 10^{-3}$ | $1,77 \times 10^{-4}$ |
| <b>K</b> (% P/P) $\pm 0.0085$                           | 3,952                 | 0,3583                |
| <b>Cl Total</b> (% P/P) $\pm 0.02$                      | 0,37                  | 0,09                  |
| <b>N Total</b> (% P/P) $\pm 0.02$                       | 0,11                  | 0,27                  |
| <b>Sulfato</b> (% P/P) $\pm 0.03$                       | 0,08                  | 0,22                  |
| <b>Fosfatos</b> (% P/P)                                 | $< 10 \times 10^{-3}$ | $< 10 \times 10^{-3}$ |
| <b>Materia orgánica total</b><br>(% P/P) $\pm 0.40$     | 99,18                 | 88,63                 |
| <b>Sólidos Totales disueltos*</b><br>(% P/P) $\pm 0.01$ | 0,04                  | 0,12                  |
| <b>Sólidos totales</b><br>(% P/P) $\pm 0.06$            | 0,13                  | 0,36                  |

\*Calculados sin tomar en cuenta la materia orgánica total, se realizó con base en las cenizas

En la tabla anterior se puede observar una clara diferencia entre los porcentajes de cada uno de los elementos entre la vinaza nueva y la vinaza vieja. En el caso de los elementos Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, K, Cl y materia orgánica total, se observa que para la vinaza vieja se encuentran en mayor proporción que en la vinaza nueva. A diferencia de N total, sulfatos y sólidos totales, que en la vinaza nueva su proporción es mayor. En el caso de los fosfatos los porcentajes son iguales para ambos tipos de vinaza.

A partir de los datos anteriores se calculó el aporte de cada uno de los elementos para un medio de subproductos con vinaza (20 % v/v). Estos valores fueron comparados con el aporte de cada uno en el medio A80. Para ello, la vinaza vieja fue llevada a una estufa a 60 °C para la determinación del valor de peso seco constante, de 25 mL de este subproducto agroindustrial,

como se indica en la tabla 23. La vinaza nueva se descartó debido a que aporta menores cantidades de los elementos que la vinaza vieja.

**Tabla 23.** Peso seco constante de la vinaza (60 °C / 72 h)

| Peso \ Muestra                         | Vinaza vieja (g) |
|----------------------------------------|------------------|
| Peso de placa ( $P_p$ )                | 49,28            |
| $P_p + 25 \text{ mL de vinaza}$        | 73,36            |
| Peso de 25 mL de vinaza ( $P_v$ )      | 24,08            |
| Peso seco total a las 72 h ( $P_s$ )   | 64,40            |
| Peso seco de la vinaza ( $P_s - P_p$ ) | 15,12            |

En la Figura 14 se observa la placa que contenía vinaza sometida a temperatura de 60 °C.



**Figura 14.** Fotografías de la vinaza vieja sometida a calor hasta peso constante.

En la figura 14 se observa que la vinaza vieja quedó caramelizada al transcurrir las 72 horas. Con este tratamiento se pudo evidenciar un alto contenido de sólidos en este subproducto. Además, con estos valores se pudo calcular la densidad de la vinaza:

$$\frac{24,08g}{25mL} = 0,96 \text{ g/mL}$$

Por otro lado, sabiendo que 25 mL de vinaza tienen un peso de 24,08 g, y sabiendo que la vinaza deshidrata tuvo un peso de 15,12 g, se pudo calcular el contenido fraccional de sólidos en la vinaza:

$$\frac{15,12g}{24,08g} = 0,63$$

Conociendo la densidad de la vinaza (0,96 g/mL), se realizaron los cálculos correspondientes al aporte de sales y otros elementos en un medio que contenía 20 % v/v de vinaza. Con dichos valores se hicieron las comparaciones del aporte de los elementos en el medio A80. Como ejemplo se muestra a continuación el aporte de la cantidad de fosfatos en ambos medios.

✓ Fosfatos en el medio A80:

En este medio definido, los fosfatos son aportados por los compuestos  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ . De cada una de estas sales se agrega 1 g por litro de medio.

Sabiendo que el peso molecular de  $K_2HPO_4$  es 174,2 g/mol, de los cuales el peso del  $PO_4^{2-}$  corresponde a 95 g/mol, la fracción de fosfatos ( $PO_4^{2-}$ ) dado por este compuesto es:

$$\frac{95g PO_4}{174,2g K_2HPO_4} * 1g K_2HPO_4 = 0,54g \text{ de } PO_4$$

De la misma manera se calculó el aporte de fosfato dado por el compuesto  $KH_2PO_4$ , sabiendo que su peso molecular es igual a 136,1 g/mol, entonces el aporte de fosfatos ( $PO_4$ ) dado por esta sal es:

$$\frac{95\text{g PO}_4}{136,1\text{g K}_2\text{HPO}_4} * 1\text{g K}_2\text{HPO}_4 = 0,69\text{g de PO}_4$$

Por lo tanto, el total de fosfato en el medio A80 es igual a la suma de los valores obtenidos:

$$(0,54 + 0,69)\text{g} = 1,23\text{g PO}_4/\text{L}$$

✓ Fosfatos en el medio S1:

Luego, se realizaron los cálculos de aportes de fosfato en los 150 mL del medio S1, el cual estaba suplementado con 30 mL de vinaza, lo que corresponde a:

$$30\text{ mL} * 0,96\text{g/mL} = 28,9\text{ g}$$

Partiendo del porcentaje de fosfatos en la vinaza, expresados en la tabla 23, y conociendo que el peso de la vinaza en el medio S1 es de 28,9 g, se realizaron los cálculos para obtener los gramos de fosfatos presentes en la vinaza como sigue:

$$\frac{0,01\text{g PO}_4}{100\text{g Vinaza}} * 28,9\text{g Vinaza} = 0,0029\text{g PO}_4$$

Esta cantidad de fosfatos corresponde a 150 mL (0,15 L) de medio S1, pero si se quiere comparar con el medio A80 hay que hacer el cálculo para 1 L para que haya correspondencia. Entonces, se calculan los gramos de fosfatos por Litro aportados por la vinaza en el medio S1:

$$\frac{0,0029\text{g PO}_4}{0,15\text{ L}} * 1\text{L} = 0,02\text{g PO}_4/\text{L}$$

Como se puede observar, el aporte de  $\text{PO}_4$  en el medio A80 es de 1,23 g/L, es decir, mucho mayor que el aporte dado por la vinaza en el medio S1 (0,02 g/L).

El resto de los cálculos se realizaron de manera similar y se encuentran reflejados en la Tabla 24, a continuación:

**Tabla 24.** Aporte de cada elemento en el medio S1 con vinaza (20 % v/v) y en el medio A80.

| Elementos o sales<br>Medios | Nitrógeno (g/L) | Fosfatos (g/L) | Sulfatos (g/L) | Cloruro (g/L) | Calcio (g/L) | Magnesio (g/L) | Manganeso (g/L) | Potasio (g/L) |
|-----------------------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|--------------|----------------|-----------------|---------------|
| <b>S1</b>                   | 0,21            | 0,02           | 0,15           | 0,71          | 0,12         | 0,114          | 0,0019          | 7,61          |
| <b>A80</b>                  | 0,21            | 1,23           | 0,41           | 0,0019        | 0,011        | 0,099          | 0,0098          | 0,74          |

En la tabla 24 se destaca que en ambos medios, A80 y S1, el Nitrógeno no fue un factor limitante de los cultivos de *Bti*, pues en ambos medios los aportes fueron iguales. En cuanto a los fosfatos, sulfatos y manganeso, las cantidades aportadas por ellos son mayores en el medio de referencia A80 que en el medio con subproducto basado en vinaza S1. Contrariamente, la contribución de cloruros, calcio, magnesio y potasio fueron menores en el medio definido A80 que en el medio con vinaza S1.

## E. Bioensayos

Con base en los resultados obtenidos del análisis de la vinaza como una posible fuente de sales, y observando que los títulos de los tipos celulares (células vegetativas y esporas) presentaron valores bajos, los medios MC1, MC2, MC3 y MC4 se escogieron para los bioensayos, dado que estos evidenciaron buenos títulos de esporas resistentes al calor. En este sentido, se prepararon los cultivos en las condiciones adecuadas hasta alcanzar la fase estacionaria (72 horas) y en ese momento se sembraron en placas, las esporas termorresistentes. La concentración de las esporas termorresistentes, a las 72 horas, se

muestra en la tabla 25. Posteriormente, de estos cultivos agotados se obtuvieron los complejos espora-cristal, por medio de centrifugaciones. Las pastas obtenidas se resuspendieron para poder llevar a cabo las pruebas de toxicidad en condiciones de laboratorio. Las concentraciones de esporas de los cultivos en cada recipiente del bioensayo también se muestran en la tabla 25.

**Tabla 25.** Títulos de esporas de *Bti* en los diferentes medios y concentración de esporas inoculadas en el bioensayo con *Ae. aegypti*

| Tratamiento | Título T <sub>72</sub><br>(esp/mL) | Título Bioensayo<br>(esp/mL) |
|-------------|------------------------------------|------------------------------|
| MC1         | 4,3x10 <sup>8</sup>                | 8,6x10 <sup>7</sup>          |
| MC2         | 3,4x10 <sup>8</sup>                | 6,8x10 <sup>7</sup>          |
| MC3         | 3,2x10 <sup>8</sup>                | 6,4x10 <sup>7</sup>          |
| MC4         | 3x10 <sup>8</sup>                  | 6x10 <sup>7</sup>            |
| A80         | 4x10 <sup>8</sup>                  | 8x10 <sup>7</sup>            |

T<sub>72</sub>: tiempo 72 h

Al realizar los bioensayos para corroborar la entomotoxicidad de los cristales parasporales formados por *Bti* en los medios de cultivos con subproductos evaluados frente a larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti* se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 26, donde R1-R3 representan las tres réplicas realizadas.



