



Producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante en un medio fermentativo a base de sanguaza

Biomass production of mutant *Bacillus thuringiensis* H-14 var.
israelensis in fermentative media composed by sanguaza

Willian Blas Cerdán¹, Juan Rodríguez Soto¹, Juan Pedro Huamán¹, Wilbbert
Vigo Alfaro¹, Walter Moya Fernández³, Luis Sánchez Abanto³, Armando Pita
León³

¹Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. ²Escuela AP de Microbiología y
Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

Se evaluó el efecto del naranja de acridina, y un medio fermentativo a base de sanguaza, sobre la producción de la biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, se utilizó un testigo y cuatro concentraciones del mutágeno al 80 ppm, 120 ppm, 160 ppm y 200 ppm, después de haber hallado la dosis letal media (80 ppm) y la dosis letal máxima (700 ppm) empleando la línea de regresión. Las colonias mutantes se obtuvieron a partir de un medio agar Nysma conteniendo diferentes concentraciones de naranja de acridina, a 30°C por 48 horas, las mismas que presentaron un fenotipo diferente al grupo testigo. La producción de biomasa se realizó en biorreactores tipo cilíndrico aireado y agitado, con un volumen de trabajo de 1.4 L conteniendo los nutrientes y sales minerales adecuados más sanguaza (desecho pesquero rico en proteínas que reemplaza a la fuente nitrogenada). Las fermentaciones se llevaron a cabo por 50 horas a temperatura ambiente (20 ± 1°C), pH inicial de 7.0 y un inóculo microbiano de 10⁷ UFC. Las muestras se tomaron cada 5 horas evaluándose la temperatura, pH y células viables, la biomasa se estimó mediante el método de recuento en placa, obteniéndose la máxima concentración a las 40 horas en cada uno de los tratamientos con naranja de acridina (15.7 x 10⁹ UFC al 16%), excepto en el testigo, según el programa estadístico SPSS.

Se logró determinar que la biomasa se encuentra incrementada en proporción directa con respecto a las concentraciones del mutágeno, ocurriendo la máxima producción al 200 ppm (2.78 g/L).

Palabras claves: Producción Biomasa, *Bti* mutante.

ABSTRACT

A control and four mutagen concentrations at 80 ppm, 120 ppm, 160 ppm and 200 ppm were used to test the effect of the orange acridine and a fermentative means made of sanguaza on the biomass production of the *Bacillus thuringiensis* H - 14 var. *israelensis* after having found the half lethal dose (80 ppm) and the maximum lethal dose (700 ppm), using the regression line. The mutant colonies were obtained from agar Nysma containing different orange acridine concentrations at 30° C for 40 hours which showed a different phenotype from the witness group. The biomass production was made in aired cylindrical and stirring bioreactors, with a working volume of 1.4 liters, containing the adequate nutrients and mineral salts plus sanguaza, fishing waste rich in proteins replacing the nitrogen source. The fermentations were carried out

during 50 hours at normal temperature (20+ 1°C), initial pH of 7.0 and a microbial inoculum of 10 UFC. The samples were taken every 5 hours being tested the temperature, pH and viable cells. The biomass was estimated by the recount method in plate, obtaining the maximum concentrations at 40 hours in each of the orange acridine treatments (15.7 x 10⁶ UFC at 16%), except in the witness according to the statistical program SPSS. It was determined that the biomass increased in direct proportion with respect to the mutagen concentrations happening the maximum production at 200 ppm (2.78 g/L).

Keywords: Biomass production, mutant *Bt*, sanguaza

INTRODUCCIÓN

Las plagas de insectos en zonas urbanas como rurales, se han convertido en una amenaza constante para la salud y calidad de vida del hombre, ocasionando también, pérdidas en cultivos agrícolas; representando entre el 10% y 30% de los costos de producción¹. Hasta ahora la forma más eficaz de controlar los insectos plaga se basa en la aplicación de pesticidas químicos, y su uso irracional ha sido la principal causa de contaminación ambiental; con el surgimiento de los plaguicidas de origen órgano-sintéticos se ha disminuido la biodiversidad, e inducido resistencia en este tipo de insectos, provocando un desequilibrio del balance ecológico^{2,3}.

