



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Componente práctico del examen de grado de carácter complejo,  
presentado al H. Consejo Directivo como requisito previo a la  
obtención del título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TEMA:**

“Protocolo de reproducción de *Bacillus thuringiensis* en laboratorio”.

**AUTOR:**

Jaskin Santiago Rodríguez Valencia

**TUTORA:**

Ing. Agr. Rosa Guillen Mora Mg. IA.

Babahoyo – Los Ríos – Ecuador

2019

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de culminar esta meta propuesta. Y darme la fortaleza necesaria para la realización de este trabajo investigativo.

Dedicado a toda mi familia que siempre estuvo pendiente de mí, brindándome su apoyo para poder culminar mis estudios, a mi Madre **Mariana Valencia**, a pesar de no vivir conmigo, siempre dedico su tiempo para aconsejarme y cuidar de mí.

A mi padre **Oswaldo Rodríguez** que siempre se preocupó por mí, y me dio sus consejos para que avance en mis estudios, a mi hermano Kevin por su valiosa ayuda, a mis tías Narcisa y Carmen y mi tío Viche que siempre me cuidaban me daban ejemplos de humildad y superación.

A mis amigos y compañeros, a la Sra. Violeta Yáñez que me brindaron su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento se dirige a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a Dios, el que en todo momento está conmigo ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez al igual a mis padres Mariana Valencia y Oswaldo Rodríguez también a mi hermano, aunque con coraje y todo siempre me aconsejaba también a mis otras dos madres Narcisa y Carmen que me brindaban su apoyo. A mi tutora Ing. Rosita Guillen Mg. Ing agric. por dedicarme el tiempo y la entrega necesaria para formarme como profesional y en la culminación de mi trabajo.

Igualmente, a mis amigos de la universidad que siempre nos apoyábamos mutuamente, sin dejar atrás a Violeta Yáñez que, aunque no era una madre siempre estuvo pendiente de uno ayudándonos en lo que más podía.

# INDICE

I. INTRODUCCION .....	1
1.1 Descripción del problema .....	3
1.2 Pregunta de investigación .....	3
1.3 Objetivos .....	4
1.3.1 Objetivo general. ....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
II. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Control Biológico.....	5
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	5
2.3 Origen de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	6
2.4 Importancia de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
2.5 Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
2.6 Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
2.7 Aislamiento e identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	10
2.8 Protocolo de reproducción de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medios de cultivos líquidos. ....	11
2.8.1 Localización del estudio.....	11
2.8.2 Material biológico: cepa de <i>B. thuringiensis</i> .....	12
2.8.3 Reconocimiento de la bacteria .....	12
2.8.3 Inóculo inicial .....	12
2.8.4 Preparación de Medios .....	12
2.8.4.1 Medio de cultivo a base de Leche azucarada.....	12
2.8.4.2 Medio de cultivo a base del subproducto agroindustrial “lacto suero” .....	13
2.8.4.3 Medio de cultivo líquido a base de levadura activada .....	13
2.8.5 Incubación y condiciones de fermentación .....	13
2.8.6 Método de extracción y conteo bacteriano .....	13
2.9 Protocolo de reproducción de <i>Bacillus thuringiensis</i> en agar nutritivo. ....	14
2.9.1 Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	14
2.9.2 Identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	15
2.9.3 Prueba de fermentación de la glucosa.....	15
2.9.4 Prueba De Voges-Proskawer. ....	15
2.9.5 Prueba de la hidrólisis del almidón .....	15
2.9.6 Presencia del cristal paraesporal. ....	16

2.9.7 Fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	16
2.9.8 Cuantificación de esporas del bioformulado de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
III. MARCO METODOLÓGICO .....	18
3.1 Metodología de la investigación.....	18
3.2 Situaciones detectadas.....	19
3.3 Soluciones planteadas.....	20
IV. CONCLUSIONES.....	21
V. RECOMENDACIONES .....	22
VI. RESUMEN.....	23
VII. SUMMARY .....	24
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	25
IX. ANEXOS.....	30

## I. INTRODUCCION

El género de bacteria *Bacillus thuringiensis* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Corrales et al. 2016).

El manejo de *Bacillus thuringiensis* ha hecho surgir el interés por transformar a otros microorganismos para que estos sean capaces de producir las proteínas tóxicas en los ambientes que colonizan y facilitan así el control de plagas. Estos insecticidas constituyen los productos de segunda generación que son aquellos que contienen cepas que han sufrido algún tipo de manipulación genética con la finalidad de incrementar su espectro de actividad (Rosas-García 2014).

Los mecanismos de acción de *Bacillus* spp., incluyen competencia por espacio y nutrientes, antibiosis e inducción de resistencia, tienen comprobado efecto en la promoción de crecimiento de las plantas. La capacidad de *Bacillus* spp., de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas, las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico (Chaves 2007).

Los insecticidas químicos han demostrado ser tóxicos para el hombre y otros organismos, han creado resistencia en los vectores, y provocado trastornos ecológicos irreversibles por su efecto acumulativo debido a su lenta degradación y falta de especificidad. Gran parte de las plagas agrícolas y forestales son provocadas por insectos de los órdenes Lepidoptera y Coleópteras. Por estos motivos, esta bacteria está siendo utilizada como una alternativa ecológicamente sostenible a los insecticidas químicos para controlar plagas agrícolas, plagas forestales y vectores de enfermedades (Biodiversidad 2018).

*Bacillus thuringiensis* es la bacteria entomopatógena más ampliamente utilizada como bioinsecticida, sola o en combinación con pesticidas químicos su importancia radica en su toxicidad contra larvas de insectos plagas de los

órdenes Lepidoptera, Coleóptera, Díptera, Himenoptera, Homoptera, Ortóptera, y contra organismos como ácaros, platelmintos y nemátodos.