**Tabla 26.** Mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* en bioensayos para evaluar la toxicidad de *Bti*

| Tratamiento | Larvas Muertas |    |    |          | Ecuación de Abott |                |
|-------------|----------------|----|----|----------|-------------------|----------------|
|             | R1             | R2 | R3 | Promedio | Resultado         | Porcentaje (%) |
| MC1         | 25             | 25 | 25 | 25       | 24.8              | 99             |
| MC2         | 25             | 25 | 25 | 25       | 24.8              | 99             |
| MC3         | 25             | 25 | 25 | 25       | 24.8              | 99             |
| MC4         | 25             | 25 | 25 | 25       | 24.8              | 99             |
| A80         | 25             | 25 | 25 | 25       | 24.8              | 99             |
| Agua        | 0              | 0  | 0  | 0        | -                 | -              |
| Tween 80    | 2              | 0  | 0  | 0.7      | -                 | -              |

En el tratamiento con medio control A80 se observó una mortalidad total en las 25 larvas de *Ae. aegypti*. Del mismo modo, en los tratamientos MC1, MC2, MC3 y MC4 todas las larvas murieron a las 24 horas siguientes de la inoculación del tratamiento. Por lo que al calcular el porcentaje de mortalidad a partir de la ecuación de Abott, se obtuvo un 99 % de mortalidad en las larvas para todos los tratamientos. En el control de agua no se registro ninguna larva muerta. Sin embargo, en el control con Tween 80 se contabilizaron dos larvas muertas, la muerte de estas dos larvas pudo deberse a causas naturales o mala manipulación durante el bioensayo.

Después de realizar el conteo de larvas muertas y vivas por tratamiento se decidió comprobar que dichas larvas murieron por la acción de *Bti* y no por algún otro factor. Para ello, tomaron larvas muertas, el mismo día en el que se evaluaron los resultados del bioensayo, y se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % para desinfectarlas en su exterior. Luego, se hizo la maceración de dichas larvas muertas y se hizo la siembra de 0,1

mL de este homogenato en placas de agar LB-penicilina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27.

**Tabla 27.** Títulos de *Bti* a partir del homogenato de larvas muertas de *Aedes aegypti* en los bioensayos

| Tratamiento | Título Bacteriano (cél/mL) |
|-------------|----------------------------|
| Agua        | -                          |
| Tween 80    | -                          |
| Cultivo 1   | $8 \times 10^7$            |
| Cultivo 2   | $5,8 \times 10^7$          |
| Cultivo 3   | $5,5 \times 10^7$          |
| Cultivo 4   | $5,3 \times 10^7$          |
| A80         | $7,5 \times 10^7$          |

Los títulos bacterianos reflejados en la tabla 27 permiten demostrar la existencia de *Bti* en el interior de las larvas, por lo que comprobaron que la muerte de estos insectos fue debida al consumo del cristal paraesporal.

## DISCUSIÓN

El conocimiento básico relacionado con los requerimientos nutricionales de *Bt* es el paso inicial en el proceso de optimización de un medio de cultivo con propósitos de escalamiento

Es de destacar que en la formulación de medios de cultivos con subproductos agroindustriales es indispensable partir de inóculos puros. Es por ello que se verificó que la cepa tuviera el fenotipo característico de *Bt* (pen<sup>r</sup>, stp<sup>s</sup>, hem<sup>+</sup>) (Jensen *et al.*, 2003) y la presencia del cristal, al cabo de 72 horas de incubación. Inicialmente, la cepa proveniente de Barquisimeto, fue activada en caldo LB y posteriormente almacenada para su utilización. Luego de su activación, se evaluó su fenotipo a través de la siembra en placas con agares selectivos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9 y la figura 7, donde se observó que no hubo crecimiento en placas con estreptomicina, por lo que la bacteria es sensible a este antibiótico (Monnerat *et al.*, 2001). Además, si hubo crecimiento en placas de penicilina, verificando su resistencia (Silva-Werneck y Monnerat, 2001). En cuanto a las placas de agar sangre, se observó un halo transparente alrededor de la colonia de *Bti* sembrada, esto es debido a la acción de las hemolisinas que lisan los eritrocitos de los vertebrados (Ramaraio y Sanchis, 2013), indicando la hemólisis positiva (Jensen *et al.*, 2003).

Una vez llevada a cabo la selección por pruebas fenotípicas, se procedió a hacer la observación en microscopio de contraste de fases, del cristal parasporal de *Bti*, en un cultivo en fase estacionaria. En la figura 8 se pudo ver el complejo espora-cristal libre en suspensión. La observación del cristal refringente en la fase de esporulación permite diferenciar a *Bt* de otras especies del complejo *Bacillus cereus*, pues los otros miembros de este grupo no lo sintetizan (Porcar y Caballero, 2000). También se observaron los esporangios de *Bt*, con las esporas ovaladas en posición subterminal y sin deformar el perfil bacilar, acompañadas del

cristal. Este tipo de contorno celular es característico de *Bt* y se diferencia de *Bacillus sphaericus* (otra bacteria entomopatógena también usada en el control de dípteros) cuya espora distiende el esporangio dándole forma de raqueta (Gajardo *et al.*, 2012).

Con estas pruebas bioquímicas y con la observación en microscopio óptico, se pudo corroborar que la cepa usada en este trabajo se trató de *Bti* y por lo tanto los inóculos preparados provenían de cultivos puros.

En la preparación de un cultivo por lote de *Bti* en medio A80, se pudo evaluar la cinética del crecimiento de esta bacteria. Este medio diseñado por Arcas (1984) fue usado como control, pues se trata de un medio definido, donde se conocen las cantidades de todos los compuestos con los que se suplementa el mismo. En el Laboratorio de Procesos Fermentativos se ha comprobado que este medio presenta las proporciones y componentes ideales para el crecimiento abundante de *Bt*, y sobretodo, permite la formación del complejo espora-cristal (Brazon, 1998 y Peñalver, 2005). Su constitución radica principalmente en tres soluciones (tabla 4): la fuente de nitrógeno, la fuente de sales y la solución de glucosa. Se observa en la figura 9, que una vez inoculado el A80, comenzó el desarrollo de la fase exponencial de crecimiento de *Bti*, la cual se evidenció durante las primeras 7 horas de evaluación. No hubo presencia de la fase de latencia, debido a que el cultivo se partió de un preinóculo hecho en el mismo A80. Durante las primeras horas de incubación, los nutrientes que componen el medio de cultivo se encuentran en altas proporciones, contribuyendo de forma exponencial al crecimiento de *Bti*. Al transcurrir las 48 horas, se alcanzó la fase estacionaria. Durante esta fase, ocurre el agotamiento de los nutrientes del medio provocando una disminución de las células vegetativas y, de forma proporcional, un aumento de las esporas y por consiguiente, un aumento en el conteo del cristal paraesporal, característico de *Bti* con actividad bioinsecticida. En la curva de crecimiento de *Bti* en A80 no se observó una

fase de muerte, posiblemente debido a que al agotarse todos los recursos del medio, la bacteria entró en la fase esporulativa de su ciclo de vida, lo que le permite mantenerse en forma latente hasta encontrar los recursos nutricionales necesarios para activarse nuevamente y germinar. Es de destacar que las evaluaciones realizadas se hicieron hasta las 96 horas, tiempo en el cual el cultivo alcanzó la lisis total (Porcar y Juárez, 2004). Los resultados obtenidos indicaron que la bacteria tuvo el crecimiento esperado, donde se obtuvieron altos títulos de células vegetativas y al final altos títulos de esporas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Brazón (1998) cuando realizó una curva de crecimiento en este mismo medio, usando como microorganismo modelo a *Btk*.

Vale la pena destacar que los cultivos por lotes de *Bti* realizados en este trabajo se llevaron a cabo en frascos agitados a escala de laboratorio, Buitrago (2004) menciona que el cultivo agitado o fermentación sumergida, es el método que asegura altos rendimientos, calidad homogénea y tiempos de fermentación relativamente cortos. Así mismo, la producción en cultivos por lotes proporciona altos rendimientos de  $\delta$ -endotoxina, ya que la misma se sintetiza durante la esporulación, la cual tiene lugar en la fase de crecimiento estacionaria. Por lo tanto, los cultivos en “Batch” resultan el método de elección para la producción masiva de *Bt* (OMS, 1990).

En cuanto a los parámetros cinéticos, calculados a partir de la ecuación de la recta, tomando los valores de la fase exponencial, también se obtuvieron resultados parecidos a los reportados por Brazón (1998). La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de *Bti* en A80 tuvo un valor igual a  $0,58 \text{ h}^{-1}$  comparado con la  $\mu_{\text{máx}}$  en Brazón (1998) de  $0,67 \text{ h}^{-1}$ . Sin embargo, Ríos y Buitrago (1999) obtuvieron un valor igual a  $0,18 \text{ h}^{-1}$ , durante el crecimiento de *Btk* en medio Luria-Bertani (LB). Este valor reportado fue mucho menor al obtenido en este trabajo y al observado en Brazón (1998). Del mismo modo, en otras investigaciones, se han reportado

valores similares de  $\mu_{\text{máx}}$  alrededor de  $0,19 \text{ h}^{-1}$ , a partir del crecimiento de *Bti* en medio LB. Estas diferencias están asociadas a que la  $\mu_{\text{máx}}$  depende principalmente del tipo de medio de cultivo donde se permita el crecimiento de la bacteria, así como también de la velocidad de agitación, aireación, temperatura, condiciones redox del medio, entre otros (Beltrán *et al.*, 2002).

