

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Formulación de medios de cultivo y su efecto en la
producción de esporas de *Bacillus thuringiensis*
var. *israelensis*. Huánuco, 2015.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por la:

Bach. ALDAZÁBAL ALARCÓN, Janeth Roxana

AYACUCHO – PERÚ

2016

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N° 136 – 2016 – UNSCH – FCB – D

Bach. Janeth Roxana ALDAZÁBAL ALARCÓN

En la ciudad de Ayacucho a los veinte y un días del mes de octubre del año dos mil dieciséis, siendo las cuatro de la tarde, reunidos en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, bajo la presidencia del Dr. Jesús De La Cruz Arango Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y los miembros del Jurado Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua (Miembro), Mg. Aurelio Carrasco Venegas (Miembro) y Blga. Sonia Haydeé Palomino Felices (Miembro - Asesora); actuando como secretario Docente el Blgo. César Justo Rodolfo Vargas; reunidos para recepcionar el trabajo de Tesis Titulada: "Formulación de medios de cultivo y su efecto en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Huánuco, 2015" presentado por la Bach. Janeth Roxana Aldazábal Alarcón. El presidente Dr. Jesús De La Cruz Arango, abrió el acto académico invitando al Secretario Docente se sirva verificar la documentación presentada, no habiendo inconvenientes, el Presidente invitó a la Bach. Janeth Roxana Aldazábal Alarcón a iniciar con su exposición y defensa de su trabajo, disponiendo para ello cuarenta y cinco minutos de tiempo de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Biológicas. Finalizada la exposición el Dr. Jesús De La Cruz Arango, abrió la estación de preguntas, aclaraciones y/o observaciones planteadas por los miembros del Jurado, invitando al Dr. Víctor H. Alegría Valeriano a iniciar con sus apreciaciones sobre el trabajo de investigación, seguido por el Mg. Fidel R. Mujica Lengua, Mg. Aurelio Carrasco Venegas y, Blga. Sonia H. Palomino Felices; el Dr. Jesús De La Cruz Arango Presidente del acto de sustentación y la asesora de Tesis quien hizo algunas aclaraciones a las observaciones e interrogantes planteados por los miembros del Jurado, aceptando las sugerencias y mejoras en la redacción final de la Tesis. Culminado la estación de preguntas y aclaraciones por parte de la sustentante en defensa de su trabajo de tesis, el Presidente del Jurado invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar temporalmente el auditorio para la deliberación de aprobación y calificación de la Tesis por los miembros del Jurado siendo los resultados los siguientes:

MIEMBRO DEL JURADO	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Fidel R. Mujica Lengua	18	18	18
Mg. Aurelio Carrasco Venegas	19	19	19
Blga. Sonia H. Palomino Felices	18	18	18
Dr. Víctor H. Alegría Valeriano	18	18	18
Promedio general			18

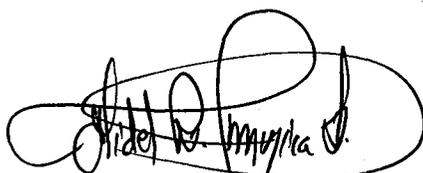
La sustentante obtuvo el promedio de dieciocho (18) aprobatorio, finalmente el Presidente invitó a la sustentante y al público asistente a reingresar al ambiente de sustentación de Tesis a fin de dar a conocer los resultados del proceso de evaluación, finalmente culminó el acto siendo las seis de la tarde.



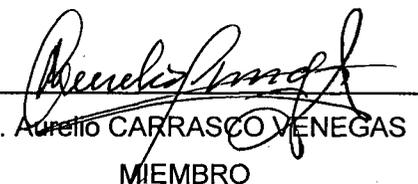
Dr. Jesús DE LA CRUZ ARANGO
PRESIDENTE



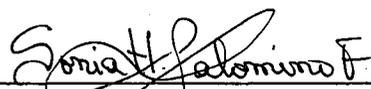
Dr. Víctor H. ALEGRIA VALERIANO
MIEMBRO



Mg. Fidel R. MUJICA LENGUA
MIEMBRO



Mg. Aurelio CARRASCO VENEGAS
MIEMBRO



Blga. Sonia H. PALOMINO FELICES
MIEMBRO – ASESORA



Blgo. César J. RODOLFO VARGAS
SECRETARIO DOCENTE

*A Dios por darme la vida
A mis padres, hermana y
familiares por su apoyo
incondicional.
A mis amigos.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas.

Al Gobierno Regional de Huánuco, Laboratorio de Biotecnología del Proyecto de Inversión Pública “Manejo Integrado de Simúlidos” por brindar sus instalaciones para la realización de esta investigación.

A la Blga. Sonia Haydeé Palomino Felices, por su dedicación, esfuerzo, paciencia y ejemplo como docente, persona y asesora del presente trabajo.

Al MD. MSc. René Gato Armas por el aporte brindado con sus conocimientos y experiencias en la elaboración y ejecución de esta investigación.

Al Blgo. Darlín Antonio Espinoza Farroñán por la colaboración brindada durante la ejecución experimental de la presente investigación.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón por la colaboración en el análisis estadístico de esta investigación.

A mi hermana Mirian por ser el ejemplo a lo largo de mi vida.

A mis amigos Ronald, Juan Carlos, Antonio, Deysi y Judith por su amistad.