Por ello, el objetivo del presente trabajo es conocer cuáles son los protocolos más utilizados en la multiplicación de la bacteria, su eficacia y eficiencia en el control de las diversas plagas en los diferentes cultivos de importancia económica.

## **1.1 Descripción del problema.**

En el control de plagas y enfermedades es necesario tener una alternativa biológica y sustentable para satisfacer y cumplir certificaciones internacionales es importante conocer un proceso en el cual se deba seguir y practicar para reproducir estos tipos de organismos.

Es importante conocer un protocolo que enseñe a la proliferación de bacterias como *Bacillus*, ya que esta bacteria es capaz de poder controlar varios patógenos que afecta a los cultivos de una manera biológica sin afectar el ecosistema, es por eso que se ha planteado este tema para describir cada proceso a seguir para la multiplicación de este microorganismo.

## **1.2 Pregunta de investigación.**

¿Cuál es la importancia de reproducir *Bacillus thuringiensis* en el campo agrícola?

¿Cuál es el protocolo a seguir para la multiplicación de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en laboratorio?

¿Es necesaria la multiplicación de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en laboratorio?

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general.**

Describir el protocolo de reproducción de *Bacillus thuringiensis* en laboratorio.

### **1.3.2 Objetivos específicos.**

- Detallar los protocolos de reproducción que se aplican a nivel de laboratorio para reproducir la *Bacillus thuringiensis*.
  
- Determinar cuál es el protocolo más eficiente de reproducción de *Bacillus thuringiensis* en laboratorio.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Control Biológico

Es la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales; es decir mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos. Los parásitos de las plagas, llamados también parasitoides, son insectos que viven a expensas de otro insecto (hospedero) al que devoran progresivamente hasta causarle la muerte. Durante ese tiempo completan su propio desarrollo larval. Los predadores son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas (víctimas o presas) en forma más o menos rápida succionándoles la sangre o devorándolos (Cisneros 2010).

Según el mismo autor los patógenos son microorganismos: virus, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos, que causan enfermedades entre las plagas. De los tres grupos de enemigos naturales controladores biológicos, los patógenos tienen características muy particulares, el control biológico se considera natural, cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre; y se le denomina artificial o aplicado cuando, de alguna manera, es afectado o manipulado por el hombre.

### 2.2 *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva con la capacidad de esporular, es muy semejante a otras especies del género *Bacillus*, como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, pero se diferencia de ellas por la formación de un cristal proteico en el momento de la esporulación (Portela et al. 2013).

Es considerado una bacteria cosmopolita en el ambiente, distribuida ampliamente en todo el mundo debido a su capacidad esporulante, lo que le confiere una elevada resistencia al calor y a la sequedad, se le ha aislado de diversos ecosistemas como suelos, agua, hojas de plantas, granos almacenados, insectos muertos, telarañas, y otros, la obtención de cepas a partir de cadáveres de insectos ha sido la principal fuente de preparados de uso comercial (Caballero y Ferré 2001).

### 2.3 Origen de *Bacillus thuringiensis*

El primer caso de utilización exitosa de las bacterias como entomopatógenas, fue la introducción del *Bacillus popilliae* y *B. lentimorbus* contra el escarabajo japonés *Popillia japonica* en los Estados Unidos. Estos gérmenes causan la “Enfermedad lechosa” de las larvas del escarabajo. Actualmente existen preparadas formulaciones comerciales de *B. popilliae*, que se aplican contra diversos escarabidos. Ningún patógeno ha recibido tanta atención como el *B. thuringiensis* Berliner. Después de perfeccionarse los métodos de cultivo y desarrollarse diversas razas biológicas este patógeno se ha comercializado bajo diferentes formulaciones de polvos, aspersiones y gránulos con diversos nombres comerciales (Carreras y Rodriguez 2009).

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 EEUU se comercializó por primera vez en 1957, bajo el nombre de Thuricide®. Desde entonces se ha desarrollado la producción de forma masiva en varios países de todo el mundo (Maduell et al. 2007).

En 1970 Dulmage descubrió la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* en EEUU a partir de larvas enfermas de lepidópteros, esta serovariedad resultó ser entre 2 y 200 veces más tóxica que las variedades anteriormente utilizadas en la producción comercial de bioinsecticidas. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EEUU (EPA) la designó como estándar de potencia o unidad internacional de toxicidad. En 1977, dos entomólogos israelíes aislaron un bacilo de larvas del mosquito *Culex* sp., el cual se designó con el nombre de *Bacillus thuringiensis* serovar, israeliensis, y fue considerado útil en salud pública para el control de vectores de enfermedades tropicales por ser patógeno de larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), vector del dengue (Carreras y Rodriguez 2009).

En los años 80 fueron descritas otras cepas de *Bacillus thuringiensis* serovar. *Morrisoni* patovariedades tenebrionis y san diego, activos contra coleópteros. Las serovariedades de mayor impacto a nivel industrial han sido

*kurstaki*, *israeliensis* y *morrisoni*, si bien no son las únicas. Desde el descubrimiento e identificación de *Bacillus thuringiensis*, el interés en esta bacteria ha sido cada vez mayor, tanto que a la fecha se han descrito 83 serovariedades distintas según su antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con nuevas actividades biológicas (Maduell 2007).

La mayoría de variedades estudiadas actualmente son activas contra larvas de diferentes grupos de lepidópteros, y algunas de ellas también lo son contra dípteros y coleópteros. Algunos estudios han mostrado que *Bacillus thuringiensis* también podría ser utilizado contra insectos de otros órdenes (Hymenoptera, Homoptera y Mallophaga), nemátodos, ácaros y protozoos. En los últimos años se han desarrollado ampliamente técnicas moleculares que han permitido manipular genes de *Bacillus thuringiensis* para desarrollar bacterias acuáticas recombinantes que forman parte de la dieta de larvas de insectos, así como para generar plantas transgénicas para conferirles resistencia a los insectos plaga (Drummond et al. 1995).