Una alternativa para solucionar el problema de resistencia a los insectos plaga es el control biológico, definido como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente cuyos productos reducen sus efectos, asimismo se ha reportado la existencia de más de 1500 especies de microorganismos entomopatógenos, entre los cuales las bacterias son de mayor importancia, constituyendo los bioinsecticidas^{4,5}.

En la actualidad *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), es el producto comercial de mayor difusión y uso a nivel internacional por su alta especificidad, inocuidad para el hombre, animales y plantas, al no dejar residuos tóxicos en el ambiente⁶; ya se han identificado una gran cantidad de cepas *Bt* con diferentes rangos de acción insecticida, la mayoría tiene actividad contra lepidópteros pero también se ha encontrado cepas nocivas para dípteros, coleópteros, ácaros, platelmintos y nemátodos⁷.

B. thuringiensis es una bacteria que se encuentra en la flora natural del suelo, de forma bacilar, Gram positiva, anaeróbica facultativa y formadora de esporas; esta bacteria produce toxinas altamente específicas contra insectos⁸, cuya producción comercial se realiza por fermentación en grandes biorreactores. Cuando la bacteria entra en fase de esporulación sintetizando las proteínas toxigénicas en forma de cristales. Después de terminada la esporulación, las células se lisan por completo liberándose la spora y los cristales paraesporales; luego de la citólisis, la masa de la spora es aproximadamente 15% de la célula vegetativa y el cristal es del orden del 12% al 17% de la misma^{1,9}.

Los cristales son protoxinas formados por la glucoproteína δ - endotoxina, de elevado peso molecular (130 a 140 Kda). El cristal proteínico es altamente insoluble en condiciones normales, así ésta es enteramente segura¹⁰. La δ - endotoxina es efectiva solamente cuando es ingerida por insectos que tienen en las membranas de sus células epiteliales del intestino medio, receptores específicos para ligar dicha toxina. Una vez que esta ha sido ingerida, se solubiliza en el ambiente alcalino y bajo la acción de las proteasas, se transforma en su forma activa de 60 Kda la cual actúa sobre dichos receptores, conduce al desequilibrio iónico. Las células se lisan, la larva deja de alimentarse, el pH intestinal disminuye. Esta disminución en el pH permite a las esporas bacterianas germinar, invadiendo al hospedero causando una letal septicemia¹¹.

La esporulación es una respuesta a determinadas condiciones nutricionales y ambientales, las fuentes de carbono y nitrógeno son muy importantes en la producción de biomasa de *Bt*, así como de la toxina, pues la falta o disminución de las concentraciones de estas fuentes son las causas principales del inicio de la esporulación, así, se puede producir bioinsecticida a partir de fuentes carbonadas y nitrogenadas^{12,13}.

Las investigaciones de *Bt* no solo involucran requerimientos nutricionales sino también parámetros de procesamiento tales como oxígeno, temperatura y pH; es así que se han utilizado biorreactores

Airlift en un medio de cultivo suplementado con una fuente nitrogenada a base de "sanguaza" diluida a concentraciones de 5, 6, 8, 9 y 10 % v/v y 0,2, 0,5 y 0,8 vvm flujos de aireación, obteniéndose la mayor producción del bioinsecticida al 10% v/v con 0,5 vvm de aireación. Por otro lado también se trabajó a diferentes pH 6,0, 6,5 y 7,0 y temperaturas de 25, 30 y 35 °C, encontrando que la máxima producción de biomasa se llevó a cabo utilizando un pH de 7,0 y a una temperatura de 30 °C, las cuales juegan un rol importante en la producción del bioinsecticida¹⁴. En nuestro medio existen industrias que generan fuentes nitrogenadas residuales producto de su actividad, especialmente la industria de la harina de pescado, la cual produce líquidos residuales tales como: "agua de cola", "agua de bombeo" y "sanguaza"¹².