Por su parte, el tiempo generacional (Tg) es calculado a partir del valor de  $\mu_{\text{máx}}$ . El Tg es un parámetro útil para el conocimiento de las condiciones fisiológicas de la población celular así como también, es un indicador de efectos positivos o negativos de algún tratamiento sobre el cultivo bacteriano (Madigan *et al.*, 2003). Se ha reportado que en general *B. thuringiensis*, posee un tiempo de generación entre 30- 90 minutos dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentre (Soberón y Bravo, 2000). En este trabajo, se obtuvieron duplicaciones de la población en 1,2 h, lo que se asemeja a el Tg igual a 1,04 h, obtenido por Brazón (1998). Asimismo, Ríos y Buitrago (1999) obtuvieron un tiempo generacional igual a 3,8 h, al cultivar *Btk* en medio semidefinido Luria-Bertani (medio LB). Igualmente, en otras investigaciones realizadas, pero con la variedad *israelensis* crecida en medio LB, las evaluaciones reportaron valores de tiempos generacionales alrededor de 3,6 h (Berdugo y Zamora, 1995; Pearson y Ward, 1983). Posiblemente, estas discrepancias con los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo se debe a que el medio LB no contiene una fuente de carbono y energía de fácil disponibilidad y además no posee la cantidad suficiente y necesaria de sales para el óptimo desarrollo de las variedades de *Bt*.

Otro parámetro a considerar es la disponibilidad de oxígeno en el cultivo de *Bt*. Muchas investigaciones dan cuenta de la importancia de la aireación, en especial durante la fase de crecimiento exponencial, pues de ello depende que en la fase estacionaria haya una buena formación de las esporas y del cristal tóxico (Avignone-Rossa *et al.*, 1992; Zouari *et al.* 2002;

Yezza *et al.*, 2005). Es por esta razón que la tasa de aireación fue fijada en 250 rpm para evitar limitaciones en el crecimiento debidas a este factor, y asimismo, evitar la acumulación de calor que pudiera inhibir o reducir la calidad tóxica de los cristales. Avignone-Rossa *et al.* (1992), estudian la limitación de O<sub>2</sub> y concluyen que el suministro de éste debe hacerse de forma continua para no afectar la concentración final de la  $\delta$ -endotoxina. Esta demanda disminuye durante la esporogénesis, en la etapa de lisis del esporangio y en la liberación del cristal (Fernández y Larrea, 2002).

Arcas (1996) menciona que el crecimiento de *Bt* tiene lugar en un amplio intervalo de temperaturas que van desde 15 - 20 °C hasta 42 - 45 °C, indicando que el óptimo para la producción de la  $\delta$ -endotoxina está comprendido entre 28- 32 °C. Por esta razón, la temperatura a la que se llevaron a cabo los cultivos fue de 30 °C, como lo proponen Porcar y Juárez (2004), quienes afirman que el cultivo debe mantenerse a esta temperatura hasta que el porcentaje de lisis alcance el 90 - 100 %, alrededor de las 72 horas.

En la producción de insecticidas basados en *Bt*, la evaluación en la producción de cristales tóxicos se ha llevado a cabo, tradicionalmente, a través del conteo de esporas resistentes al calor, bajo la suposición de que con la formación de este tipo celular también se forma el cristal parasporal. Es por ello, que el crecimiento de *Bti* fue evaluado en la producción de esporas al aplicar el tratamiento de choque térmico. En la figura 9 se observa que al aplicar choque térmico se obtuvo un título igual a  $3,3 \times 10^8$  esporas/mL, en la evaluación a las 96 horas. En este tratamiento se observó que el conteo de esporas durante las primeras horas, fue menor que el conteo de células vegetativas. Este resultado es lógico ya que en las primeras horas de incubación el cultivo está en fase logarítmica de crecimiento. Luego, al transcurrir las 24 horas, hubo un incremento de esporas notable que permaneció en aumento sostenido incluso a las 96 horas después de inocular (figura 9). Todo este comportamiento en el

crecimiento se debe a que el medio A80 es, como se dijo, un medio definido rico en nutrientes. Los elementos  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  son componentes necesarios para la producción de la  $\delta$ -endotoxina (Carrera, 2009). Nickerson y Bulla (1974) también enfatizan la importancia de estos requerimientos minerales para el crecimiento y la esporulación. Del mismo modo, Arcas (1984) también recomienda la adición de estos micronutrientes ya que influyen en la producción del cristal.

Por su parte, Goldberg y colaboradores (1980) utilizaron un medio de cultivo con diferentes tipos de sales ( $KCl$ ,  $(NH_4)SO_4$ ,  $HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CuCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$  y  $MnSO_4$ ) con el que obtuvieron un alto rendimiento en la esporulación y por tanto la presencia de cristales tóxicos. Adicionalmente, mencionaron la importancia de fuentes de nitrógeno tales como extracto de levadura, pues su omisión retarda la esporulación y reduce la formación de cristales, y en consecuencia la toxicidad del complejo espora-cristal.

La utilización de subproductos agroindustriales en la formulación de medios de cultivo para el crecimiento de un microorganismo específico, en este caso *Bti*, tiene el objetivo de disminuir los altos costos asociados a su producción en medios sintéticos, permitiendo realizar escalamientos a nivel industrial. Para ello, debe tenerse en cuenta que los constituyentes puedan suplir los principales requerimientos de la bacteria de interés, para que así pueda crecer y desarrollarse con éxito. En este trabajo se usaron como subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad en el país: la melaza, el Concentrín 21® y la vinaza.

En el crecimiento de *Bti* es necesaria una fuente de carbono y energía para los procesos anabólicos (Mignone y Avignone, 1996). En este trabajo ese requerimiento nutricional fue proporcionado por la melaza (tabla 1). La fuente de sales, necesaria para garantizar la calidad



tóxica del cristal (Arcas, 1984), se probó utilizando la vinaza, que de acuerdo a la tabla 3, estaba compuesta por algunas sales que podrían contribuir de forma positiva al crecimiento y formación del cristal de *Bti*. Y por último, la fuente de nitrógeno, ya sea de origen orgánico y/o inorgánico para el crecimiento, esporulación de la bacteria y síntesis de endotoxinas (Sachidanandham *et al.*, 1997), a través de la utilización de Concentrín 21® (tabla 2). Así, con la suplementación con estas fuentes como constituyentes del medio, se esperaba asegurar el crecimiento de la bacteria con una posterior formación del cristal, tal cual como ocurre con el medio definido A80, usado como control (Arcas, 1984).

De acuerdo a lo antes mencionado, se planteó un primer medio a partir de las concentraciones de subproductos agroindustriales (S1) mostradas en la tabla 5. Todo esto partiendo de la aproximación de los medios de cultivo planteados por Peñalver (2005) para el crecimiento de *Btk*. Como primer paso, se realizó la cinética de crecimiento en este medio, cuyo comportamiento se encuentra representado en la tabla 11. En dicha tabla puede observarse un máximo de 3 UFC sin aplicar choque térmico, en la fase exponencial, que corresponde a las primeras horas de evaluación. Al comparar con el medio control A80, se puede resaltar una notable diferencia en el crecimiento en esas primeras evaluaciones; los valores de UFC fueron mucho menores a lo esperado, a pesar de que se suministraron los requerimientos necesarios, y de que los nutrientes, en esta fase, eran abundantes. Luego de 72 horas, la concentración de esporas fue coincidente con el valor obtenido en el inóculo inicial sin aplicar choque térmico, lo que da cuenta de que no hubo crecimiento de *Bti* en S1. Asimismo, al aplicar choque térmico al inicio del cultivo se observó un máximo de 2 esporas, que luego de las 72 horas debió aumentar, pero por el contrario disminuyó a 1 UFC. Este último resultado se corresponde con el obtenido sin aplicar calor al cultivo en el medio S1.

Con base en estos resultados, había la posibilidad de que alguno de estos constituyentes del medio formulado, afectara el crecimiento de *Bti*, por lo que se planteó utilizar una segunda formulación, el medio S2, en el cual se disminuía la concentración de vinaza, para descartar exceso de sales. Del mismo modo, se aumentó la concentración de Concentrín 21® para suministrar mayor cantidad de nitrógeno y descartar limitación por este elemento, Asimismo, también se aumentó la concentración de melaza como fuente de carbono y de energía. Con este medio S2 los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con el medio S1, es decir, un bajo porcentaje de células para todos los tiempos evaluados, por lo que se presumió que la concentración de los constituyentes suministrada por los subproductos no era la adecuada.

En este sentido, se pudo comprobar que, sin duda, alguno de los constituyentes presentes en el medio S1 y S2, afectó de manera negativa el crecimiento de *Bti*. Sin embargo, es necesario destacar que utilizando *Btk*, Peñalver (2005) obtuvo títulos bacterianos por el orden de  $10^8$  esporas/mL utilizando los mismos subproductos agroindustriales evaluados en este trabajo (vinaza, melaza y Concentrín 21®). Por este motivo, se planteó formular unos medios que pudieran apuntar cuál de los subproductos usado no permitía el crecimiento de *Bti*. Para ello, se constituyeron medios que estaban suplementados por todos o algunos de los subproductos evaluados (Concentrín 21®, melaza y las sales del medio A80), tal como lo hicieron Brazón (1998) y Peñalver (2005). Por otro lado, también se suplementaron medios con diferentes concentraciones de vinaza, debido a que las primeras aproximaciones con este subproducto fueron realizadas por Peñalver (2005), sin que este suplemento haya sido evaluado a profundidad como contribuyente de sales en las formulaciones planteadas.

El medio MC1 estaba compuesto por Concentrín 21® y sales. En este medio se suministraba a la bacteria una fuente de nitrógeno y carbono proveniente del Concentrín 21®,

y la fuente de sales del medio A80. Los resultados obtenidos se representan en la figura 10, donde se puede observar un comportamiento sigmoideal en la curva de crecimiento. Durante las primeras horas de evaluación, tras la inoculación, se observó un aumento exponencial en los títulos bacterianos. Este incremento se mantiene hasta las 48 horas, y la diferencia entre la población inicial y la final es de 380 veces. A partir de este punto, se observó la fase de latencia en el crecimiento y la concentración de células se mantiene en el mismo orden hasta alcanzar las 96 horas ( $4 \times 10^8$  cél/mL), tiempo al cual se detuvo la evaluación. Las etapas de la curva de crecimiento mencionadas corresponden a la evaluación sin choque térmico, pero este comportamiento también se observó al aplicar este tratamiento ( $5 \times 10^6$  esp/mL, en el tiempo cero y  $4,5 \times 10^8$  esp/mL, a las 96 horas). Peñalver (2005) obtuvo un título bacteriano igual a  $4 \times 10^8$  esp/mL en el medio 4 compuesto por Concentrín 21® y sales definidas, lo cual coincide con los valores obtenidos en este trabajo.