#### **2.4 Importancia de *Bacillus thuringiensis***

Preparaciones realizadas en base a *Bacillus thuringiensis* han sido usadas como insecticidas orgánicos o bioinsecticidas desde fines de la década del 30. En la actualidad se conocen más de 100 formulaciones en el mercado mundial, aplicándose alrededor de 10.000 toneladas anualmente en el planeta, siendo Dipel la marca más utilizada (Cabrales y Rosas 2012).

Los productos de este microorganismo presentan algunas características importantes como la ausencia de toxicidad en los seres humanos en muchos de los enemigos naturales de diversas plagas, en otros vertebrados y en las plantas, así como un espectro de acción reducido, lo que indica que puede ser altamente específico para una plaga determinada. Por tanto, estos bioinsecticidas pueden ser particularmente dirigidos para combatir a una plaga de interés sin perjudicar ni dañar el medio circundante.

El éxito de estas formulaciones se ha visto reflejado en la gran variedad de productos comerciales que existen, sólo las preparaciones para aspersión

comprenden aproximadamente el 2% del mercado global de insecticidas y aunque no ha sido fácil su introducción en el mundo de la agricultura la aplicación de los cultivos con formulaciones tradicionales de *Bacillus thuringiensis* está constituyendo la estrategia de elección de los agricultores orgánicos, ya que gracias a las numerosas pruebas de seguridad y del impacto sobre la salud humana y del ambiente, se utilizan con mayor certeza de su inocuidad, para una producción agrícola más sana y de mayor calidad (Rosas-García 2008).

## **2.5 Características generales de *Bacillus thuringiensis***

La *bacteria Bacillus thuringiensis* es un bacilo gram-positivo, flagelado y esporulado que se caracteriza por la formación de un cuerpo paraesporal o cristal de proteína, conocido como  $\delta$ -endotoxina, estos cristales se forman durante la esporulación y tienen actividad tóxica para larvas de insectos (Castañet-Martinez y Moreno-Reyes 2016).

Según los mismos autores manifiestan que la  $\delta$ -endotoxina puede variar en tamaño y en forma, ya que según la variedad de *Bacillus thuringiensis*, pueden producir en el medio de cultivo más de una forma de cristales, se menciona que se encontraron cristales de formas romboidal, de tipo amorfo y también de la clase bipiramidal. Mientras que reportan el aislamiento de cristales irregulares, cuboidales, bipiramidales y esféricos, aunque señalan que la forma más común es la bipiramidal.

Crece en gran variedad de medios no selectivos, siendo el caldo nutritivo y el Luria Bertani (LB) dos de los más utilizados. Aunque puede crecer desde los 15 hasta los 45°C, la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 26 y 30°C, pudiéndose producir pérdidas de plásmidos a temperaturas mayores de 32°C. *Bacillus thuringiensis* no es especialmente exigente en cuanto al pH de su crecimiento. Crece adecuadamente en valores de entre 5,5 y 8,5, con pH óptimo comprendido entre 6,5 y 7,5 (Sauka y Benintende 2008).

La morfología de las colonias de *Bacillus thuringiensis* crecidas en placa puede variar en relación con el medio de cultivo utilizado. En agar nutritivo forma colonias circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro. El

diámetro que avanza en la placa de cultivo depende directamente de la densidad de colonias que alberga. Su textura es seca y cerosa, apreciándose en colonias maduras que su círculo central posee una superficie de apariencia más brillante y lisa que el halo externo, mate, debido probablemente a la esporulación de las células centrales, más adelantadas en el ciclo (Medrano-González et al. 2000).

La principal actividad insecticida contenida en este bacilo son las inclusiones cristalinas paraesporales producidas durante la esporulación, sin embargo otras toxinas también contribuyen al efecto biológico final, como el producido por las proteínas insecticidas vegetativas o proteínas VIP, expresadas y secretadas durante el desarrollo vegetativo y la esporulación, estas fueron descritas como tóxicas para lepidópteros. Además una serie de compuestos extracelulares contribuyen a su virulencia:  $\beta$ exotoxinas, fosfolipasas, proteasas y quitinasas. Las esporas pueden contribuir a la patogenicidad, a menudo sinergizando la actividad de las proteínas cristal (Schnepf et al. 1998).

## **2.6 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* tiene un ciclo de vida que comprende la formación de endosporas cuando las condiciones del medio en el que se encuentra son adversas. La endosporas es una forma de resistencia frente a situaciones de estrés ambiental como la desecación o la falta de nutrientes, entre otros. Junto con la endosporas también forma un cristal paraesporal constituido por  $\delta$ -endotoxinas. Cuando estas protoxinas contenidas en el cristal son ingeridas por las larvas de los insectos susceptibles les causan intoxicación. Las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas y sus enzimas digestivas, disuelven los cristales y activan las protoxinas por cortes proteolíticos, convirtiéndolas en toxinas (Whalon y Wingerd 2003).

La toxina es reconocida por receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto, se ancla a ella y forma canales iónicos, causando un desequilibrio osmótico y por tanto la lisis celular. Esto provoca en último término la muerte del insecto. Las endosporas de *Bacillus thuringiensis* se mantienen en el canal alimentario, donde, después de una disminución del pH provocada por el desequilibrio osmótico, pueden germinar. Una característica

importante de estas toxinas es su alto grado de especificidad. En la relación toxina-insecto susceptible se han descrito cuatro niveles de especificidad (Maduell 2007).

El primer nivel corresponde a la conducta alimentaria del insecto; éste debe ingerir junto con su alimento las endosporas y los cristales de *Bacillus thuringiensis*. El segundo nivel viene definido por el pH del intestino medio del insecto, que debe ser alcalino, pues la mayoría de los cristales paraesporales de *Bacillus thuringiensis* se solubilizan a pH alto, excepto en un caso, en el que también solubilizan a pH ácido (Koller et al. 1992).