A las personas que colaboraron y compartieron sus experiencias durante el desarrollo de este trabajo, a todos ellos; muchas gracias.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCION	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Control biológico	5
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.4. Simúlidos	15
III. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. Ubicación de la zona de estudio	19
3.2. Ubicación geográfica	19
3.3. Muestra biológica	19
3.4. Metodología	19
3.5. Análisis de datos	23
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSION	33
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición nutricional de <i>Solanum tuberosum tuberosum</i> “papa blanca”	10
Tabla 2. Composición nutricional de la fécula de maíz	10
Tabla 3. Composición nutricional de la levadura de cerveza deshidratada	11
Tabla 4. Fases de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco - 2015	25
Tabla 5. Cinética de crecimiento en la fase exponencial durante el proceso de fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco – 2015	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	15
Figura 2. Tasa de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco – 2015	27
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en los medios de cultivo con sustratos no convencionales durante las 72 h de fermentación. Huánuco - 2015	28
Figura 4. Comparación de la concentración de esporas (esp/ml) de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en cinco medios de cultivo obtenidas durante las 72 h de fermentación aplicando la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). Huánuco - 2015	29
Figura 5. Comparación del pH a las 72 h de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en cinco medios de cultivo aplicando la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). Huánuco – 2015	30
Figura 6. Tendencia del pH durante el crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco – 2015	31

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Preparación de colorantes y tinción de esporas	46
Anexo 2. Conteo directo por el Método de Breed	47
Anexo 3. Análisis de Varianza de la concentración final de esporas (esp/ml) de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente	49
Anexo 4. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) de la concentración final de esporas (esp/ml) de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente	50
Anexo 5. Análisis de Varianza del pH final de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente	51
Anexo 6. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) del pH final de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente	52
Anexo 7. Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en el medio de cultivo 1 (P)	53
Anexo 8. Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en el medio de cultivo 2 (PS)	54
Anexo 9. Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en el medio de cultivo 3 (ML)	55
Anexo 10. Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en el medio de cultivo 4 (MLS)	56
Anexo 11. Recuento de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en el medio de cultivo 5 (CN)	57
Anexo 12. Determinación del pH del medio de cultivo 1 (P)	58
Anexo 13. Determinación del pH del medio de cultivo 2 (PS)	58
Anexo 14. Determinación del pH del medio de cultivo 3 (ML)	58
Anexo 15. Determinación del pH del medio de cultivo 3 (MLS)	58
Anexo 16. Determinación del pH del medio de cultivo 5 (CN)	58
Anexo 17. Flujograma del proceso de fermentación de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	59
Anexo 18. Observaciones microscópicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	60
Anexo 19. Matriz de consistencia	65

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Proyecto de Inversión Pública “Manejo Integrado de Simúlidos en la ciudad de Huánuco y Alrededores” dependiente del Gobierno Regional de Huánuco; tuvo como objetivo, formular medios de cultivo líquido y determinar su efecto en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para usarlo como biocida en el control biológico de simúlidos. La cepa utilizada fue donada por el Instituto Pedro Kourí de La Habana, Cuba. Se realizaron cuatro formulaciones en base a sustratos no convencionales; el medio P, formulado con extracto de papa; el medio PS, formulado con extracto de papa y sales minerales; el medio ML, formulado con fécula de maíz y levadura de cerveza deshidratada; el medio MLS, con fécula de maíz, levadura de cerveza deshidratada y sales minerales; y el medio de cultivo control CN, Caldo Nutritivo. Se realizaron las fermentaciones con tres repeticiones por 72 h. Luego se cuantificó cada seis h, el número de esporas mediante el Método de Breed, con los datos obtenidos se determinó las diferentes fases de desarrollo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, la cinética de crecimiento alcanzando mayor tasa de crecimiento respecto al control con los medios de cultivo MLS y ML de 0,41 y 0,37; y se realizó las curvas de crecimiento. Utilizando análisis de varianza y prueba de Tukey al 5% de significancia se determinó que a las 72 h de fermentación el medio MLS no difiere significativamente con el medio control CN, obteniendo una concentración final de esporas de $4,5 \times 10^9$ Esp/ml con el medio control CN y de $4,3 \times 10^9$ Esp/ml con el medio MLS; mientras que los medios ML, P y PS si difieren significativamente con el medio control con valores menores; así mismo se encontró que la presencia de las sales minerales en los medios de cultivo influyen en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, pues los medios MLS y PS difieren significativamente con los medios ML y P; también se determinó la tendencia del pH durante el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo, las formulaciones MLS y ML permanecen dentro de los niveles máximos y mínimos permisibles respecto al pH.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, medios de cultivo, fermentaciones, bioformulaciones.

ABSTRACT

The present research was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Public Investment Project "Integrated Management of Simulids in the city of Huánuco and Surroundings" dependent of the Regional Government of Huánuco; aimed to formulate liquid culture media and determine its effect on the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use as a biocide in the biological control of simulids. The strain used was donated by the Pedro Kourí Institute of Havana, Cuba. Four formulations were made based on unconventional substrates; The P medium, formulated with potato extract; the PS medium, formulated with potato extract and mineral salts; ML medium, formulated with corn starch and dehydrated brewer's yeast; MLS medium, with corn starch, dehydrated brewer's yeast and mineral salts; and CN control medium, Nutrient Broth. Fermentations were performed with three replicates for 72 h. Then, the number of spores was quantified every six hours using the Breed Method, with the data obtained, were determined the different stages of development of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; the kinetics of growth, reaching a higher rate of growth compared to the control with the culture media MLS and ML of 0.41 and 0.37; and growth curves were performed. Using analysis of variance and Tukey test at 5% significance it was determined that at 72 h of fermentation fermentation the MLS medium did not differ significantly with the CN control medium, obtaining a final spore concentration of $4,5 \times 10^9$ Esp/ml with the CN control medium and $4,3 \times 10^9$ Esp/ml with the MLS medium; while the ML, P and PS if they differ significantly with the control medium with lower values; it was also found that the presence of mineral salts in the culture media influenced the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*;, since the MLS and PS media differ significantly with the ML and P media; also, it was determined the pH tendency during growth of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in culture media, the MLS and ML formulations remain within the maximum and minimum levels permissible with regard to pH.