Lo anterior demuestra que MC1 puede utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de *Bti*. Es necesario destacar que el Concentrín 21®, añadido a este medio, no sólo actúa como fuente de nitrógeno sino también como fuente de carbono y energía (Tabla 2), porque en su composición hay presencia de carbohidratos, y este exceso lo pudieran aprovechar las células para aumentar su crecimiento. En el medio A80, como se ha dicho, la fuente de N es proporcionada por el extracto de levadura, que según Avignone- Rossa *et al.* (1992) este extracto no es suficiente para la óptima producción de la  $\delta$ -endotoxina. Sin embargo, la producción del cristal parasporal depende también de las sales, que en ambos casos están presentes de manera definida en los medios MC1 y A80. El valor de velocidad máxima de crecimiento en MC1 fue igual a  $0,7044 \text{ h}^{-1}$  con un tiempo generacional igual a 1 h, sin choque térmico (Tabla 12). Estos valores son mayores, aunque en el mismo orden de magnitud, a los obtenidos en el medio de referencia A80, y a los reportados por otros autores,

donde se evaluó la  $\mu_{\text{máx}}$ , arrojando valores por el orden de  $0,18 \text{ h}^{-1}$  (Ríos y Buitrago, 1999; Berdugo y Zamora, 1995; Pearson y Ward, 1983).

Al evaluar un segundo medio de cultivo para el crecimiento de *Bti*, medio MC2, compuesto por Concentrín 21® y melaza, se observó un crecimiento más lento en la fase exponencial, respecto a los medios anteriores. Este comportamiento se extendió hasta las 48 horas de su inoculación. Luego a las 96 horas, los títulos alcanzaron valores iguales a  $3,1 \times 10^8$  células/mL sin aplicar choque térmico, y un título igual a  $3,5 \times 10^8$  esp/mL aplicando choque térmico. Este comportamiento fue similar al observado en la curva de crecimiento en el medio A80 (Figura 11). En cuanto a los parámetros cinéticos, los mismos expresaron una velocidad máxima igual a  $0,2013 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo generacional igual a 3,4 h, es decir, tres veces mayores a los obtenidos en los medios MC1 y A80. Por lo tanto, en este medio MC2, la tasa de duplicación de la población bacteriana fue mucho más lenta, por lo que requirió de mayor tiempo para alcanzar los títulos obtenidos. Posiblemente, esta diferencia entre MC2 con respecto a MC1 y A80, se debió a que en MC2 no se suministró una fuente de sales y por esta razón haya disminuido la tasa metabólica de la bacteria, y por consiguiente, también haya disminuido la tasa de crecimiento. Como se mencionó anteriormente, las sales son un requerimiento importante para el crecimiento y sobretodo la formación del cristal (Escobar *et al.*, 2004).

Por otro lado, el medio MC3 estaba compuesto únicamente por Concentrín 21®, por lo que había suministro de nitrógeno y de carbono de acuerdo a su composición. Esto arrojó como resultado un crecimiento más rápido al observado en MC2 (Figura 12), pero más lentos que MC1 y A80. A las 72 horas, el título fue 190 veces mayor que el obtenido a las 24 horas ( $5,5 \times 10^7$  células/mL), sin aplicar choque térmico. Lo mismo ocurre cuando es sometido a choque térmico, obteniendo un valor a las 96 horas, igual a  $3,1 \times 10^8$  esp/mL (Figura 12), un poco menor al obtenido en MC1, MC2 y A80, pero en el mismo orden de magnitud. Peñalver

(2005) obtuvo un título igual a  $3,1 \times 10^8$  esp/mL utilizando el medio 5, compuesto únicamente por Concentrín 21®, siendo igual al título obtenido en el medio MC3, en este trabajo. Quizas este resultado sea debido a las razones antes expuestas; el medio sólo está constituido por Concentrín 21® y al agotarse los carbohidratos que provee, este suplemento se convirtió en recurso limitante, que contribuyó en la disminución de la proliferación de *Bti*. En cuanto a los parámetros cinéticos, en el medio MC3, se obtuvieron valores de  $\mu_{\text{máx}}$  y Tg similares a los obtenidos en el medio MC2.

En cuanto al medio MC4, el cual estaba compuesto por Concentrín 21®, melaza y sales, se obtuvo como resultado (Figura 13) un mayor número de células en la fase exponencial respecto a los medios MC2 y MC3. A las 72 horas de inoculación, se obtuvo un título igual a  $3,8 \times 10^8$  células/mL sin choque térmico y con choque térmico fue un título igual a  $2,9 \times 10^8$  esporas/mL. Al comparar estos títulos, podemos observar que están cercanos al título obtenido en el medio A80, por lo que podría estimarse que es un buen medio de cultivo para *Bti*, ya que suministra los componentes y cantidades necesarias para su crecimiento y formación del cristal paraesporal. Se destaca un crecimiento óptimo por la presencia de fuente de carbono suministrada por la melaza; fuente de nitrógeno, suministrada por Concentrín 21® y fuente de sales, que garanticen la formación del cristal tóxico, proporcionadas por las sales definidas del medio A80.

Luego de evaluar los subproductos: melaza y Concentrín 21® y corroborar que ambos subproductos no afectan de forma negativa el crecimiento de *Bti*, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de vinaza, con el objetivo de identificar la concentración adecuada de este subproducto que garantizara un buen crecimiento bacteriano. En la tabla 16, se observa que aquellos cultivos con menor concentración de vinaza presentaron poco crecimiento esporulativo, incluso, luego de 72 horas de inoculado. En su mayoría, los valores

obtenidos a las 72 horas de evaluación, se encontraban por debajo o en el mismo orden de magnitud a los obtenidos en las primeras evaluaciones, y aunque la diferencia no es tan marcada, esto permite afianzar la hipótesis de que la vinaza podría estar inhibiendo el crecimiento de la bacteria. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos al inicio con los medios S1 y S2. En este caso, se esperaba una o varias concentraciones que pudieran comportarse como el medio de referencia A80. Todo esto a pesar de que se le suministró una fuente de sales a través de la vinaza, y la fuente de nitrógeno y carbono utilizando el Concentrín 21®.

Seguidamente se decidió evaluar el efecto del pH en los medio de cultivo con diferentes concentraciones de vinaza, donde se crecía *Bti* para descartar este factor como el causante de la inhibición. Al medir el pH en la batería de medios se obtuvieron valores ácidos, alrededor de 4 y 5, que se encontraban fuera del rango óptimo para el buen crecimiento de la bacteria y formación del cristal paraesporal, según Gutiérrez (1993). Buitrago (2004) menciona en su investigación que el pH inicial del medio debe encontrarse entre 6.8 y 7.2. Además, Holmberg *et al.* (1980) encontraron que no se presentan variaciones significativas en la concentración final de endotoxina con valores de pH entre 6.5 y 8. Por esta razón, se decidió ajustar el pH de todos los medios a un valor igual a 7 para que estuviesen dentro del rango adecuado y garantizar el crecimiento de *Bti*. A medida que aumentaba la concentración de vinaza en el medio, al momento de medir el pH, se observaba un aumento de la basicidad del medio, esto probablemente asociado a la presencia de iones  $K^+$  en forma de  $K_2O$  que aumentaba proporcionalmente con el volumen de la vinaza y por consiguiente basificaba un poco más el medio (Leal *et al.*, 2003). Hay que tener en cuenta que un pH cercano a 5 puede afectar la esporulación y la formación de los cristales de *Bacillus thuringiensis*, pudiendo llegar incluso a inhibir el proceso de desarrollo de esta bacteria (Abarca *et al.*, 1992). Silkdar y Majumdar

(1991) reportan que han observado baja producción de toxina si el pH del medio no se controla cerca de la neutralidad.

Al plantear una segunda batería de medios con diferentes concentraciones de vinaza, pero en este caso ajustando el pH a 7 con NaOH (Tabla 17), dio como resultado un crecimiento inversamente proporcional a la concentración de vinaza, a las 72 horas. A medida que aumentaba la concentración de la vinaza disminuía la aparición de UFC. Es necesario destacar que la vinaza presenta una composición que le permite actuar como buffer por lo que era cada vez más necesario agregar mayor cantidad de NaOH a medida que aumentaba la cantidad de vinaza. La mayoría de los títulos bacterianos obtenidos al comienzo de la evaluación, son mayores o se encuentran en el mismo orden de magnitud a los obtenidos a las 72 horas para todas las concentraciones de vinaza evaluadas, tanto sin ajustar pH como ajustando el valor de pH, demostrando que incluso al ajustarse el pH a 7, no se observó mejoría en el crecimiento sino más bien desfavoreció aun más los resultados. Esto pudiera haber afectando de manera negativa el metabolismo celular, traducido en el retardo en el crecimiento. Por el contrario, al observar el comportamiento de los medios MC1, MC2 y MC3 con un rango de pH inicial entre 4 y 5, se observó que al ajustar el valor de pH a 7, estos se vieron favorecidos mostrando buenos títulos bacterianos, contrarios a los obtenidos en los cultivos que contenían vinaza. Usualmente, ocurre una disminución de pH que se debe a la utilización de los carbohidratos proporcionados por el Concentrín 21® antes de que se alcance la fase de esporulación. Posteriormente, durante la esporulación, el pH comienza a elevarse producto de la utilización de los aminoácidos. Al final del proceso se debería alcanzar un valor aproximado de pH igual a 8, siendo un buen indicador del proceso (Orietta, 2002). Si los valores de pH siguen basificándose se estaría corriendo el riesgo de degradación del cristal parasporal, el cual se

disuelve en el intestino de la larva sensible a pH entre 10 y 12; razón por la cual este factor debe ser controlado durante el proceso.