La utilización de la sanguaza constituye una alternativa de tecnología limpia de los ambientes pesqueros, pues una tonelada métrica de pescado procesado produce 50 litros de sanguaza y a nivel nacional se han generado más de 500 millones de litros, representando un verdadero problema en las costas del Perú. Por lo tanto, su uso como medio de producción de *Bt* evitaría la contaminación de puertos, disminuyendo los costos de producción e incrementando el rendimiento de la¹⁵.

La "sanguaza" contiene cantidades apreciables de proteínas (6,3%), grasas (3,2%), sólidos solubles e insolubles (3,5%), sales minerales (1,8%) y otros, las cuales podrían ser aprovechadas para la producción de la biomasa de *Bt*. La sanguaza ha sido utilizada y empleada en biorreactores Airlift, como fuente orgánica de nitrógeno, satisfaciendo las necesidades nutricionales de la bacteria, logrando la producción del bioinsecticida y alcanzando la mayor producción de biomasa a las primeras seis horas de fermentación; así mismo trabajaron la producción de *Bt* produciendo su toxina en un medio fermentativo diseñado solo a base de sanguaza diluida, pero no se encontraron valores elevados de producción, tal vez por la falta de aireación usada o la falta de algún nutriente específico¹⁶.

Durante muchos años se pensó que *Bt* era un patógeno exclusivo de lepidópteros, porque solo se aislaron cepas activas de este grupo de insectos. Sin embargo, en 1978 De Barjac describió la variedad israelensis, que actúa en forma muy específica contra mosquitos de los géneros *Culex*, *Anopheles* y *Aedes*¹⁷. La clasificación de *Bt* está basada en el antígeno H, reportándose más de 40 H serotipos y varios subserotipos¹⁸. Sin embargo los genes capaces de producir las toxinas *Bt*, están localizados usualmente en diferentes plásmidos pero también se encuentran en el ADN cromosómico. Se ha reportado que varios de los genes de la toxina ubicados en los plásmidos se hayan flanqueados por transposones o secuencia de inserción. Una cepa portadora de los genes de la toxina biocida, puede transferir por conjugación hacia otras cepas no portadoras, ya que la transferencia del ADN cromosómico por este evento es muy rara. Los genes de la δ - endotoxina, llamados *cry* se han clasificados en cinco grupos principales y varias sub clases, en total se tiene una familia de 26 genes diferentes que codifican para estas proteínas donde cada uno de ellos es altamente específico para un blanco determinado¹⁹. Se han revisado las secuencias aminoacídicas de distintas proteínas tóxicas, encontrando la existencia de cinco bloques de aminoácidos altamente conservados en todas las proteínas, los mismo que serían fundamentales para la toxicidad²⁰.

Actualmente existe una gran cantidad de agentes mutagénicos, entre los cuales se prefiere el uso de químicos, por su mayor efecto, escasa letalidad celular y mayor especificidad; comparado con los mutágenos físicos. Dentro de los mutagénicos químicos se encuentran el 5-Bromouracilo, etilmetano sulfonato (EMS), ácido nitroso, cloruro de hidroxilamina, naranja de acridina, entre otros²¹.

El naranja de acridina, es un colorante catiónico selectivo de los ácidos nucleicos y se encuentra dentro de los agentes mutagénicos intercalares, integrándose entre las bases nitrogenadas del ADN, originando deleciones o inserciones de un solo par de nucleótidos. Esta sustancia es una molécula plana con tres anillos conjugados que provocan distorsiones en la cadena de doble hélice; Por lo común ocasiona un desenrollamiento parcial, apertura o una reducción en la torsión de la molécula del ADN, inhibiendo la transcripción²².