Key words: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, culture media, fermentation, bioformulations.

I. 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 agrícolas¹. Actualmente la población de la ciudad de Huánuco y sus alrededores está siendo afectada por los simúlidos; que en los últimos años se han presentado en densidades elevadas causando efectos nocivos en la salud de las personas y de los animales⁵².

En la actualidad la forma más eficaz de controlar los insectos plaga se basa en la aplicación de pesticidas químicos, cuyo uso irracional es la principal causa de contaminación ambiental, con la disminución de la biodiversidad y la emergencia de insectos resistentes a los pesticidas, provocando el desequilibrio en los nichos ecológicos².

Una alternativa para solucionar el problema de resistencia de los insectos plaga a los pesticidas, es el control biológico. En este contexto, el control biológico se refiere a la utilización de entomopatógenos como una alternativa de menor impacto ecológico³.

Actualmente los bioinsecticidas que están siendo utilizados para el control biológico de mosquitos están compuestos por microorganismos con capacidad de producir sustancias biocidas contra mosquitos. Los entomopatógenos más utilizados son: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus sphaericus*. Estas bacterias tienen alto grado de especificidad contra insectos y seguridad para el medio ambiente, características que las hacen apropiadas para ser usadas contra larvas de mosquitos; sin embargo en los últimos años se han reportado de insectos que han desarrollado resistencia a las toxinas de *Bacillus sphaericus*, aunque no se ha descrito resistencia a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*⁴.

El producto comercial conteniendo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), es el de mayor difusión y uso a nivel internacional por su alta especificidad⁵. En vista de la alta demanda del entomopatógeno conteniendo esta bacteria; se pone en

consideración la necesidad de establecer investigaciones apoyadas en la biotecnología industrial, para optimizar el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* con la finalidad de mejorar la producción y cubrir la demanda del biocontrolador⁶. Sin embargo, no existe muchos reportes ni registros en la literatura nacional y regional sobre el uso y producción de *Bacillus thuringiensis*.

Las investigaciones de procesos biotecnológicos de fermentación y producción de *Bacillus thuringiensis* en cantidades industriales se han realizado en muchos países; sin embargo en el mercado peruano ha sido limitado, siendo así un factor restrictivo para que este producto no se encuentre a disposición de la población e instituciones.

Las formulaciones hechas en base a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* tienen algunos inconvenientes, su fermentación requiere medios costosos⁷.

Esta investigación plantea una alternativa de reducción de costos en la producción para mejorar la calidad y eficacia de los programas existentes de control biológico; sirviendo como base científica para procesos de escalamiento en la producción industrial de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. En tal sentido se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo general

Producir esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en medios de cultivo no convencionales.

Objetivos específicos

- Formular medios de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.
- Evaluar la eficacia de los medios de cultivo en la formación de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El uso de *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos se inició en los años 30 contra el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis*. El primer producto comercial se fabricó 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 en forma masiva en varios países. En la actualidad, se conocen más de 100 formulaciones en el mercado mundial, usando alrededor de 10 000 toneladas anualmente para el control de insectos plaga, siendo Dipel la marca más utilizada⁸.

Se estandarizó un medio de cultivo utilizando la infusión de espárrago (*Asparagus officinalis*) para la producción masiva de *Bacillus thuringiensis* (Bti) H-14 var. *israelensis* y determinaron el efecto biolarvicida sobre *Anopheles sp* en la región de Loreto. La composición del medio de cultivo tenía 100 mL de la infusión de espárrago a pH 9, el cual sirvió para la producción del Bti para ser usado como controlador biológico de larvas de *Anopheles* a nivel de laboratorio y campo⁹.

Se formuló medios de fermentación para la producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, donde se obtuvieron mejores resultados con los bioformulados de papa y sacarosa sobre el medio sintético Luria – Bertani¹⁰.

Se realizó un estudio para mejorar la producción del bioinsecticida *Bacillus thuringiensis* por cultivo feed-batch usando un medio de bajo costo. Utilizando 7 diferentes medios de cultivo se concluyó que el medio de cultivo con melaza y extracto de levadura influye mejor en la producción de *Bacillus thuringiensis*, así mismo se determinó que el uso de estos sustratos no convencionales a escala industrial, resultan más económicos¹¹.

Se desarrolló un proceso biotecnológico de bajo costo para la producción de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* destinado para el control

biológico de *Aedes aegypti*, siendo el medio de cultivo con harina de soya y caña de azúcar el que tuvo mejor resultado en la producción de endotoxinas, respecto al medio control Luria - Bertani¹².

Se formuló un medio de cultivo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, donde al final de la fermentación se obtuvo concentraciones altas con el medio de cultivo compuesto por: KH_2PO_4 1,25g; CaCO_3 0,5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,000055g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,014g; $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,015g; Harina de soya 3,0g; Glucosa 2,5g; Puré de tomate 20g¹³.