La disminución del pH en los cultivos puede deberse a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la disminución del pH que producen (Carrera, 2009). Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos (Carrera, 2009). Por lo anterior, es posible que *Bti*, durante su crecimiento en un medio que contenía vinaza dentro de su composición, haya producido la liberación de ácidos orgánicos que, como se mencionó anteriormente, generó un cierto porcentaje de toxicidad, que sumado a la acidez del medio por la presencia de vinaza, disminuyó el crecimiento de *Bti* y por consiguiente, la formación del cristal paraesporal.

El bajo crecimiento bacteriano observado en los cultivos con vinaza, llevó a descartar el pH como el factor responsable de afectar de forma negativa el crecimiento y, a plantear que, todo esto pudiese estar asociado a la cantidad de alcohol que pudiera estar presente en la vinaza, debido a que al abrir el envase para preparar los medios podía percibirse un fuerte olor a alcohol. Por consiguiente, se probó el crecimiento de *Bti* utilizando una vinaza que fue hervida durante 30 minutos, para eliminar de esta manera el alcohol que esta pudiese haber tenido. Los resultados de este experimento, mostrados en la tabla 18, no reflejaron el comportamiento esperado, es decir, los resultados se asemejaron a los obtenidos cuando se utilizó la vinaza sin hervir, sin variar y variando pH. Sin embargo, se probó también la vinaza hervida pero esta vez, ajustando el pH a 7 para todos los medios de cultivo, pero como se observa en la tabla 19 tampoco se observó un buen crecimiento.



Después de probar todas las posibles variables que pudieran afectar el crecimiento de *Bti* con la vinaza que se encontraba en el laboratorio y no obtener lo esperado, se solicitó nuevamente vinaza en la Hacienda Ron Santa Teresa C.A. con la finalidad de comparar los resultados con la vinaza vieja que estaba en el laboratorio y así poder evaluar la utilización de este subproducto, como componente de un medio de cultivo para el crecimiento de *Bti*. Para ello se probó utilizando la misma metodología y las mismas concentraciones de vinaza; por un lado sin variar pH y por otro lado ajustando el pH a 7. Se obtuvo como resultado, poco crecimiento bacteriano tanto de células vegetativas como de esporas, en ambos casos.

La evaluación de todas las posibles variables: tipo de vinaza, temperatura de incubación, pH y concentración de alcohol, que pudiesen haber afectado el crecimiento eficiente de *Bti* llevó a suponer que la vinaza no suministraba las sales en las concentraciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de las esporas, y por ende los cristales, de *Bti*. La manera de comprobarlo fue realizando un análisis de composición de la vinaza vieja y la vinaza nueva (tabla 22).

Con el propósito de conocer y diferenciar las constituciones que varían entre las vinazas y las que están en común que pudieran afectar el crecimiento de *Bti*, se enviaron muestras de vinaza vieja y vinaza nueva al LCG para su análisis. Estos resultados se encuentran reflejados en la tabla 24, donde se pudo observar que el medio S1 no está limitado ni por nitrógeno ni por cloruro, sino más bien se encontró limitado por fosfatos y sulfatos, en comparación a lo aportado en el medio A80. Es de resaltar que estos compuestos son los principales responsables de la formación del cristal y de la esporulación (Buitrago, 2004) por lo que se explicaría el crecimiento bacteriano insuficiente en los medios constituidos con vinaza. En cuanto a los cationes, estos se encontraron por encima de lo aportado por el medio A80, exceptuando el manganeso que se encuentra en menor proporción. La presencia del ión

manganeso es de importancia fundamental para la esporulación de *Bt* (Benitende y Márquez, 1996). En este sentido, se determinó que la vinaza no proporciona las sales necesarias para su utilización como sustituyente de sales del medio A80. Por este motivo, no se recomienda su uso como constituyente en un medio formulado a partir de subproductos agroindustriales, ya que no promueve el crecimiento de *Bti* y mucho menos garantizar la formación del cristal paraesporal. García y Rojas (2006) indican que para suplir las necesidades de los cultivos se deben aplicar cantidades elevadas de los nutrientes, contrario a lo ocurrido con la vinaza en este trabajo.

Se debe enfatizar que en el análisis de la vinaza también se obtuvo un exceso en la concentración de iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Cl}^{-}$ . El calcio en concentraciones apropiadas es necesario para la formación de esporas resistentes al calor, mientras que el potasio está relacionado el RNAm y por ende con la velocidad de crecimiento en la fase exponencial, y el cloro interviene en el mantenimiento del potencial osmótico de la célula. Sin embargo, en la bibliografía no existen reportes del efecto que pueda generar la presencia en exceso de estos iones en un medio de cultivo para el crecimiento de una bacteria. Según Foda *et al.* (1985), la concentración de  $\text{K}^{+}$  adecuada para garantizar el crecimiento de *Bt* es de 0,2 M. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo una concentración de 7 M de  $\text{K}^{+}$  a partir del análisis realizado del medio S1, compuesto por vinaza. Esto demuestra una clara diferencia de concentraciones en comparación con el A80 y lo reportado como ideal para el crecimiento de *Bt*. Posiblemente este exceso de iones sea el responsable de la inhibición del crecimiento de esta bacteria. Un ensayo que pudiera demostrar esta hipótesis, es la realización del medio S1 agregando las sales fosfatos y sulfatos que equiparen a las del medio A80, para verificar si el crecimiento de la bacteria es inhibido por la falta de estas sales o por el exceso de los iones  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Cl}^{-}$ . Si el crecimiento se mantiene igual al obtenido en este trabajo, entonces se puede afirmar que

efectivamente, el exceso de iones esta inhibiendo el crecimiento bacteriano por lo que será necesario someter la vinaza a una columna de intercambio iónico que permita remover el exceso de iones y de tal forma alcanzar una concentración de iones adecuada que estimule el buen crecimiento bacteriano.

En el trabajo realizado por Peñalver (2005) se utilizó la vinaza como fuente de sales para el crecimiento de *Btk* y según sus resultados funcionó de forma exitosa. Por esta razón, se pensó que utilizando vinaza como fuente de sales en la formulación de medios a partir de subproductos agroindustriales, pudiese haber dado también buenos resultados en el crecimiento de *Bti*, pero en este caso no fue así. Arcas (1996) asegura que el comportamiento de diferentes cepas de *Bt* puede diferir sensiblemente. Un medio de cultivo para una variedad, puede carecer de utilidad alguna para otras. Posiblemente, este comportamiento diferencial entre las cepas *Btk* y *Bti* se deba al hecho de que para este trabajo se utilizó una vinaza diferente a la que Peñalver (2005) usó para su trabajo. Probablemente, esta discrepancia en los resultados se deba, según García y Rojas (2006), a la composición de la vinaza que a su vez depende de las características de la materia prima usada en la producción de alcohol. Además, la formación de la vinaza dependerá del sustrato empleado en la fermentación, del tipo y eficiencia de la fermentación y destilación, y de las variedades y maduración de la caña de azúcar, así como también de las condiciones climáticas, del suelo y de la época del año (Rodella *et al.*, 1981).

De acuerdo a lo anterior, los medios de cultivos que contenían la vinaza, para promover el crecimiento de *Bti*, no fueron evaluados en cuanto a la actividad entomopatogénica sobre larvas de *Ae. aegypti*. Por el contrario, los medios MC1, MC2, MC3 y MC4, que presentaron altos títulos esporulativos y por ende presentaron un equivalente de critales parasporales

(Ertola, 1985), fueron los escogidos para evaluar la capacidad insecticida de *Bti*, mediante bioensayos.

En los bioensayos, una forma general en la evaluación de cepas de *Bt* es el número de individuos muertos dentro del total de la población, expresado como porcentaje de mortalidad. En general la evaluación de *Bt* se inicia con pruebas preliminares para determinar la actividad de la muestra contra un determinado insecto blanco, empleando rangos altos de concentración (Martínez, 2004). Por esta razón, la única dilución planteada en este bioensayo fue al colocar el complejo espora-cristal por suspensiones en el recipiente de tratamiento en donde se pondría la larva de *Ae. aegypti*.

Según Martínez (2004), para una primera evaluación se puede emplear un número bajo de larvas (de 10 a 20 individuos) con el fin de economizar materiales y costos. Es por ello, que en este caso el bioensayo fue llevado a cabo con 25 larvas de *Ae. aegypti* en el tercer instar. Martínez (2004) también indica que pueden utilizarse un número bajo de larvas, siempre y cuando se tengan repeticiones. En este caso, los bioensayos realizados tuvieron tres réplicas que permitieron verificar la capacidad tóxica de *Bti* cultivada en los medios seleccionados (MC1 al MC4).

Los resultados de los bioensayos expresados en la tabla 26 demostraron que los medios formulados a partir de los subproductos agroindustriales, melaza y Concentrín 21®, pueden ser una opción al momento de hacer ensayos de escaliento del proceso en la producción de *Bti*, esta afirmación esta respaldada debido a los buenos títulos bacterianos observados y, además, por los resultados del bioensayo, que indicaron que ocurrió la formación de esporas y también la síntesis del cristal; responsable de la toxicidad contra larvas de *Ae. aegypti*.