Se han reportado trabajos en *Escherichia coli*, *Rhizobium sp.* y *Drosophila melanogaster*, donde se confirma su actividad mutagénica en concentraciones que van de 10 a 100 µg/mL. Los mutantes

obtenidos de *E. coli* tratados con naranja de acridina resultaron con una mayor actividad de la enzima penicilina G-acylicasa, en tanto se sugiere que se podría utilizar para la producción de otros metabolitos secundarios en otros organismos²³.

Debido a la importancia de *Bacillus thuringiensis* en la producción de bioinsecticida cuyos genes se encuentran muy emparentados entre sí, así como el efecto genotóxico de la naranja de acridina, y al no existir trabajos relacionados en nuestro país. Se ha creído conveniente desarrollar una nueva estrategia que permita incrementar la producción de la biomasa de Bti en un medio fermentativo a base de sanguaza.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (*Bti*) utilizada provino del IMT-AVH de la UPCH. Se procedió a la reactivación y aislamiento de la cepa de *Bt* en agar TPH incubándose a 30 °C por 4 horas²⁴, aislada y sembrada por el método de agotamiento en agar Nysma²⁵. Luego se preparó las concentraciones del mutágeno y determinó DL₅₀ y DL₁₀₀ a través del recuento de colonias de la bacterias, se eligió cinco concentraciones del naranja de acridina: 0-80-120 -160-200 ppm; luego se procedió a realizar la siembra en placa a 30°C por 48 horas, siguiendo un DECA. Los mutantes de *Bti* se detectaron por las características fenotípicas que presentaron las colonias. Se utilizaron biorreactores tipo TCAA, con un volumen de trabajo de 1,4 L y flujos de aire de 0,5 vvm a 220 rpm de agitación^{15,26}. El proceso duró 50 horas, durante la fermentación se realizaron muestreos cada 5 hrs. Luego se centrifugó el medio fermentativo, eliminándose el sobrenadante. El precipitado se deshidrató a 60°C por 24 hrs, la biomasa seca fue triturada, para luego pesarla. De los datos obtenidos se realizaron los cálculos para estimar la línea de regresión; así como el ANAVA y la prueba de Duncan, para determinar diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la biomasa y las cc. del mutagénico.

RESULTADOS

Se encontró que menos de 10 ppm de naranja de acridina constituyó la DL₅₀ y más de 60 pero menos de 70 ppm la DL₁₀₀ (Fig. 1), que los perfiles de crecimiento de la bacteria fueron similares a las diferentes concentraciones de esta sustancia (Fig. 2) y que cuando la concentración en el medio de cultivo aumentó, también aumentaron el tamaño de las colonias (Fig 3).

Se encontró, asimismo, que a mayor concentración de la naranja de acridina disminuye la producción de UFC (Tabla 1) y que, por el contrario, la producción promedio de biomasa aumenta (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La producción de la biomasa de *B. thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (*Bti*), requiere de un medio adecuado para el crecimiento, esporulación y la formación de la δ – endotoxina, además de conocer los requerimientos nutricionales principalmente de carbono y nitrógeno¹⁴. En la presente investigación se pretende mejorar la producción de la biomasa de *Bti*, por ello se consideró emplear colonias mutantes de la bacteria obtenidas a diferentes concentraciones del mutágeno Naranja de acridina; así como reemplazar la fuente nitrogenada por sanguaza²⁷.

En toda investigación, en el cual se desea comprobar la acción de una sustancia mutagénica, es necesario conocer la dosis letal media y la dosis letal máxima, porque a partir de ellas, se puede elegir las concentraciones adecuadas para la consecución de un objetivo determinado. En tal sentido, se utilizó la línea de regresión para determinar la dosis letal media, la misma que ocurre a una concentración del 80 ppm y la dosis letal máxima se encuentra entre el 600 ppm y el 800 ppm del naranja de acridina.