Se realizó la producción del biopesticida de *Bacillus thuringiensis* usando el medio comercial Luria – Bertani; y sub-productos de la agricultura (harina de soya y estiércol de cerdo) como fuente de nutrientes, obteniendo mejor resultados con los sustratos no convencionales sobre el medio sintético¹⁴.

Se desarrolló un proceso para la producción de cristales paraesporales de *Bacillus thuringiensis*, variando la fuente de carbono en el caldo de cultivo con: glucosa, melaza de caña, sacarosa y miel de maíz. También trabajó a diferentes concentraciones de inóculo inicial. Los resultados demostraron que la concentración del inóculo y la interacción entre este parámetro y el tipo de fuente de carbono en el medio de cultivo no tuvieron efecto significativo sobre la producción de cristales paraesporales. Sin embargo, el medio de cultivo suplementado con melaza de caña resultó ser más efectivo en la producción de cristales paraesporales ($9,77 \times 10^9$ UFC/mL)¹⁵.

Se realizó una investigación sobre los requerimientos nutricionales de *Bacillus thuringiensis* durante las diferentes fases de crecimiento, esporulación y germinación, siendo evaluado por el método de Plackett – Burman, logrando la formulación adecuada del medio de cultivo: glucosa 5g/L, glicerol 1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L, licor de maíz fermentado 2ml/L, extracto de levadura 1g/L, caseína hidrolizada 1g/L, CaCl_2 20 mg/L, MgSO_4 50 mg/L, MnSO_4 100mg/L, FeSO_4 0 mg/L¹⁶.

Se desarrolló un trabajo de investigación en la composición del medio de cultivo para la producción de toxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y controlar a los mosquitos. Utilizaron plumas de pollo, agua de coco suplementado con MnCl_2 , los resultados fueron comparados con los obtenidos en el medio Luria – Bertani, obteniéndose mayores valores con los sustratos no convencionales¹⁷.

Asimismo, se realizó una evaluación de diferentes medios de cultivo para el mejoramiento en la producción de bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis*

nativos, en este estudio se usaron sustratos como: extracto de flores, puré de plátano, harina de soya, remolacha y arvejas, siendo el medio más influyente el medio de cultivo, suplementado con harina de soya, con el cual se obtuvo mayor producción de endotoxinas de Bt¹⁸.

2.2. Control biológico

El control biológico puede definirse como el control de plagas por el uso directo o indirecto de enemigos naturales, depredadores y patógenos; es el uso de poblaciones de un organismo para controlar otro¹⁹. Se considera entonces como una aplicación natural, cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre; y es artificial o aplicado cuando, de alguna manera, es afectado o manipulado por el hombre¹³.

Los agentes microbianos utilizados para el control biológico son organismos que se encuentran en la naturaleza como: virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos²⁰.

Actualmente se han descrito alrededor de 300 bacterias entomopatógenas, la más importante desde el punto de vista comercial pertenece al género *Bacillus*. Cuatro especies de este género han sido estudiados como insecticidas microbianos: *Bacillus popilliae*, *Bacillus moritai*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* (Bt); este último representa el entomopatógeno de mayor producción en el mundo, debido a su rápida acción y a la posibilidad de producirlo *in vitro* en forma industrial. Las células esporuladas y cristales de Bt pueden producirse con métodos convencionales haciéndolas competitivas en costo con relación a los insecticidas químicos²¹.

2.3. *Bacillus thuringiensis*

2.3.1. Descripción

A. Contexto histórico

El primer aislamiento de Bt fue a partir de orugas enfermas del gusano de seda (*Bombix mori*), en el año de 1901 por el japonés Ishiwata. Posteriormente en 1915 el alemán Berliner, aisló de la misma manera esta bacteria a partir de las larvas de la palomilla de harina del mediterráneo (*Anagasta kuehnila*), a la que denominó *Bacillus thuringiensis* por Thuringia, región Alemana²².

El primer producto comercial llamado Sporeine apareció en 1938 y fue de origen Francés, se comercializó por primera vez en Estados Unidos en el año de 1957 con el nombre de Thuricide. Desde entonces se ha desarrollado la producción de forma masiva en varios países²⁰.

La serovariedad más tóxica fue descubierta en 1970 por Dulmage en Estados Unidos a partir de larvas enfermas de lepidópteros, se la llamó Bt serovar *kurstaki*²³.

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* fue aislado por primera vez por Goldberg y Margalit en 1977 de sedimento de lagunas, mostrando una considerable actividad larvicida contra especies de mosquitos. Posteriormente, Barjac en 1978, reconoció a este patógeno como un nuevo serotipo (H-14) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)²⁴.

En los años 80 se descubrieron cepas activas contra coleópteros como: Bt serovar *morrison*, *tenebrosis* y *san diego*. Sin embargo las serovariedades de importancia industrial han sido *morrison*, *kurstaki* e *israelensis*. Hasta el momento se ha descrito 83 serovariedades distintas según su antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con nuevas actividades biológicas²².

B. Hábitat

Muchas subespecies de Bt han sido aisladas de insectos muertos o moribundos, pertenecientes a los órdenes Coleóptera, Lepidóptera y Díptera; pero también del suelo, superficies foliares y otros hábitats. Las esporas de esta bacteria pueden permanecer latentes por años, si estas encuentran un ambiente propicio como un medio de cultivo, la espora generará células vegetativas²⁵.