En el caso de los medios MC1, MC2, MC3 y MC4, se observó una mortalidad del 100 % de las larvas, que al hacer el ajuste con la ecuación de Abott, la mortalidad quedó expresada en un 99 %. Este resultado se obtuvo en todas las réplicas. No fue necesario realizar el análisis PROBIT, debido a que esta prueba estadística sirve para comparar la mortalidad arrojada entre tratamientos, y tal como se muestra en los resultados, el porcentaje de mortalidad para todos los tratamientos fue igual. Al comparar la mortalidad obtenida en el control positivo (*Bti* crecida en A80) se observó que todos los medios probados alcanzaron el mismo porcentaje de muerte. En el control negativo con Tween 80, ocurrió la muerte de dos larvas en la primera réplica, en el resto de las réplicas, no ocurrió muerte alguna, por lo que esto probablemente este asociado a mala manipulación durante la realización del bioensayo o por la salud propia de las larvas de *Ae. aegypti*, más que al surfactante usado. Dulmage (1983) mencionó que la mortalidad en los controles debe ser menor al 10 % para que los resultados de los tratamientos sean significativos. Cuando se desea evaluar la mortalidad con *Bti*, los tiempos de lectura son de 24- 48 h para dípteros (Martínez, 2004). En este sentido, al transcurrir las 24 horas se pudo observar la actividad tóxica de *Bti* sobre las larvas de *Ae. aegypti*.

Para corroborar que la muerte de las larvas de *Ae. aegypti* se produjo por el consumo del complejo espora-cristal, se hizo la desinfección de 7 larvas con solución clorada. Luego, se llevó a cabo la maceración de las mismas, con el objetivo de aislar UFC de *Bti* del interior de las larvas muertas, que permitieran asegurar que la mortalidad fue producto del consumo del complejo espora-cristal. Para ello, el homogenato obtenido fue sembrado en placas diferenciales de penicilina (tabla 27), donde luego de la incubación se observó el crecimiento de *Bti*. Se confirmó de esta manera, que las colonias de *Bti* aisladas de los macerados, provenían de la proliferación de esporas de *Bti* germinando en el hemocele de las larvas muertas. Por lo tanto, dichas larvas habían consumido el complejo espora-cristal que a su vez

había sido obtenido al cultivar la bacteria en los medios MC1, MC2, MC3, MC4 y en el medio control A80, permitiendo verificar la capacidad entomopatogénica de *Bti* al crecer en un medio que le permita la síntesis del cristal. En el caso de los controles negativos, no se observó ningún crecimiento de *Bti*.

Al comparar estos resultados de los bioensayos con los obtenidos por Peñalver en el 2005, es destacable una diferencia entre los resultados de la mortalidad calculada a partir de los bioensayos, utilizando *Bti* frente a larvas de *Ae. aegypti* versus la utilización de *Btk* frente a larvas de *Spodoptera frugiperda*. En el caso de Peñalver, quien utilizó *Btk*, los porcentajes de mortalidad se encontraban alrededor de 84 % en aquellos medios suplementados con sales y Concentrín 21® (medio 4). Este resultado es similar al encontrado en este trabajo, donde las mortalidades de *Ae. aegypti* fueron también altas (99 %), en este mismo medio de cultivo (MC1). Sin embargo, para el medio 5 de Peñalver (2005), que contenía sólo Concentrín 21®, no se observó mortalidad en las larvas de *S. frugiperda* a pesar de que este subproducto suministra fuente de carbono, nitrógeno y sales, que pueden contribuir a la formación de algunos cristales. Con este mismo medio (MC3), según los resultados obtenidos en este trabajo, la mortalidad alcanzó valores del 99 %. Esta variabilidad de resultados puede estar asociada principalmente a que la bacteria de estudio no fue la misma, por lo que su metabolismo pudiera ser diferente en cuanto a la asimilación del Concentrín 21® como fuente de nitrógeno y fuente de carbono, que como se ha mencionado anteriormente, son importantes no sólo para el crecimiento sino también para la formación de los cristales. Algunos autores han probado colecciones de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* contra larvas de *S. frugiperda* señalando que no todas las cepas evaluadas presentan capacidad bioinsecticida frente a este Lepidóptero (Polanczyk *et al.*, 2000; Arango *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2007).

Otra variable a influir, es el tipo de insecto utilizado en los bioensayos, ya que en el trabajo de Peñalver (2005) se utilizaron larvas de lepidóptero, que se desarrollan en medio terrestre, y en este caso se trabajó con larvas de dípteros que son exclusivamente acuáticas. Por lo que incluso, la metodología de ambos bioensayos requieren de estrategias diferentes para su ejecución a pesar de tener el mismo objetivo, que es demostrar la capacidad insecticida de *Bt*. En el área de control de lepidópteros se ha discutido además, la susceptibilidad de las toxinas de *Bt* a la acción de factores ambientales como la radiación ultravioleta (UV) (Putzai *et al.*, 1991) y la temperatura (Cokmus y Elçin, 1995) que pueden inactivarlas o disminuir su actividad entomopatogénica.

En conclusión, es importante resaltar que la vinaza no suministró la concentración de sales adecuadas para garantizar un buen crecimiento bacteriano, por lo que se deberá continuar en la búsqueda de subproductos que proporcionen las sales, en futuras investigaciones. No obstante, los subproductos agroindustriales melaza y Concentrín 21®, fueron una excelente opción como componentes en la formulación de medios de cultivo de bajo costo y alta disponibilidad, porque tal como se evidenció en este trabajo, se obtienen buenos títulos de ambos tipos celulares (células vegetativas y esporas), que se traducen en la presencia de cristales paraesporales de *Bti*. La calidad tóxica de los cristales, fue demostrada a través de los bioensayos, donde se obtuvo una mortalidad del 99 % para todos los tratamientos evaluados con dichos subproductos, por lo que se comprobó que el aporte de estos, era el adecuado para garantizar la formación del cristal. Y además, permitió reafirmar que *Bti* presenta actividad entomopatogénica frente a larvas de *Aedes aegypti*.

## CONCLUSIONES

- ❖ El medio de referencia A80 es un medio que presenta los constituyentes necesarios para garantizar el crecimiento y esporulación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y adicionalmente promover la formación del cristal paraesporal.
- ❖ La formulación de los medios de cultivo MC1, MC2, MC3 y MC4, a partir de subproductos agroindustriales (la melaza y el Concentrín 21®), funcionan de manera eficiente en el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, pudiéndose obtener títulos por encima de 10<sup>8</sup> cél/mL.
- ❖ La vinaza no puede ser utilizada en la formulación de medios de cultivo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, porque no presenta las sales suficientes para promover la esporulación y por ende la formación del cristal paraesporal.
- ❖ Los tiempos generacionales en los medios de cultivo suplementados con sales, MC1, MC4 y A80, son menores a los obtenidos en los medios sin sales, MC2 y MC3.
- ❖ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* presenta actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti*.
- ❖ La mortalidad reflejada en los medios planteados a partir de los subproductos agroindustriales, melaza y Concentrín 21® (MC1, MC2, MC3 y MC4) fue de 99 % igual al control A80.
- ❖ Las larvas de *Aedes aegypti* murieron por la acción insecticida del cristal y la posterior germinación de las esporas de *Bti*, crecida en los medios de cultivo MC1, MC2, MC3 y MC4.



## RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda seguir realizando pruebas con otros subproductos agroindustriales que actúen como fuente de sales que promuevan el crecimiento y formación del cristal paraesporal de *Bti*, y además disminuir los costos al momento de realizar escalamientos a nivel industrial.
- ❖ Realizar los cálculos de la  $CL_{50}$  para cada uno de los medios a partir de subproductos planteados en este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, C., Jiménez, A., Bermúdez, M., Ramírez, R. 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. *Aisawai*. Universidad: Ciencia y Tecnología. **2**: 51-56.
- Amicarelli, A., Toibero, J., Quintero, O., di Sciascio, F., Carelli, R. 2006. Estrategias de Control de Oxígeno Disuelto Aplicadas a la Fermentación Batch de *Bt*. <http://eventos.saber.ula.ve/eventos/getFile.py/access?contribId=117&sessionId=62&am;resId=0&materialId=paper&confId=47>. [Consultado 28 de abril de 2015].
- Ananda, P.; Sharma, R. y Malik, V. 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microb.*, **42**: 1- 43.
- Anderson, G. 2011. EVALUACIÓN DE APLICACIONES CON ALMIDÓN DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL MANEJO DE *Aedes aegypti*. Tesis de Maestría. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. <http://159.90.80.55/tesis/000151223.pdf>. [Consultado 28 de Abril de 2015].
- Arango, J., Romero, M., Orduz, S. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Appl. Microb.*, **92**(3): 466-474.
- Arcas, J. 1985. Producción de bioinsecticidas. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Arcas, J., Yantorno, O., Ertola, R. 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis*. *Cultures. Biotechnol. Lett.* **9**:105-110.

- Arcas, J. 1996. Producción de Bacterias Entomopatógenas. En: Microorganismos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. Robert Leucona. Buenos Aires, Argentina. Cap **18**: 207-222.
- Armas, R., Pérez, M., Águila, R., Díaz, Z., Rizo, A., González, Y., Ávila, I. 2008. Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Rev. Cubana. Med. Trop.* **60**: 74-77.
- Aronson, A. 1976. Ammonia assimilation and glutamate catabolism by *Bacillus thuringiensis*. Pág: 444 – 449. En: Schlesinger, D. "Microbiology-1976". American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Aronson, A. Beckman, W., Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**:1-24.
- Avignone-Rossa C., Arcas, J., Mignone C. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production. *World Journal of Microbiol. and Biotech.* **8**: 301-304.
- Becker, N., Margalit, J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes and blackflies. En: *Bacillus thuringiensis*: An environmental biopesticide. Ed. Wiley and Sons.
- Beltrán, L., Díaz, S., Verdugo, C., Zamora, A., Buitrago, G., Moreno, N. 2002. Culture Media Design for fermentation of *Bacillus thuringiensis*. <http://www.ibon.una1.edu.co/rr21.html>. [Consultado 14 de Abril 2016].
- Benintende, G., Marquez, A. 1996. Técnicas empleadas con bacterias entomopatógenas. En: Microorganismos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. Robert Leucona. Buenos Aires, Argentina. Cap 11. 151-157.
- Berdugo, C., Zamora, A. 1995. Estudio preliminar de diseño de un medio de cultivo para la síntesis de Delta-endotoxina. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de Colombia.