Según el mismo autor el tercer nivel es debido a las proteasas alcalinas del intestino del insecto; éstas han de ser las adecuadas para poder digerir parcialmente las proteínas, es decir, realizar el paso de protoxina a toxina. Por último, el cuarto nivel de especificidad corresponde a los receptores de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto; las toxinas deben ser reconocidas por los receptores para poder anclarse a la membrana. Además de la unión al receptor, es necesaria la inserción de parte del dominio de la toxina, la agregación y la formación del canal.

## **2.7 Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis***

El aislamiento y selección de nuevas cepas de la especie *Bacillus thuringiensis*, utilizada para la producción de bioplaguicidas es una práctica internacional que ha permitido aumentar las posibilidades de uso a partir de nuevas cepas con potencialidades de control sobre otros organismos que constituyen plagas (Ruiz de Escudero et al. 2004).

La mayoría de los procedimientos para el aislamiento de *Bacillus* con actividad entomopatógena, incluyen un pre-tratamiento de pasteurización de las muestras destinado a la eliminación de la flora vegetativa presente en la misma sin afectar la viabilidad de la mayoría de las esporas, siendo ésta la primera etapa selectiva del proceso (Vallejos 2011).

El tratamiento con calor consiste en calentar a una temperatura entre 60-65°C las suspensiones de la muestra en solución salina o en agua corriente durante 60 min. *Bacillus thuringiensis* se distingue solamente por la formación de cuerpos paraesporales visibles al microscopio. Se corrobora la presencia de la especie *thuringiensis* mediante la determinación de la presencia del cuerpo paraesporal o cristal (Carreras y Rodríguez 2009).

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa (Medrano-González et al. 2000).

La presencia del cristal paraesporal es la característica más importante para la identificación de *Bacillus thuringiensis*, se determina por tinción, es decir, se prepara un frotis delgado de la solución de *Bacillus thuringiensis* sobre un vidrio portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se cubre con una solución de cristal violeta 0.5% durante 2-3 min. Se lava el exceso de colorante con agua y se deja secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se observan al microscopio óptico con 1000X de aumento (Medrano-González et al. 2000).

## **Protocolo 1.**

### **2.8 Protocolo de reproducción de *Bacillus thuringiensis* en medios de cultivos líquidos.**

#### **2.8.1 Localización del estudio**

La localización tiene por objetivo, analizar los diferentes lugares donde es posible ubicar el proyecto, buscando establecer un lugar que ofrece los máximos beneficios, los mejores costos, es decir en donde se obtenga la máxima

ganancia, si es una empresa privada, o el mínimo costo unitario, si se trata de un proyecto social, para el caso de estudios científicos la localización sirve para determinar que las condiciones externas del experimento y su compatibilidad (Corrillo y Gutierrez 2016).

### **2.8.2 Material biológico: cepa de *B. thuringensis***

Se conocen actualmente alrededor de 100 bacterias entomopatógenas dándole un uso como bioinsecticida al género, esta bacteria es un parásito de insectos y, a su vez, un saprófito en el suelo. Sus células vegetativas son bacilos Gram positivos, aerobios facultativos, se divide por fisión binaria y frecuentemente forma cadenas. Presenta esporas y cristales paraesporales bipiramidales durante la esporulación. Tiene la capacidad de fermentar la glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar la gelatina, almidón, glucógeno y n-acetil-glucosamina (Sauka y Benintende 2008).

### **2.8.3 Reconocimiento de la bacteria**

Mediante un proceso conocido como tinción de Gram, que bajo la presencia de cristal violeta y lugol, colorantes que penetran en las paredes de las células bacterianas tiñéndolas de un color azul-violeta si corresponden a organismos Gram positivos, se puede identificar la bacteria *B. thuringensis* (Brock y Madigan 1993).

### **2.8.3 Inóculo inicial**

Mediante una técnica de reconocimiento de la bacteria, se programa una multiplicación seriada de la bacteria, esto con el objetivo de contar con el material biológico suficiente para el inóculo, en esta fase se pudo apreciar la formación de estructuras estriadas color blanquecinas correspondiente a las colonias de la bacteria (Brock y Madigan 1993).

### **2.8.4 Preparación de Medios**

#### **2.8.4.1 Medio de cultivo a base de Leche azucarada**

Este medio consta de 350 ml (70%) de leche azucarada, y 150 ml (30%) de caldo base, luego se procede a combinarlos en recipientes de 100 ml de

capacidad se coloca en autoclave a 121 grados centígrados y 1 Atm, durante 60 minutos, y posteriormente se deja enfriar dentro de la cámara de seguridad durante 30 minutos (Cobo 2017).

#### **2.8.4.2 Medio de cultivo a base del subproducto agroindustrial “lacto suero”**

Este medio consta de 350 mL (70%) de lacto suero, subproducto agroindustrial proveniente de la elaboración de quesos, y 150 ml (30%) de caldo base, luego de combinarlos en recipientes de 100 ml de capacidad se coloca en autoclave a 121 grados centígrados, 1 Atm, durante 60 minutos, y posteriormente se deja enfriar dentro de la cámara de seguridad durante 30 minutos (Cobo 2017).

#### **2.8.4.3 Medio de cultivo líquido a base de levadura activada**

Este medio consta de 175 g de levadura comercial previamente activada con 40 g de azúcar en 300 ml (60%) de agua tibia (30 °C a 35 °C) durante 20 minutos, posteriormente este preparado se combina con 150 mL (30%) de caldo base, y se le añade 50 ml (10%) de miel de caña, se traslada al autoclave a 121 grados centígrados, 1 Atm, durante 60 minutos, y posterior se deja enfriar en la cámara de seguridad durante 30 minutos (Cobo 2017).