Poco se sabe sobre el hábitat natural de Bt, sin embargo, dado su requerimiento vitamínico y de algunos aminoácidos como glutámico, así como a su actividad bioinsecticida, se piensa que la forma de vida vegetativa sólo se presenta en el interior de insectos que infecta hasta que esporula y es liberada al medio ambiente donde permanece en forma de esporas, lo que explica su amplia distribución⁴.

C. Características generales de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*²⁶. Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora²⁷.

La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los

nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo. Bt se diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por tener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas. Está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios²⁸.

La endospora se desarrolla en un esporangio que consta de dos compartimentos celulares conocidos como la célula madre y la espora. Las proteínas insecticidas se acumulan en la célula madre durante la esporulación. El proceso de diferenciación consta de siete estadios, se acelera cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes. En el estadio I se inducen los genes que iniciarán la esporulación. Este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes. Sin embargo, a partir del estadio II de esporulación, el proceso es irreversible y continúa hasta finalizar con la formación de la espora. En el estadio II, la bacteria forma un septo de división asimétrico. En el estadio III, se inicia la síntesis del cristal insecticida se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente (Bt1 y Bt2). El primero es activado por sigma E durante los estadios III y IV y el segundo por sigma K durante los estadios V y VI. Durante estos pasos se lleva conjuntamente la formación de la espora. Finalmente en el estadio VII se sintetizan enzimas líticas que liberan las esporas y los cristales insecticidas²⁷.

D. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. A la fecha se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes *cry* y 16 diferentes *cyt*. La primera clasificación de las δ -endotoxinas se basó en la especificidad de la actividad insecticida. En esta clasificación las toxinas Cry I eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros, las toxinas Cry II eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, actividad contra lepidópteros y dípteros, las toxinas Cry III eran proteínas activas contra insectos coleópteros; las toxinas Cry IV activas contra insectos dípteros y las Cry V y Cry VI activas hacia nemátodos, en donde el Cry VI era un grupo que no tenía homología con el grupo Cry V. Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era la adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy

semejantes, pero con especificidad diferente o toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, las cuales también las llamaron Cry V, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propició que se creara una nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas basadas exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria²⁹. En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es 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 proteínas Cry. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias como *Clostridium bifermentans* (clasificadas con Cry17A, Cry18A, y Cry19A con actividad hacia mosquitos)³⁰.

Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de Bti que muestren actividad hemolítica o tengan similitud con la secuencia de las toxinas Cyt. A la fecha las proteínas Cry están agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos⁴.

2.3.2. Metabolismo

Es una bacteria quimioheterótrofa, oxida aeróbicamente los carbohidratos convirtiéndolos en ácidos orgánicos. Esta especie bacteriana, durante su ciclo de vida, presenta tres fases: la fase de crecimiento exponencial (vegetativo), fase de transición y fase de esporulación³¹.

A. Fase de crecimiento exponencial (tropofase)

En esta fase las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 minutos dependiendo del medio de cultivo; utilizan para catabolizar sus carbohidratos una ruta glucolítica llamada Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), la cual representa el principal sistema de conversión de glucosa en metabolitos intermediarios como: piruvato, acetato polihidroxibutirato (PHB)³².

B. Fase de transición

Esta fase ocurre a la mitad de la fase exponencial o logarítmica; cuando la mitad de los azúcares han sido consumidos. Los metabolitos intermediarios (piruvato, acetato, PHB) producidos en la fase exponencial son catabolizados vía el ciclo tricarbóxico o ciclo de Krebs modificado para producir energía y CO₂²².

C. Fase de esporulación (idiofase)

En la fase estacionaria ante el estrés de la bacteria por la falta de nutrientes en el medio se da lugar a la fase de esporulación que es un programa de

diferenciación de bacteria a espora, además en esta fase comienza la formación del cristal paraesporal³³.

2.3.3. Requerimientos nutricionales

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 cristal³. El medio de cultivo empleado debe contener: una fuente de carbono que suministra la energía para los procesos anabólicos, una fuente de nitrógeno de origen orgánico e inorgánico, y sales minerales para el crecimiento, esporulación y síntesis de las endotoxinas³⁴.

Como fuentes de carbono se emplean: glucosa, fructosa, almidones y melazas; la ausencia de carbohidratos metabolizables causa una defectuosa esporulación y formación de la protoxina. En el caso de fuentes de nitrógeno, se ha reportado, que este microorganismo requiere de aminoácidos esenciales y otras formas orgánicas de nitrógeno las cuales pueden ser: harina de maíz, trigo, pescado y soya, extracto de levadura y caseína³².

Los microelementos que deben adicionarse en los medios de cultivo son: calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio²⁵. En un proceso aeróbico como en el caso de Bt el oxígeno es el sustrato clave y debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas, la transferencia continua de oxígeno de la fase gas a líquido para mantener el metabolismo oxidativo de las células es decisiva³⁵.

En un reporte, resultado de una reunión de la OMS, celebrada en Ginebra, Suiza, en la que se delinearon las bases para la producción de Bti en países en desarrollo, señalaron algunos ejemplos de medios potenciales baratos, disponibles para la producción de endotoxinas de Bti, que fueron: agua de coco, suero de leche, melazas, líquido de remojo de maíz, entre los líquidos, y harinas de: chícharo, garbanzo, soya, haba, maíz. Tubérculos como: papa, desechos de bebidas como levadura seca, levadura húmeda y materiales de origen animal como harina de pescado y harina de sangre³⁶.