- Berliner, E. 1915. Ueber die schlafsucht der *Ephestia kuhniella* und *Bac. thuringiensis* n sp. *Z Angew Entomol* **2**: 21-56.
- Bernhard, K., Jarret, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D., Roberts, G., Pauli, S. y colaboradores. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 59-68.
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J. y colaboradores. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. **496**:504-507.
- Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M. y colaboradores. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microb.* (64)**12**: 4965-4972.
- Bravo, A. 2004. Capítulo II: Familia de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Pág: 49-68. En: Bravo, A., Cerón, J. (Eds). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia.
- Brazón, J. 1998. Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* con base en subproductos agroindustriales de bajo costo. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Buitrago, G. 2004. Capítulo X: La Producción de Ingredientes Activos con *Bacillus thuringiensis*. Pág: 233-273. En: Bravo, A., Cerón, J. (Eds). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia.
- Busvine, J. (Ed.). 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. En: A critical review of the techniques for testing insecticides. 2<sup>nd</sup> Edition.
- Carmona, A. 2002. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA CEPA DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICA A *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). *Biagro* **14**: 3-10.

- Carrera, M. 2009. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. Tesis Doctoral. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf>. [Consultado 28 de Abril de 2015].
- Cerón, J. 2004. Capítulo VII: Caracterización Bioquímica y Molecular. Pág: 177-196. En: Bravo, A., Cerón, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia.
- Chak, K., Chao, D., Tseng, M., Kao, S., Tuan, S., Feng, T. 1994. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microb.* v: 60. **7**: 2415-2420.
- Cokmus, C., Elcin, Y. 1995. Stability and controlled release properties of carboxymethylcellulose-encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Pesticide science*, **45**(4), 351-355.
- Crickmore, N., Bone, E., Williams, J., Ellar, D. 1995. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**: 249-286.
- Da Costa, J., Rossi, J., Marucci, S., Alves, E., Volpe, H., Ferraud, A., Lemos, M. y colaboradores. 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae). *Neotrop. Entomol.* **39**: 757-766.
- Delgado, N. 2005. Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. *Entomotropica*. **20**: 213-233.
- De Maagd, R., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends. Genet.* **17**: 193-199.

- Dulmage, H., Coening, O., Rehnborg, C., Hensen, G. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J. Invertebr. Pathol.* **18**: 245-249.
- Dulmage, T. 1981. Production of bacteria for biological control of insects. Pág: 5-129. En: Papavizas, G. (Ed). Biological control of crop production. Reltsville Symposia in Agricultural. Totowa N.J.
- Dulmage, T. 1983. "Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14". Proceedings of Consultation, UNDP/WHO specialprogramme for research and training in tropical diseases, 25-28 Oct. 1982. M. Vandekar and H. Dulmage, eds, Geneva, Switzerland, pp. 124.
- Elleuch, J., Tounsi, S., Ben, N., Noël, M., Chandre, F., Jaoua, S., Zribi, R. 2014. Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). *J. Invertebr. Pathol.* **124**:90-97.
- Errington, J. 1992. *Bacillus subtilis*: a paradigm for the spatial and temporal control of gene expression. Pág 28-44. En: Russo, V., Brody, S., Cove, D., Ottolenghi, S. (Eds) Development. The molecular genetic approach. Springer-Verlag. Heildelberg. Alemania.
- Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbio. Rev.* **57**: 1-33.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372899/pdf/microrev00024-0015.pdf>  
[Consulta: [Consulta: 23 de abril de 2015]
- Ertola, R. 1985. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, 47 y 115, 1900 La Plata Argentina.

- Escobar, M., Pardo, E., Buitrago, G., López, L. 2004. Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Colom. Biotec.* **6**: 45-53.
- Faust, E., Rusell, P., Jung, R. 1974. Parasitología Clínica. Reimpresión 1979. Editorial Salvat, S. A. Mallorca, España, p 888.
- Feitelson, J., Payne, J., Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *BioTechnol.* **10 (3)**:271-275.
- Feitelson, J. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In Advanced Engineered Pesticides. Pp 63-72. Edited Kim L. NY.
- Fernández, O., Larrea, V. 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) **64**: 110-115. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2052E/A2052E.PDF>. [Consultado 27 de Abril de 2015].
- Foda, M., Salama, H., Selim, M. (1985). Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microb. Biotec.*, **22**(1): 50-52.
- Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. Pág: 1-35. En: Cory, J., Bailey, M., Higgs, S. (Eds). *Bacillus thuringiensis*: an Environmental Biopesticide, Proceedings: International Conference on *Bacillus thuringiensis*.
- Frutos, E. 1996. Análisis de probit y de correspondencia: En: Microorganismos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. Robert Leucona. Buenos Aires, Argentina. Cap 16.
- Gajardo, R., Vitelli, J., Rodríguez-Lemoine, V., Dorta, B. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) en el nororiente de Venezuela. En: Hernández, J., Osborn, F., Conde, J. (Eds). Estudio multidisciplinario de la palometa peluda *Hylesia metabus*. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. Pp. 115-130.

- Gallegos, G. 1985. Producción y toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo para control de insectos plaga lepidópteros. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080074524.pdf>. [Consultado 28 de Abril de 2015].
- Galvis, F. 2013. Caracterización molecular de genes cry1, cry2, cry3 y cry4 en aislados de *Bacillus thuringiensis* y determinación de su actividad bioinsecticida en larvas de *Aedes aegypti*. *Interciencia* **38**: 128-131.
- García, A., 2014. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con miras al desarrollo de un bioinsecticida. [Tesis de Grado]. <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-16913.pdf>. [Consultado 13 de Abril de 2016]
- García, A., Rojas, C. 2006. Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos. Las Vinazas. [http://www.tecnicana.org/pdf/2006/tec\\_v10\\_no17\\_2006\\_p3-13.pdf](http://www.tecnicana.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p3-13.pdf). [Consultado 03 de Abril de 2016]
- Gazit, E., Shai, Y. 1993. Structural characterization, membrane interaction and specific assembly within phospholipid membranes of hydrophobic segments from *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* cytolytic toxin. *Biochemistry* **32**: 12363-12371.
- Goldberg, L., Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univertattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*. **37**: 355-358.
- Goldberg, I., Sneh, B., Battat, E., Klein, D. 1980. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis boisd*. *Biotech. Lett.* **10(2)**: 419-426.



- Gomes, R., Cardoso, A., Telles, P., Soares, E., Melatti, V., Botelho, L., Fiúza, V. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Elsevier.*, **41**(3): 291-295.
- Gordon, R. 1989. The genus *Bacillus*. Pág. 109-126. En: O'Leary, W. (ed.). *Practical Handbook of Microbiology*. Washington DC, E.U.A.
- Gringorten, J., Milne, R., Fast, P., Sohi, S., Frankenhuyzen, K. 1992. Supression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 47-52.
- Gupta, B., Dow, J., Hall, T., Harvey, W. 1985. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic K<sup>+</sup>-transporting ephitelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* *in vitro*. *J. Cell. Sci.* **74**:137-152.
- Gutiérrez, G. 1993. Selección y evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Heliothis zea* (Boddie) y *Spodoptera exigua* (Hübner). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/269/1/1020091320.PDF>. [Consultado 27 de Abril de 2015].
- Hancock, P., White, V., Callahan, A., Godfray, C., Hoffmann, A., Ritchie, S. 2016. Density-dependent population dynamics in *Aedes aegypti* slow the spread of wMel *Wolbachia*. *J. Appl. Ecol.* **1**: 1-9.
- Helgason, E., Okstad, O., Caugant, D., Johansen, H., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolsto, A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microb.* **66**, 2627-2630. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110590>. [Consulta: 22 de abril de 2015].
- Hofte, H., Whiteley, H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **53**: 242-255.

- Holmberg, A., Sievänen, R., Carlberg, G. 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 1707-1724.
- Hughes G., Koga R., Xue P., Fukatsu T., Rasgon J. 2011. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog* 7(5). e1002043. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002043>
- Ibargutxi, M., Estela, A., Ferre, J., Caballero, P. 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* Toxins for Control of the Cotton Pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microb.* **72**: 437-442.
- İçgen, Y., İçgen, B., Özcengiz, G. 2002. Regulation of cristal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res. Microbiol.* **153**: 605-609.
- Ishiwata, S. 1901. One a new type of severe flacherie (sotto disease) (original in Japanese). *Dainihon Sansi Kaiho* **114**: 1-5.
- Jensen, G., Hansen, B., Eilenberg, J., Mahillon, J., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microb.* **5**(8): 631-640.
- Juárez, V. 2004. Capítulo I: Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. Pág: 17-47. En: Bravo, A., Cerón, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia.
- Khedher, S., Jaoua, S., Zouari, N. 2013. Application of statistical experimental design for optimization of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. *Braz. J. Microbiol.* **44**: 927-933.
- Knowles, B., Ellar, D. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**: 509-518.
- Knowles, B. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advan. Insect. Physiol.* **24**: 275-308.

- Lacey, L. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. London.
- Lambert, B., Peferoen, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience*, **42**(2), 112-122.
- Leal, P., Braga, M., Sato, D., Carvalho, J., Marques, M., Meireles, M. 2003. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *J Agric Food Chem* **51**:2520-2525.
- Liu, Y., Sui, M., Ji, D., Wu, I., Chou, C., Chen, C. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **62**: 131-136.
- Lüthy, P., Studer, D. 1986. Control of Simuliid blackflies and mosquitoes with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *MIRCEN J. Appl. Microb. Biotec.* **2**: 91-99
- Maduell, P. 2007. Estudio de la ecología de *Bacillus thuringiensis* en la hoja. Barcelona, España. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3914/pms1de1.pdf?sequence=1>. [Consultado 27 de Abril de 2015].
- Maldonado, G. 1994. Desarrollo de un medio de cultivo a base de subproductos agroindustriales para la producción de  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo. León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020091489.PDF>.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2003. BROCK BIOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS (10ª ED). Pearson Education.
- Martin, P., Travers, R. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microb.* v: 55. **10**: 2437-2442.
- Martínez, J. 2004. Capítulo IX: Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. Pág: 207-232. En: Bravo, A., Cerón, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia.