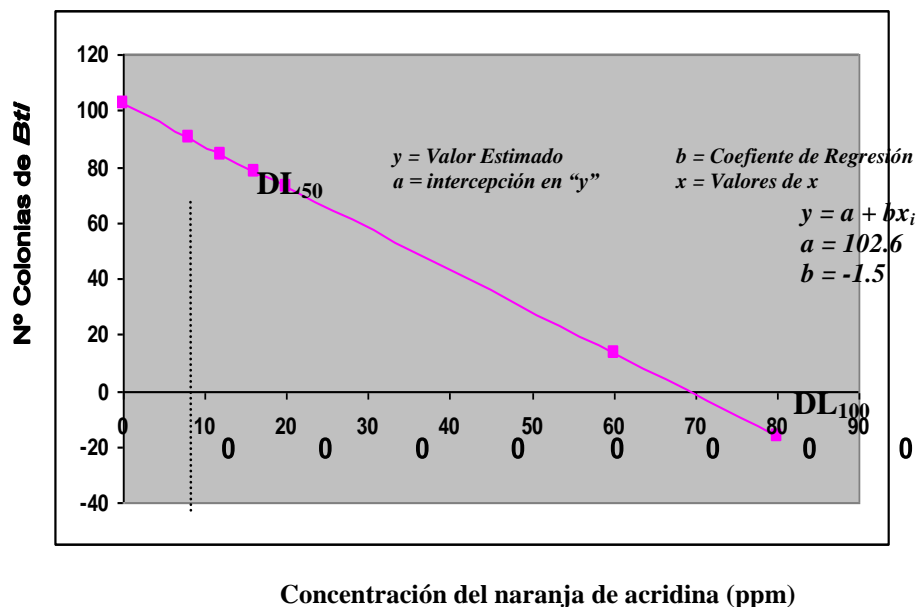


Fig. 1. Línea de regresión para determinar la Dosis Letal Media (DL_{50}) y Dosis Letal Máxima (DL_{100}) de las diferentes concentraciones del naranja de acridina (ppm) respecto al número promedio de colonias del *Bacillus thuringiensis*H-14 var. *israelensis*.

Se consiguió obtener colonias mutantes de *Bti* a diferentes concentraciones del mutágeno naranja de acridina, las colonias se observan como estructuras de bordes rugosos, con superficies lisas, compactas y sobresalientes, de color blanco cremoso y de centro brillante en el testigo. Transcurridas 48 horas de exposición al agente mutagénico, las

Tabla 1. Número promedio de colonias de *Bacillus thuringiensis*H-14 var. *israelensis*(UFC/mL) obtenidas a diferentes concentraciones del naranja de acridina (ppm) en un medio fermentativo a base a sanguaza a las 50 horas de fermentación.

Tiempo (h)	Log. UFC/mL (10^9)				
	T ₁ (0 ppm)	T ₂ (80 ppm)	T ₃ (120 ppm)	T ₄ (160 ppm)	T ₅ (200 ppm)
0	10,15	7,08	6,75	6,62	6,32
10	10,42	9,77	10,50	9,49	9,86
20	10,24	8,58	9,83	10,60	10,70
30	10,10	12,70	13,30	13,20	13,40
40	9,74	14,80	15,40	15,70	14,60
50	9,80	9,78	10,60	9,70	10,00