Los parámetros de la fermentación y producción de toxinas son particularmente importantes para el rendimiento óptimo del producto. La evaluación de los diversos sustratos es también un factor importante, incluyendo la explotación potencial de los productos agrícolas y los residuos agroindustriales³⁷.

Diversos investigadores han explorado alternativas en la formulación de varios medios de cultivo menos costoso para la producción del biopesticida Bti. A menudo disponibles localmente, se han utilizado y demostrado sustratos costo-

efectivos para lograr resultados comparables o mejores que los obtenidos utilizando un medio onvencional.

A. Nutrientes de *Solanum tuberosum* "papa"

La papa es una fuente de vitaminas y minerales, usualmente usado como sustrato para procesos fermentativos para la producción u obtención de diferentes productos. Su composición nutricional según Instituto Nacional de Salud, es la siguiente:

Tabla 1. Composición nutricional de *Solanum tuberosum tuberosum* "papa blanca".

Nutrientes	Composición/100 g de papa	
Hierro	0,50	mg
Fósforo	47	mg
Zinc	0,29	mg
Carbohidratos	22,3	g
Fibra	0,6	g
Grasa	0,1	g
Proteínas	2,1	g
Vitamina C	14	mg
Riboflavina	0,09	mg
Tiamina	0,09	mg
Niacina	1,67	mg

Fuente: Centro Nacional de Alimentación y Nutrición del Instituto Nacional de Salud³⁸

B. Nutrientes de la Fécula de maíz

La fécula de maíz es un alimento rico en carbohidratos ya que 100 g de este alimento contienen 88 g de carbohidratos. Entre las propiedades nutricionales de la fécula de maíz cabe destacar que tiene los siguientes nutrientes³⁹:

Tabla 2. Composición nutricional de la fécula de maíz.

Nutrientes	Composición/100 g.	
Carbohidratos	88	g
Hierro	0, 50	mg
Proteínas	0,41	g
Calcio	1	mg
Potasio	7	mg
Yodo	2,50	mg

Zinc	0,30	mg
Magnesio	2	mg
Sodio	3	mg
Vitamina B2	0,01	mg
Vitamina B3	0,03	mg
Vitamina B6	0,01	mg
Vitamina B9	1	ug
Vitamina K	1	ug
Fósforo	30	mg

Fuente: URL³⁹

C. Nutrientes de la levadura de cerveza deshidratada

La levadura de cerveza es hongo unicelular (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utiliza para la fermentación de malta y otros azúcares simples. También se cultiva para ser usado como suplemento dietético, pasando por un proceso de secado a altas temperaturas. La levadura de cerveza que se usa como suplemento se obtiene como un subproducto a partir de la fermentación alcohólica o se cultiva con la finalidad de utilizarla por sus propiedades nutricionales, entre ellas su elevada cantidad de proteínas, superior al germen de trigo, al de soja e incluso superior al contenido en proteínas de la carne de ternera⁴⁰.

Tabla 3. Composición nutricional de la levadura de cerveza deshidratada.

Nutrientes	Composición/100 g de levadura deshidratada	
Proteínas	48	g
Carbohidratos	36	g
Vitamina B1	300	mg
Vitamina B2	680	mg
Vitamina B6	400	mg
Ácido pantoténico	2,8	g
Fósforo	14,85	g
Calcio	5,4	g
Potasio	20,5	g
Hierro	2	g
Cromo	20	mcg

Fuente: URL⁴⁰

2.3.4. Condiciones de crecimiento

Bacillus thuringiensis crece en gran variedad de medios comunes, siendo el caldo nutritivo y el Luria Bertani (LB) los más utilizados⁴¹.

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. A menos de 20°C se produce una disminución en la velocidad de crecimiento de la bacteria⁴².

El pH es un parámetro importante por lo que es necesario ajustar en los medios de cultivo en un valor mayor a 5,0. El crecimiento se favorece en un pH entre 5,6 y 8,5³². 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 8,0⁴³. El pH óptimo de crecimiento está comprendido entre 6,5 y 7,5⁴¹.

2.3.5. Detección y medida del crecimiento

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos; los principales son: recuento directo, medida de la masa de las células, recuento de viables, medida del número de partículas, medida de parámetros bioquímicos y medida de la actividad metabólica.

- Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan las cámaras de Petroff-Hausser y Cámara de Neubauer.
- Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez permite monitorizar el crecimiento microbiano.
- Recuento de viables: consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para determinar el número de células viables para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 UFC. En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden colectar por filtración a través de una membrana (de 0,2 µm de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

- Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.
- Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglucanos, etc. por unidad de volumen.
- Medida de la actividad metabólica: las bacterias al respirar producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran, como consecuencia del consumo de oxígeno (se usa colorantes sensibles a las reacciones de oxidación-reducción como por ejemplo, azul de metileno)⁴⁴.

A. Método de Breed

Es un método de recuento de células totales. Generalmente se utiliza para recuento de microorganismos en la leche. Este método consiste en dibujar con un lápiz un cuadrado de un centímetro cuadrado sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, se homogeniza la muestra problema y con una pipeta se coloca 0,01 ml de la muestra sobre el cuadrado y se extiende bien sin salirse de él. Se fija al calor suavemente, seguidamente se realiza la coloración correspondiente al tipo de muestra. Se cuenta el número de microorganismos en varios campos, no menos de 5. Se calcula el promedio de microorganismos contados y se multiplican por 3000 (área del campo microscópico) y por 100 (inversa del inóculo usado)⁴⁵.

$$N^{\circ} \text{células} / \text{ml} = X_{\text{células}} / \text{campo} \times 3000 \times 100$$

En tal sentido, según el tipo de microorganismo, tipo de sustrato usado, entre otros factores, se determina el método de cuantificación más accesible a la investigación.