#### **2.8.5 Incubación y condiciones de fermentación**

Después de que los medios de cultivo líquidos se hayan enfriado a temperatura ambiente en la cámara de seguridad se añade 10 µl del inóculo inicial, proveniente de los tubos con el inóculo de *B. thuringensis* a cada uno de los medios líquidos de forma aleatoria. Posterior las unidades pasan a proceso de fermentación de 12 días bajo un maquina fermentadora-agitadora a una temperatura de 37 grados centígrados y 121 revoluciones por minuto para asegurar movimiento del medio de cultivo y presencia de oxígeno (Cobo 2017).

#### **2.8.6 Método de extracción y conteo bacteriano**

El método de conteo es permitir el crecimiento de una sola célula en la superficie de un medio de cultivo sólido apropiado, se postula que cada colonia

proviene de una sola célula y teniendo en cuenta el volumen del inóculo empleado y la suspensión- dilución sembrada se calcula en número de UFC (Frioni 2006).

Se debe tomar 1 ml de cada medio de cultivo y se procede a trasladarlo a un tubo de ensayo previamente preparado con 9 ml de agua esterilizada, este a su vez pasa por una centrifuga durante 10 segundos para homogenizar la mezcla. Después se toma 1 ml de este tubo y se procede a pasar a otro que contenga 9 ml de agua esterilizada y repite este proceso hasta 12 veces consecutivas, finalmente se procede a la siembra de 0.1 ml de los tubos correspondientes a la diluciones en una en cajas Petri con medio sólido, para que posteriormente estos contenedores pasen por un proceso de incubación durante 48 horas a 37 grados centígrados para posterior conteo de colonias seleccionando cajas que presenten entre 30 y 300 UFC (Cobo 2017).

## **Protocolo 2.**

### **2.9 Protocolo de reproducción de *Bacillus thuringiensis* en agar nutritivo.**

#### **2.9.1 Aislamiento de *Bacillus thuringiensis***

La procedencia de las muestras de suelo de las que se aísla *Bacillus thuringiensis* se deben registrar los datos como lugar, lote, propietario del lote, jurisdicción cantonal y provincial si fuese el caso.

El procesamiento para la recolección de la muestra debe regirse a un procedimiento para el cual se debe pesar 1g de suelo se mezcla con 10 mL de agua destilada estéril y se debe pasteurizar en baño María a 65°C por 30 min. Se deja en hielo por 30 min y de éstos sólo 10 ml se aforaron con agua destilada estéril a un volumen final de 200 ml. De esta suspensión se deposita 0,5 ml en cajas Petri que contienen agar Luria Bertani (10 g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl en 1 litro) y Agar nutritivo respectivamente y se deja crecer en una estufa a 28°C. Se aíslan las colonias separadas de distinta morfología y se purificaron por resiembras sucesivas (Carrera-Cabezas 2009).

### **2.9.2 Identificación de *Bacillus thuringiensis***

Los aislamientos de *Bacillus thuringiensis* se deben hacer en cajas Petri con agar nutritivo y el caldo nutritivo Luria Bertani se incuban a 28 °C, por medio de este procedimiento se observa su morfología (forma, borde, perfil, color) posteriormente se debe realizar la tinción de Gram.

### **2.9.3 Prueba de fermentación de la glucosa.**

Se debe preparar un medio líquido glucosado que tiene un indicador de pH (púrpura de bromocresol), en tubos de ensayo en pico de flauta y con una asa se siembra el *Bacillus*, se coloca en la estufa por 24 horas, se observa el cambio de coloración del medio de color violeta a amarillo tomándose este resultado como positivo. En el mismo tubo se introduce una campana de Durham en posición invertida, que dependiendo de que aparezca una burbuja o no, nos indicara si es gram positivo o gram negativo (Carrera-Cabezas 2009).

### **2.9.4 Prueba De Voges-Proskawer.**

Esta prueba se busca la presencia de acetoína o acetil-metil carbonil. Se debe sembrar en un tubo con medio de Clark y Lubs. Tras la incubación 24-48h a 28°C añadimos dos reactivos:  $\alpha$ - naftol en solución alcohólica (etanol) al 6% y una solución de KOH al 40%. Este último reactivo oxida a la acetoína formando diacetilo que se une a un residuo de guanidina del medio en que se hace la prueba, en presencia de la  $\alpha$ -naftol. La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína (Carrera-Cabezas 2009).

### **2.9.5 Prueba de la hidrólisis del almidón**

La última de las pruebas bioquímicas consiste en investigar la producción o no de  $\alpha$ - amilasa que es la enzima que hidroliza el almidón. Para realizar esta prueba se siembra previamente, por 48 horas a 28°C en Agar de Almidón una estría de *Bacillus thuringiensis*. Luego se debe colocar 2 a 3 gotas de lugol. La reacción positiva se determinó por el área clara alrededor del cultivo (Carrera-Cabezas 2009).

### 2.9.6 Presencia del cristal paraesporal.

La presencia del cristal paraesporal también se determina por tinción, es decir, se prepara un frotis delgado de *Bacillus thuringiensis* sobre un vidrio portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se debe cubrir con una solución de cristal violeta 0.5% durante 3 min. Se lava el exceso de colorante con agua y se deja secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se los puede observar al microscopio óptico con 1000X de aumento. (Carrera-Cabezas 2009).

### 2.9.7 Fermentación de *Bacillus thuringiensis*

Los medios de cultivo para la fermentación se pueden preparar con los siguientes reactivos.