- Martínez, M. 2005. Búsqueda y producción de microorganismos benéficos para la agricultura. México <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P668.65CDL791/anexos.pdf>. [Consultado 28 de Abril de 2015].
- Mercado, M., Ramírez, N., Quijano, P. 1998. Frutos de la investigación Corpoica Cinco Años. Editorial Estudio 3 Gráficas LTDA. Santa Fe de Bogotá, Colombia.
- Mignone, C., Avignone-Rossa, G. 1996. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microb. Biotech.* **46**: 78-84.
- Monnerat, R., Silva, S., Silva-Werneck, J. 2001. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa-Cenargen. 65p.
- Montero, G. 2009. Biología de *Aedes aegypti*. Blog FCA, UNR. [http://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna\\_insectos/79-Aedes\\_aegypti.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna_insectos/79-Aedes_aegypti.pdf). [Consultado 29 de Abril de 2015].
- Moreira L., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J., Lu G., Pyke A., y colaboradores. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **139**: 1268–1278.
- Moser, J., Ramírez, X., González, J., Herrera, M. 2002. Evaluación de la efectividad de *Bacillus sphaericus* contra larvas de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) en criaderos naturales del estado Sucre, Venezuela. *Bol. Ent. Venez.* **17**: 1-5. <http://www.entomotropica.org/index.php/entomotropica/article/view/55/55>. [Consultado 29 de Abril de 2015].
- Narvaéz, A. 2015. Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* nativas de suelos de la provincia de Pichincha para biocontrol del ácaro *Tetranychus urticae*. Tesis de Grado. Quito, Ecuador. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4208>. [Consultado 15 de Febrero de 2016].

- Nickerson, K., Bulla, Jr. L. 1974. "Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*". *Appl. Microbiol.* **28**: 124-128.
- Ochoa, G., Arrivillaga, J. 2009. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Bol. Mal. Salud. Amb.* 48: 121-126.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO/ Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. TRD/BCV/90.1., Geneva, pp. 1-58.
- Orietta. 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. **64**: 110-115.
- Ortigón, L., Carvajal, D. 2009. Efectividad de *Bacillus thuringiensis* como control biológico para larvas de *Aedes aegypti* en Florencia (Caquetá, Colombia). *Momentos de Ciencia.* **6**(2).
- Palacios, L. 1993. Aspectos de la Fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* a nivel de planta piloto. Tesis de Maestría. Monterrey, Nuevo León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020091315.PDF>. [Consultado 27 de Abril de 2015].
- Paredes, E., 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*. *Sciend.* **17**(1): 89-103.
- Pearson, D., Ward, O. 1983. Effect of culture condition on growth and sporulation of *B.t* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotech. Lett.* **10**: 451-456.
- Peñalver, C. 2005. PRODUCCIÓN DE LA BACTERIA ENTOMOPATÓGENA *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Periago, M., Guzmán, M. 2007. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Rev. Panam. Salud. Publica.* **21**: 187-191. <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v21n4/01.pdf>. [Consultado 29 de Abril de 2015].
- Polanczyk, R.; Pires, R.; Fiuza, L. 2000. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Microbiol.*, 31(3): 165-167.
- Porcar, M., Caballero, P. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J. Appl. Microbiol.* **89**(2):309-316.
- Porcar, M., Juárez, V. 2004. Capítulo VI: Aislamiento y Establecimiento de una Colección de *Bacillus thuringiensis*. Pág: 151-176. En: Bravo, A., Cerón, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia.
- Porter, A., Davidson, E., Liu, J. 1993. Mosquitocidal toxins of *Bacilli* and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* **57**:838-861.
- Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, L., Kaplan, H., Lessard, T., Carey, P. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* **273**: 43-7. <http://www.biochemj.org/bj/273/0043/2730043.pdf>. [Consultado 24 de abril de 2015].
- Ramarao, N., Sanchis, V. 2013. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus cereus*: A review. *Toxins*. **5**: 1119-1139.
- Ramírez, L., Ramírez, N., Fuentes, L., Jiménez, J., Hernández, J. 2010. Aislamiento y caracterización molecular y biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Tuta absoluta* (Meyrick: Lepidoptera: Gelechiidae), insecto plaga del Tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Rev. Asoc. Col. Cienc. (Col.)*, **22**: 73-96.
- Ramos, F., Carmona, A., Béres, M., Méndez, N. 2004. EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICOS A *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). *Bioagro* **16**: 183-188.

- Reyter, A. 1965. Etude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur*. **108**: 40-60.
- Ríos, R., Buitrago, G. 1999. Transferencia de oxígeno en la fermentación con *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, **2**(2), 43-50.
- Rodella, A., Parazzi, C., Cardoso, A. 1981. A composição da Vinhaca. *Brasil Açucareiro* **97**(1): 25-33.
- Rodríguez, J., Correa, M., Escalpés, M. 1993. Aplicación de técnicas de bioensayos a problemas de contaminación ambiental. En: *Memorias del VII Congreso Venezolano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; salud y ambiente, base del desarrollo sustentable* (p. 1).
- Sachidanandham, R., Jenny, K., Fiechter, A., Jayaraman. 1997. Stabilization and increased production of insecticide crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *gallerie*. *Appl. Microb. Biotech.* **47**: 12-17.
- Sansinenea, E. 2012. Chapter 1: Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. Pág: 3-18. En: Sansinenea, E. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer. Puebla, México.
- Sauka, D., Benitende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol.* **40**: 124-140.  
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412008000200013](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412008000200013). [Consulta: 22 de abril de 2015]
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. y colaboradores. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 775-806.
- Silkdar, D., Majumdar, M. 1991. Effect of minerals on the production of the  $\delta$ -endotóxina by *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnology Letters*. Vol. 13, **7**: 511-514.

- Silva-Werneck, J., Monnerat, R. 2001. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Brasília: embrapa-cenargen. 5p. (circular técnica, 10)
- Sneath, P. 1986. Spore forming gram-positive rods and cocci. Pág. 1104-1207. En: Butler, J. (ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- Soares-da-Silva, J., Pinheiro, V., Litaiff-Abreu, E., Polanczyk, R., Tadei, W. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **59**(1): 01-06.
- Soberón, M., Bravo, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. *Microbios*. Disponible: <http://biblioweb.mx/microbios/Cap12>
- Splittstoesser, C., McEwen, F. 1961. A bioassay technique for determining insecticidal activity of preparations containing *Bacillus thuringiensis berliner*. *J. Insect. Pathol.* 3(4), 391.
- Stratiger, P., Losick, R. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 297-341. <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.genet.30.1.297>. [Consultado 23 de abril de 2015].
- Sutherland, D., Khoo, B. 1987. The biopesticides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the control of mosquitoes. In Pierce, G. (Ed.) *Developments in Industrial Microbiology*. **28**: 55-61.
- Tanada, Y., Kaya, H. 1993. Bacterial infections: *Bacillaceae*. Cap. 4: 83- 146. En: *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. pp. 666.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. Novena Edición. Editorial Médica Panamericana.



- Valicente, F., De Souza, Tuelher, D., Santos, M., Lyon, F., Macedo, C. 2010. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. *Rev. Bras. Mil. Sor.* **9**:1-11.
- Vázquez, M., Rangel, J., Ibarra, J., Del Rincón, M. 2015. Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas Mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Interciencia.* **40**: 397.
- Vega, J., Delgado, K., Sibaja, M., Alvarado, P., Barrientos, S. 2008. Empleo de melaza de caña de azúcar para la obtención y caracterización de poliuretanos potencialmente biodegradables. I *Rev. Iberoam. Polim.* **9**: 408-421.
- Vidyarthi, A., Tyagi, R., Valero, J., Surampalli, R. 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water. Res.* **36**: 4850-4860.
- Whalon, M., Wingerd, B. 2003. *Bt*: mode action and use. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **54**(4): 200-211.
- Werren J., Baldo L., Clark M. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 741-751.
- West, A., Burges, H., White, R., Wyborn, C. 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 128-133.
- Yezza, A., Rajeshwar, A., Valéro, J., Surampalli, R. 2005. Influence of pH control agents on entomotoxicity potency of *Bacillus thuringiensis* using different raw materials. *World. J. Microb. Biot.* **21**: 1549-1558.
- Ye Y., Carrasco A., Frentiu F., Chenoweth S., Beebe N., van den Hurk A., Simmons, C., *et al.* 2015. *Wolbachia* Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **9**(6): 1-19.

- Zamola, B., Valles, P., Meli, G., Miccoli, P., Kajfez, F. 1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Riotechnol. Rioeng.* **23**:1079-1086.
- Zouari, N., Sik, S., Jaoua, S. 2002. Production of  $\delta$ -endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards Lepidoptera and dipteran in gruel and fish meal media. *Enzyme. Microb. Tech.* **31**: 411-418.
- Zug R., Koehncke A., Hammerstein P. 2012. Epidemiology in evolutionary time: the case of *Wolbachia* horizontal transmission between arthropod host species. *J. Evolution. Biol.* **25**: 2149–2160.

#### CONSULTAS EN LÍNEA:

- Organización Mundial de la Salud (OMS). Dengue. [En línea]. 2013. [Consultado 27 de Abril de 2015]. Disponible en: URL: <http://www.who.int/topics/dengue/en>
- <http://www.larazon.net/2015/07/10/25-000-venezolanos-afectados-por-el-dengue-y-chikungunya-en-lo-que-va-de-ano/>. [Consultado 08 de Febrero 2015].
- <http://www.meddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/fig5.png>
- [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/custodio/Bt\\_d-endotoxina.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/custodio/Bt_d-endotoxina.htm)
- <http://www.meddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/fig3.png>
- <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/images/09espo2.gif>
- <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.html>