2.3.6. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

A. Generalidades

Durante la esporulación, esta bacteria gram-positiva, produce cristales proteicos conocidos como cuerpos paraesporales constituidos por δ -endotoxinas²⁴. Bti produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4B y Cry11A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) con alta actividad insecticida contra larvas de diferentes especies de mosquitos y otros dípteros. Bti se ha ocupado por más de 30 años en el control de mosquitos y moscas transmisores de enfermedades como el dengue, la malaria y la oncocercosis sin que a la fecha se haya reportado la aparición de resistencia³³.

Los productos que contienen Bti son notablemente seguros, hasta ahora no se han registrado efectos dañinos en ensayos de seguridad con abejas, vertebrados y humanos⁴⁶.

B. Resistencia

Distintos estudios en diferentes laboratorios demostraron que la no aparición de insectos resistente a Bti se debe a la presencia de la toxina Cry1Aa. Se han podido aislar poblaciones de moscos resistentes a las toxinas Cry4A, Cry4B y Cry11A, o a las tres toxinas, sin embargo no se han podido aislar poblaciones resistentes a la toxina Cyt1Aa. Es más, las poblaciones de mosquitos resistentes a las toxinas Cry recuperan la sensibilidad a estas toxinas en presencia de cantidades subletales de Cyt1Aa. Por otra parte, se han demostrado que la toxina Cyt1A sinergiza la actividad insecticida de las otras toxinas Cry, es decir, la actividad tóxica de la mezcla de toxinas Cry con Cyt es mucho mayor que la suma de sus actividades individuales³³.

Las toxinas Cry y Cyt son toxinas formadoras de poro. Esto significa que para matar a su insecto blanco, las toxinas Cry y Cyt se insertan en la membrana de las células apicales del intestino formando un poro que permite el paso de iones y agua, provocando un desbalance osmótico y finalmente la lisis celular. Sin embargo, las toxinas Cry y Cyt tienen mecanismos diferentes para interactuar con la membrana. Es importante mencionar que el mecanismo más común de la resistencia a las toxinas Cry son mutaciones que afectan a los receptores proteínicos, lo que evita así la unión de la toxina a su membrana blanca. En cambio, las toxinas Cyt, formadas por un solo dominio estructural, no interaccionan con proteínas de membrana, si no que interaccionan directamente con lípidos específicos de la membrana de mosquitos formando el poro³³.

C. Mecanismo de acción

Investigación sobre la bioquímica de *Bti*, se reporta que el cristal no es tóxico en su totalidad, está dividido en regiones o subunidades de proteína, las cuales tienen actividad enzimática proteolítica similar a la tripsina del insecto. La ingestión de cristales y esporas por el insecto, revela una interacción entre el cristal y el intestino del hospedero⁴⁷; cuando un insecto susceptible los ingiere sus enzimas digestivas los hidrolizan en el ambiente alcalino de su intestino, lo que causa daño a las células epiteliales de la pared intestinal⁴⁸; estas células no responden uniformemente, las de tipo cuboide o columnas se deterioran a nivel de las microvellosidades y en la membrana celular, dilatación de la cisterna del

retículo endoplásmico rugoso y dispersión de los ribosomas, los núcleos no se afectan, sin embargo las mitocondrias se hinchan, los cambios fisiológicos son insuficientes para el transporte de iones y permeabilidad, se agota el ATP disponible, con cambios patológicos como: vacuolización celular, hinchamiento y lisis⁴⁶; así el insecto muere en menos de una hora o en varios días, depende de la dosis ingerida, cuando una larva consume cristales sin espora ocurre una secuencia idéntica de estos eventos, en consecuencia la parálisis y muerte del insecto, en donde las esporas son pasivas hasta que el pH disminuye a 7, lo que estimula su germinación, ya que las esporas sobreviven en casos específico, como en graneros lo cual provoca epizootia por la invasión masiva de *Bt* en el insecto⁴.

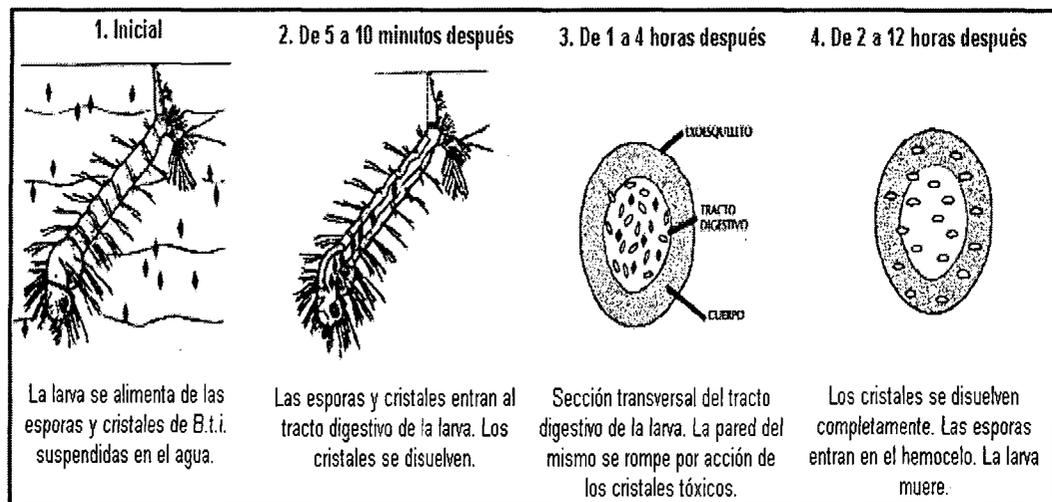


Figura 1. Modo de acción de *Bacillus thuringiensis*²⁵.