T: Tratamiento

Temperatura ambiente $20 \pm 1^\circ\text{C}$

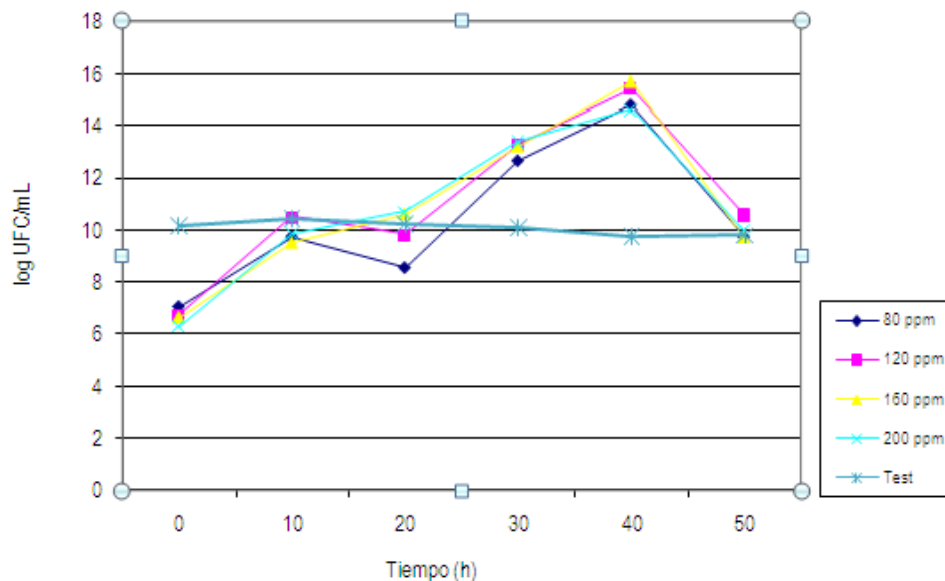


Fig. 2. Perfiles de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* obtenidas a diferentes concentraciones de naranja de acridina (ppm) en un medio fermentativo a base a sanguaza a las 50 horas de fermentación.

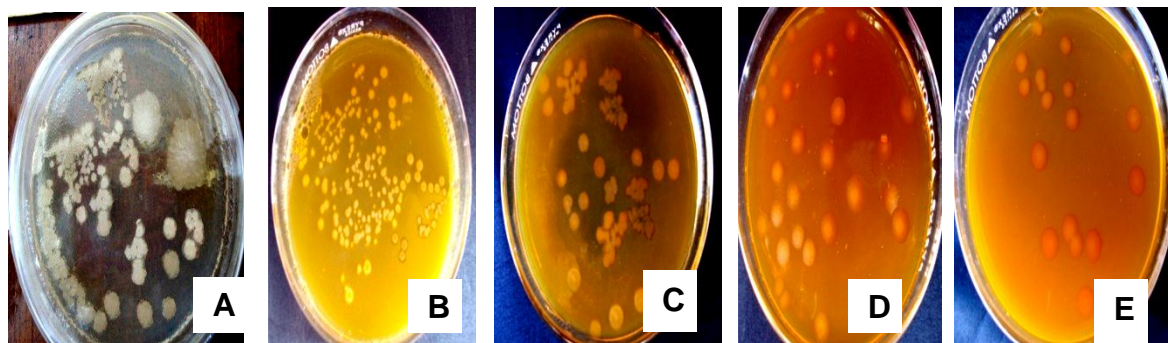


Fig. 3. Crecimiento en relación al número y tamaño de colonias de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* a diferentes concentraciones del naranja de acridina a las 48 horas de exposición A : 0 ppm, B : 80 ppm, C : 120 ppm, D : 160 ppm y E : 200 ppm

Tabla 2. Producción promedio del biomasa (g/L) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* obtenidas a diferentes concentraciones del naranja de acridina (ppm) en un medio fermentativo a base a sanguaza a las 50 horas de fermentación.

REPETICIONES	TRATAMIENTOS				
	T ₁ (0 ppm)	T ₂ (80 ppm)	T ₃ (120 ppm)	T ₄ (160 ppm)	T ₅ (200 ppm)
R ₁	1,89	1,90	2,15	2,49	2,95
R ₂	1,72	1,78	2,00	2,74	2,64
R ₃	1,70	1,83	2,10	2,36	2,75
Promedio	1,77	1,84	2,08	2,53	2,78

características morfológicas de las colonias mutantes muestran bordes regulares, superficies lisas, opacas y uniformes, de color anaranjado cremoso pero más pequeñas que las colonias testigo.