**Cuadro 1. Componentes de los medios de cultivo**

MEDIO DE CULTIVO 1	MEDIO DE CULTIVO 2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3.4g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.25g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O 0.06g	CaCO <sub>3</sub> 0.5g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O 0.07g	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O 0.000055g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0.008g	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0.02g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O 0.014g	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O 0.014g
CaCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O 0.055g	CaCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O 0.015g
Bacto-triptona 3.5g	Harina de soya 3.0g
Glucosa 1.5g	Glucosa 2.5g
500mL de H <sub>2</sub> O destilada	Pure de tomate 20g
	500mL de H <sub>2</sub> O destilada

Se ajusta el pH con KOH 3N a un pH de 7.2 para el medio 1, para el medio 2 se utiliza NaOH 1N y se lleva a un pH de 7 y se esteriliza ambos medios a 121°C por 15 minutos. Se estandariza el inóculo para lo cual se realiza una suspensión densa de *Bacillus thuringiensis* con agua destilada estéril, a partir de un desarrollo de la bacteria en placas Petri conteniendo Agar Luria Bertani. De esta suspensión se hace diluciones hasta obtener una concentración de aproximadamente 10<sup>6</sup> esp/ml. Con una pipeta estéril se inocula 5mL de la suspensión de *Bacillus thuringiensis* en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml con 500 ml de medio de cultivo 1 y 2. Se lleva a cabo fermentaciones bajo las

siguientes condiciones de cultivo: temperatura a 27 ° C, agitación 200 RPM y pH de 7-7.2. Se toman muestras cada 8 horas y se procede al conteo de esporas con la cámara de Neubauer. Se debe realizar la medición del pH cada 24 horas (Carrera-Cabezas 2009).

### **2.9.8 Cuantificación de esporas del bioformulado de *Bacillus thuringiensis***

Para la determinación del número de esporas por ml del bioformulado de *Bacillus thuringiensis* se prepara diluciones en serie (10-1, 10-2) con el fin de facilitar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer. La primera dilución (10-1) se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1ml del bioformulado a un tubo de ensayo con 9 ml de agua estéril, se agita fuertemente durante 1min obteniéndose la primera dilución, de la dilución 10-1 se toma 1 ml y se coloca en 9 mL de agua estéril obteniéndose la dilución 10-2 (Carrera-Cabezas 2009).

Se toma el tubo de la dilución 10-2, y se coloca 3 gotas de cristal violeta y se agita enérgicamente durante 30 segundos y se deja reposar 3 minutos, se vuelve a agitar e inmediatamente se toma la muestra de (1µ L) con la pipeta para ser depositado en la cámara. Se deja reposar medio minuto antes de proceder al conteo. Luego se procede a llevar la cámara al microscopio y se procedió al conteo con el objetivo de 40x. Cada 8 horas se debe realizar el conteo de las esporas del bioformulado.

La concentración de esporas por ml de bioformulado se calcula multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara (Carrera-Cabezas 2009).

Número de esporas / ml = Suma de 5CS x factor de dilución x 50.000.

### III. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Metodología de la investigación.

Este trabajo de investigación documental fue elaborado en función a la recopilación, secuencia y revisión de artículos, ejecutado en reproducción a nivel de laboratorio de *Bacillus thuringensis*. La recolección de información se la realizó entre los meses de julio y agosto del 2019. Los métodos usados se fundamentaron en análisis de respuesta, los cuales posibilitaron sacar resultados de trabajos escritos y publicaciones en línea.

Los datos de la presente investigación se recopilaron de artículos científicos indexados de diferentes bases de datos: scielo, ufps (Respuestas), ResearchGate, Redalyc; libros, tesis de grado.

Con esta información se dio paso a la valoración de la información, con la finalidad de definir la calidad de esta y poder tenerla en cuenta al momento de realizar la respectiva citación del documento.

### 3.2 Situaciones detectadas.

En la agricultura moderna, se ha sesgado la sostenibilidad de la producción agrícola. El elevado uso de agroquímicos sin lugar a duda ha permitido obtener incrementos importantes en la productividad, sin embargo sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura, causas como la práctica del monocultivo, la contaminación de suelo y agua por el elevado uso de pesticidas químicos han originado una notoria inestabilidad de los ecosistemas agrícolas, reduciendo la biodiversidad de estos. Lo que se manifiesta principalmente en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos.

El empleo de nuevas tecnologías para la elaboración de biopesticidas es muy limitado en el país, se sigue recurriendo a métodos de control convencionales. La reproducción a nivel de laboratorio de *Bacillus thuringiensis*, en el caso de esta bacteria, algunas pueden crecer en casi cualquier medio de cultivo, otras requieren medios especiales y por eso se debe analizar los requerimientos básicos para la elaboración de los medios de cultivo.

El medio de cultivo se define como la base para la multiplicación de cualquier microorganismo, este debe constar de necesidades básicas como agua, carbono, nitrógeno y minerales. En ocasiones también factores de crecimiento y de ser necesario oxígeno para formar su biomasa y como fuente de energía para la síntesis y mantenimiento celular. Debido a que la mayoría de microorganismos tienen una composición elemental muy similar se puede diseñar un medio de cultivo idóneo adaptando a recursos existentes.

Se han descubierto diferentes aspectos relacionados a la genética, metabolismo, toxinas de este microorganismo; sin embargo, no se tiene tanta información sobre los procesos de fermentación y producción. Es por ello que es de importancia conocer su producción, su cinética y su infectividad.

### **3.3 Soluciones planteadas.**

En los ensayos realizados en el laboratorio se ha observado que *Bacillus thuringensis* es activo sobre larvas de diferentes insectos plagas que afectan económicamente los cultivos.

La bacteria gram positiva *B. thuringensis* puede ser utilizada para estos fines por su característica de producir sustancias antibióticas y de adaptación a varios tipos de sustratos, en este sentido *B. thuringensis* es utilizado como agente antagonista de hongos fitopatógenos como: *Sclerotinia*, *Collectotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, y *Penicilium*.

Existen medios de cultivo líquidos de bajo costo para la multiplicación de esta bacteria. En un ensayo realizado por Cobos (2010) después de pruebas preliminares realizadas en se establecieron cuatro sustratos principales, el primer sustrato a base de leche azucarada adicionada con un caldo base rico en minerales, otro a base del subproducto agroindustrial *lactosuero*, lo cual resulta accesible en materia costo para la reproducción de *Bacillus thuringensis*.