Se ha comprobado que el naranja de acridina produce alteraciones de tipo intercalar en la molécula del ADN, dando origen a la ganancia o pérdida de nucleótidos; generando un desplazamiento en el marco de lectura del mensaje genético, ocasionando cambios en el genotipo, los mismo que se traducen en el fenotipo²².

Las curvas de crecimiento de *Bti*, alcanzan sus picos más altos a las 40 horas del bioproceso en todos los tratamientos con el agente mutagénico, con excepción del testigo que lo hace en las primeras 10 horas. Este crecimiento lento, se debería a las diferentes concentraciones del naranja de acridina y a los mecanismos de reparación del ADN en la bacteria, ocasionando alteraciones en su metabolismo.

El valor máximo de colonias de *Bti* en su fase logarítmica fue de $15,7 \times 10^9$ UFC/mL, al 160 ppm del agente mutagénico a las 40 horas de fermentación; coincidiendo con los resultados obtenidos por ²⁸ en escalamiento de un proceso a nivel de laboratorio a planta piloto para la producción de *Bt*; y de ²⁶, en estudios de optimización de procesos fermentativos para producir *Bt* de la variedad aisawai; quienes encontraron una producción final de $10,08 \times 10^9$ y $5,5 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente entre las 24 y 50 horas de fermentación; valores muy bajos a lo conseguido por ²⁹, quien reporta $5,4 \times 10^{15}$ UFC/mL, en una investigación utilizando almidón como fuente carbonada en un medio de fermentación durante 48 horas; esto se explicaría porque *Bt* presenta la enzima amilasa que hidroliza al almidón hasta glucosa, esencial fuente de energía para el crecimiento aeróbico. Sin embargo ²⁶ indica que un medio apropiado para la producción de *Bt* se da cuando la concentración final del bioprocesos se encuentra entre 10^6 y 10^{10} UFC/mL

La máxima producción de biomasa al final del bioproceso se logró a una concentración al 20% del naranja de acridina, con un peso seco promedio de 2,78 g/L. Este resultado es mayor al conseguido por ²⁶, quienes hallaron una producción final de 1,78 y 1,40 g/L de peso seco entre 24 y 48 horas de fermentación; sin embargo estos valores pueden incrementarse después de las 56 horas. Por otro lado el resultado conseguido en el presente trabajo se encuentra por debajo de la producción de biomasa obtenida por ²⁹, quien reporta 3,33 g/L de peso seco promedio.

Los resultados obtenidos, muestran que no existe relación entre el crecimiento en su fase exponencial y la producción de biomasa de *Bti*, por lo que se puede afirmar que hay una asincronía en el proceso de esporulación, alargándose, según las diferentes concentraciones del mutágeno. Es necesario precisar que el proceso de fermentación de *Bti* se lleva a cabo en condiciones óptimas a un pH de 7,0 y a una temperatura de 30°C; y nuestro bioproceso ocurrió a un pH inicial de 7,0, disminuyendo a partir de las 35 horas hasta llegar a un valor de 5,0 a las 50 horas; más aún cuando se trabajó a temperatura ambiente de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Existen otras variables que deben considerar en la producción de la biomasa de *Bti*, como son la velocidad de agitación y el suministro de oxígeno, para evitar la acumulación de calor e inhibición o reducción de la calidad de la proteína biocida. El oxígeno no solo se requiere para el crecimiento de la bacteria, sino también es útil para la esporulación y la formación de la toxina¹⁵, reporto un recuento de células de *Bt* de 10^6 UFC/mL a las 48 horas de fermentación, esto se debería a la utilización de Biorreactores con deficiencias de aireación; concordante con ³⁰, quien sugiere que la fuente de aireación en el medio es esencial para la esporulación; y la ausencia o disminución de oxígeno solo produce un crecimiento vegetativo. Por lo antes mencionado se utilizó un biorreactor tipo tanque cilíndrico aireado y agitado, que permite una alta transferencia de oxígeno y en consecuencia un crecimiento ideal de *Bti* en el medio fermentativo²⁹.

Los resultados distintos en la producción de la biomasa indicados con su promedio fueron confirmados por el análisis de varianza. (Tabla 3), para identificar la existencia de diferencias significativa entre los tratamientos; sin embargo, a pesar de ser un método riguroso, es muy genérico y sensible a las diferencias que puedan presentar por lo menos un par de tratamientos; ante ello se hizo necesario aplicar un método más específico, la prueba de comparación de promedios de Duncan, para determinar entre que tratamientos existen tales diferencias.

CONCLUSIONES

La producción máxima de la biomasa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *Israelensis* (*Bti*) se logró a una concentración del 200 ppm del mutágeno a las 50 horas del bioproceso.

La biomasa de *Bti* obtuvo su pico más alto a una concentración del 160 ppm del agente mutagénico a las 40 horas de la fermentación.

Es factible realizar otros ensayos con diferentes mutágenos para incrementar la producción de la biomasa de *Bti*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cranshaw W. Questions and answers about *Bacillus thuringiensis*. Colorado State University Cooperative Extension. 2007. Disponible en: <http://searchpdf.adobe.com/proxies/1/26/81/4.html>
2. Dulmage H, Correa J, Gallegos-Molares G. Potential for improved formulation of *Bti* through standarization and fermetation develoment. In: Bacterial Control of / mosquitoes and black files. Edit. Rutgers University. 1990.
3. Baddi, M., A. Flores y R. Quiroz. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey-México. pp: 40-47.
4. Bisset, J., M. Rodríguez y P. Fernández. 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del Municipio Playa, colectados durante la etapa intensiva contra el *aedes aegypti*. Med Trop. La Habana. Cuba. 56 (1): 61-66
5. Rodríguez, M., J. Bisset y P. Fernández. 2004. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. Rev. Cubana. Med Trop. La Habana. Cuba. 56 (1): 54-60.
6. Ventosilla, P., y J. Chauca. 2000. Instructivo para el control de calidad de bioinsecticidas bacterianos. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt. Universidad Cayetano Heredia. Perú. pp: 65-68
7. Longini, M. 2000. El primer bioinsecticida argentino. Disponible en:
8. <http://www.biodiversidadla/agro>
9. Jian, L., Y. Thirumaran y A. Porter. 1996. Efficient síntesis of mosquitocidal toxins in asticcacaulis excentricus demonstrates potential of gram negative bacteria in mosquito control. Nature Biotechnology; 14: 343-347.
10. Yang, X., y S. Wang. 2000. Phase-specific optimization of multiple endotoxin-proteins with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*. Biotechnol Appl Biochem; 3: 71-76.
11. World Health Organization. 1999. Microbial pest control agents *Bacillus thuringiensis*. WHO. Technical Report Series. N° 217.
12. Restrepo, N., D. Gutiérrez, M. Patirio, I. They, A. Delechuse y S. Orduz. 1997. Cloning expression and toxicity of a mosquitocidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* sub sp. Inst Oswaldo Cruz. 92(2): 125-128.
13. Robles, H. 1995. Optimización de la producción de bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis*. Tesis para optar el Grado de Maestro en Ciencias con mención en Microbiología Industrial y Biotecnología. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
14. Soto, N. 2003. Influencia de las aguas residuales de procesos de productos hidrobiológicos en la síntesis del bioinsecticida producido por *Bacillus thuringiensis* y su dosis letal sobre larvas de *Culex* sp "zancudo". Tesis para optar el Grado de Maestro en Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
15. Robles, H. y C. Lora. 1998. Sanguaza y levadura residual en la producción de bioinsecticidas por *Bacillus thuringiensis*. Libro de resúmenes del I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Perú.
16. *resto de referencias consultar con los autores