## IV. CONCLUSIONES

- En base a esta investigación bibliográfica realizada, se ha llegado a la conclusión que es muy importante utilizar biopesticidas a base de la bacteria *Bacillus thuringensis* para el control de insectos-plagas en los cultivos.
- Con la información obtenida en base a los trabajos científicos investigados podemos evidenciar que la especie *Bacillus thuringensis*, a diferentes protocolos de reproducción y medios de cultivos puede llegar a ser efectiva en pequeños porcentajes en condiciones de campo.
- El mejor medio de cultivo para la multiplicación comercial de la bacteria *B. thuringensis* es la bebida fortificada de soya, por la alta concentración de UFC/ml finales, por la tendencia de producción constante y bajo costo.
- El *lactosuero* con precio accesible por litro, podría representar en un medio de cultivo óptimo para la producción comercial de la bacteria *B. thuringensis*, si es que sufre un proceso de repotenciación, adicionándole fuentes de carbono, vitaminas y minerales.

## V. RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones:

- Realizar la multiplicación de la bacteria *Bacillus thuringensis* a nivel de laboratorio para el control biológico de plagas en diferentes cultivos de importancia económica.
- Se recomienda practicar el protocolo de reproducción de *Bacillus thuringensis* en medios de cultivos líquidos, por la eficiencia que muestran según investigaciones.
- Utilizar insecticidas biológicos a base de *Bacillus thuringensis* en el cultivo de banano, para control de *Ceramidia viridis* en dosis de 0.30 a 0.40 kg/ha.
- Usar bioinsecticidas formulados a base de la bacteria *Bacillus thuringensis* para control de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz en dosis de 0.75 a 1 kg/ha.

## VI. RESUMEN

Este trabajo de investigación documental fue elaborado en función a la recopilación, secuencia y revisión de artículos, ejecutado en reproducción a nivel de laboratorio de *Bacillus thuringiensis*. Los datos de la presente investigación se recopilaron de artículos científicos indexados de diferentes bases de datos, con esta información se dio paso a la valoración de la información, con la finalidad de definir la calidad de esta y poder tenerla en cuenta al momento de realizar la respectiva citación del documento.

El manejo de *Bacillus thuringiensis* ha hecho surgir el interés de utilizar productos a base de esta bacteria. Estos biopesticidas constituyen los productos de segunda generación que son aquellos que contienen cepas que han sufrido algún tipo de manipulación genética con la finalidad de incrementar su espectro de actividad

La bacteria gram positiva *B. thuringiensis* puede ser utilizada para fines de control biológico por su característica de producir sustancias antibióticas y de adaptación a varios tipos de sustratos, en este sentido *B. thuringiensis* es utilizado como agente antagonista de hongos fitopatógenos como: *Sclerotinia*, *Collectotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, y *Penicillium*.

El lactosuero con precio accesible por litro, podría representar en un medio de cultivo óptimo para la producción comercial de la bacteria *B. thuringiensis*, si es que sufre un proceso de repotenciación, adicionándole fuentes de carbono, vitaminas y minerales.

Se recomienda practicar el protocolo de reproducción de *Bacillus thuringiensis* en medios de cultivos líquidos, por la eficiencia que muestran según investigaciones, se debe realizar la reproducción de *Bacillus thuringiensis* con el medio de cultivo a base de bebida de soya fortificada, por la eficacia que muestra en el control de patógenos en el campo y su bajo costo de reproducción.

**Palabras claves:** *Bacillus thuringiensis*, reproducción, medios de cultivo, control biológico.

## VII. SUMMARY

This documentary research work was prepared based on the collection, sequence and review of articles, executed in laboratory-level reproduction of *Bacillus thuringiensis*. The data of the present investigation were collected from indexed scientific articles from different databases, with this information we gave way to the valuation of the information, in order to define the quality of this information and to be able to take it into account when making the respective citation of the document.

The management of *Bacillus thuringiensis* has raised interest in transforming other microorganisms so that they are capable of producing toxic proteins in the colonizing environments and thus facilitate pest control. These insecticides constitute the second generation products that are those that contain strains that have undergone some type of genetic manipulation in order to increase their spectrum of activity

The gram positive bacterium *B. thuringiensis* can be used for biological control purposes due to its characteristic of producing antibiotic substances and adaptation to various types of substrates, in this sense *B. thuringiensis* is used as an antagonistic agent of phytopathogenic fungi such as: *Sclerotinia*, *Collectotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, and *Penicilium*.

The whey with accessible price per liter, could represent in an optimal culture medium for the commercial production of the *B. thuringiensis* bacteria, if it undergoes a process of repowering, adding sources of carbon, vitamins and minerals.

It is recommended to practice the *Bacillus thuringiensis* reproduction protocol in liquid culture media, because of the efficiency they show according to research, the reproduction of *Bacillus thuringiensis* should be carried out with the culture medium based on fortified soybean bedida, for the effectiveness it shows in the control of pathogens in the field and their low cost of reproduction.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, reproduction, culture media, biological control.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Biodiversidad, 2018. 2019. Moscas, mosquitos, zancudos y jejenes (en línea, sitio web). Consultado 14 ago. 2019. Disponible en [https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran\\_familia/animales/insectos/moscas/moscas.html](https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/animales/insectos/moscas/moscas.html).
- Brock, T; Madigan, M. 1993. Microbiología (en línea). 6 ed. Mexico DF, Mexico , s.e. Consultado 18 ago. 2019. Disponible en <https://www.urbe.edu/UDWLibrary/InfoBook.do?id=32875>.
- Caballero, P; Ferré, J. 2001. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas (en línea). Madrid, España, MV Phytoma-España. 15-44 p. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <https://www.edicioneslav.es/producto/bioinsecticidas-fundamentos-y-aplicaciones-de-bacillus-thuringiensis-en-el-control-integrado-de-plagas/>.
- Cabrales, P; Rosas, R. 2012. Bt: un insecticida verde en el mercado (en línea). Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana 25:10. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num1/articulos/bt/>.
- Carrera-Cabezas, M. 2009. "Producción de Bacillus thuringiensis, Berliner A nivel de laboratorio" (en línea). s.l., Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. 2-85 p. Consultado 18 ago. 2019. Disponible en <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf>.
- Carreras, B; Rodriguez, D. 2009. Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Drosophila melanogaster* Maengi (en línea). La Habana, Cuba, s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1562-30092009000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092009000200002).
- Castañet-Martinez, C; Moreno-Reyes, S. 2016. Bacillus thuringiensis: Características y uso en el control de Aedes aegypti (en línea). Instituto

Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar 50(3):37-42. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223152661006>.

Cisneros, FH. (2010). CONTROL BIOLÓGICO (en línea). s.l., s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/control-biologico-de-plagas.pdf>.

Cobo, C. (2017). Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis* (en línea). Quito, Ecuador, s.e. Consultado 18 ago. 2019. Disponible en <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>.

Corrales, L; Gomez, M; Ramos, S. (2016). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos (en línea). Bogota, Colombia, s.e. Consultado 14 ago. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00046.pdf>.

Corrillo, F; Gutierrez, M. (2016). Estudio de localizacion de un proyecto (en línea). 7. s.l., s.e. Consultado 18 ago. 2019. Disponible en [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rvc/v7n11/v7n11\\_a05.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rvc/v7n11/v7n11_a05.pdf).

Drummond, J; Kotze, AC; Levot, GW; Pinnock, DE. 1995. Increased Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Associated with Pyrethroid Resistance in *Bovicola* (*Damalinea*) *ovis* (Phthiraptera Mallophaga: Possible Role of Monooxygenases (en línea). *Journal of Economic Entomology* 88(6):1607-1610. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/88.6.1607>.

Frioni, L. 2006. Microbiología básica, ambiental y agrícola (en línea). Montevideo, Uruguay, s.e. 90-95 p. Consultado 18 ago. 2019. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/index.php/documentos/file/604-microbiologia-basica-ambiental-y-agricola>.

Koller, CN; Bauer, LS; Hollingworth, RM. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-

endotoxin crystals. (en línea). Biochemical and biophysical research communications 184(2):692-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)90645-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90645-2).

Leon, A. 2014. Produccion de Bacillus Thuringiensis mediante fermentacion liquida utilizando diferentes medios de cultivo para el control de mosquitos culex spp (en línea). s.l., Instituto Politecnico Nacional. 2-83 p. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en [http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/120/1/TESIS\\_ARTURO\\_LEON\\_VALDEZ.pdf](http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/120/1/TESIS_ARTURO_LEON_VALDEZ.pdf).

Maduell, P. (2007). Estudio de la ecología de bacillus thuringiensis en la hoja (en línea). Barcelona, España, s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2007/tdx-1114108-121631/pms1de1.pdf>.

Maduell, P; Armengol, G; Llagostera, M; Lindow, S; Orduz, S. 2007. Immigration of Bacillus thuringiensis to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts (en línea). Journal of Applied Microbiology 103(6):2593-2600. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03509.x>.

Medrano-González, MA; Luna-Olvera, HA; Peña-Cabriales, JJ; Sánchez-Yáñez, JM. (2000). Sobrevivencia de células vegetativas de bacillus thuringiensis en la esfermosfera/rizosfera de frijol (en línea). Morelia, Mexico, s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en [https://www.chapingo.mx/terra/contenido/18/4/art333\\_337.pdf](https://www.chapingo.mx/terra/contenido/18/4/art333_337.pdf).

Padilla, V. (2017). Bioinsecticidas Bioinsecticidas (en línea). La Laguna, Mexico, s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/4277/Bioinsecticidas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Portela-Dussan, D; Chaparra-Giraldo, A; Lopez-Pazos, S. (2013). La biotecnología de Bacillus thuringiensis en la agricultura (en línea). 11. s.l., Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-)

24702013000200010.

Rosas-García, NM. (2008). Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (en línea). Bogota, Colombia, s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/776/77610105.pdf>.

Rosas García, NM. 2014. *Bacillus thuringiensis*: una aplicación de la ciencia (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología 16(2):5-6. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47665>.

Ruiz de Escudero, I; Ibañez, I; Padilla, M; Carnero, A; Caballero, P. (2004). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias (en línea). 30. Canarias, España, s.e. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <http://www.biols>.

Sauka, D; Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas (en línea). Revista Mutis 7(2). DOI: <https://doi.org/10.21789/22561498.1245>.

Schnepf, E; Crickmore, N; Van Rie, J; Lereclus, D; Baum, J; Feitelson, J; Zeigler, DR; Dean, DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. (en línea). Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 62(3):775-806. Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729609>.

UDVal. 2012. Identificación de un microorganismo - Prácticas - Microbiología - Biología - (en línea, sitio web). Consultado 17 ago. 2019. Disponible en <https://www.docsity.com/es/identificacion-de-un-microorganismo-practicas-microbiologia-biologia/204816/>.

Vallejos, J. 2011. Determinación de la actividad larvicida e insecticida de *Bacillus* sp., *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL – 12 QD) y *Beauveria bassiana* (cepa BOL 2 – QC), frente a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*, cepa ORR) I.I.F.B.-F.C.F.B. La Paz-Bolivia, 2011 (en línea). s.l., UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS. 2-86 p.

Consultado 17 ago. 2019. Disponible en  
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18168/TN-1094.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Whalon, ME; Wingerd, BA. 2003. Bt: Mode of action and use (en línea). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 54(4):200-211. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.10117>.

## IX. ANEXOS