2.4. Simúlidos

2.4.1. Generalidades del simúlido

Los simúlidos son dípteros, han sido y son objeto de estudio en numerosos países de Europa y sobre todo América del Sur y África. El hecho de que sea en estos últimos donde más ímpetu se haya puesto en su estudio, se debe a la acción de los simúlidos como vectores de la oncocercosis o ceguera de los pantanos, enfermedad muy importante en estas zonas y a cuyo control dedica grandes esfuerzos la OMS. En Europa el estudio está algo más retrasado, y en concreto en España todavía no hay ningún estudio general de la familia. No obstante sí se cuenta con estudios parciales de gran calidad⁴⁹. El ciclo de vida de los simúlidos sigue cuatro fases de desarrollo fundamentales: huevo, larva,

pupa y adulto. El número de ciclos vitales por año puede ser variable, dependiendo de las variaciones climáticas y ambientales así como de las distintas especies. En este sentido se señala la existencia de especies univoltinas con un solo ciclo por año y otras que pueden dar varios al año⁵¹.

Desde hace mucho tiempo se conoce la implicación de los simúlidos en la transmisión de múltiples afecciones tanto del hombre como de los animales. Ya a finales del siglo XIX, afirmaban la implicación de los simúlidos en la transmisión de una dermatitis infecciosa causada por *Treponema carateum*. Más tarde, proponía como transmisores de la lepra al encontrar el *Mycobacterium leprae* en *Simulium pertinax* capturados en la proximidades de leproserías de Brasil⁵¹.

2.4.2. Problemática en la ciudad de Huánuco y alrededores

La ciudad de Huánuco se encuentra a una altitud de 1989 msnm, asentada en ambas márgenes del río Huallaga. Huánuco es una ciudad de paso obligado por los diversos servicios de transporte por encontrarse en la carretera de penetración a la región Tingo María. El río Huallaga forma un importante valle interandino entre las provincias de Ambo, Huánuco y Santa María del Valle. Según una encuesta realizada el 2007 es a partir de 1995 a la actualidad, que se ha incrementado la presencia del mosquito conocido como simúlido, en las ciudades de Huánuco, Amarilis, Pillcomarca y Santa María del Valle, en los meses de junio a noviembre, que coincide con la época de estiaje (menor caudal) del río Huallaga⁵².

Las grandes poblaciones de simúlidos parecen estar directamente relacionada con la incorporación creciente de desperdicios domésticos, agrícolas e industriales sobre el río Huallaga y sus afluentes. La especie predominante en el río Huallaga correspondería a *Simulium bicoloratum*. Sin embargo, este estudio no fue publicado y los resultados no son determinantes⁵³.

El río Huallaga por provenir de zonas montañosas cercanas posee alta velocidad de circulación, y en su lecho pedregoso se originan turbulencias con elevada oxigenación del agua, condiciones propicias para la cría de los simúlidos, un díptero que puede transmitir varias enfermedades (oncocercosis), y que representa además una fuerte molestia pública y serios efectos al ganado y otros animales⁵³.

En el área urbana, los pobladores muestran intolerancia por las picaduras del simúlido y se hace evidente en las diferentes actividades cotidianas que realizan. En el área rural, las picaduras del simúlido afectan tanto a los

pobladores en sus diferentes labores económicas (agricultura) y a la ganadería de subsistencia. En las encuestas y talleres participativos, se pudo conocer que la mayor proliferación de simúlidos, en la ciudad de Huánuco ocurrió en los años 2005 y 2006⁵².

Los simúlidos producen picaduras en el rostro y partes descubiertas del cuerpo, causando lesiones locales, dermatitis, prurito y heridas con eritema, por lo que algunos pobladores presentan fiebres y cefaleas. Los simúlidos se crían y multiplican en aguas con movimiento, desde aguas claras a turbias como es el río Huallaga y afluentes. Otro aspecto que es importante considerar es que estos mosquitos también atacan a los animales, existen registros sobre el deterioro de la salud animal principalmente ganado vacuno⁵³.

La Dirección Regional de Salud de Huánuco (DIRESA) a través de la Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental (DESA) durante muchos años ha sido la institución encargada de realizar el control de simúlidos, para ello se viene utilizando controladores químicos tanto para adultos (Alfa-Cipermetrina) y larvas (Temephos), complementando esto con el control físico y cultural, de esta manera reduciendo la densidad de simúlidos⁵².

El uso indiscriminado de insecticidas químicos ha deteriorado el ecosistema natural y eliminado a sus controladores biológicos naturales hasta llegar, a la dependencia del uso de estas sustancias químicas, por esta razón, el Gobierno Regional de Huánuco se vio en la obligación de buscar nuevas alternativas para controlar los simúlidos, al mismo tiempo sean inocuas para el hombre y el ambiente, aprobando el Proyecto de Inversión Pública “Manejo integrado de simúlidos en la ciudad de Huánuco y alrededores”, luego la implementación de un Laboratorio de Biotecnología, especializado en la producción de un bioinsecticida partir de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, para el control de larvas⁵².

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

Laboratorio de Biotecnología de Producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* del Gobierno Regional de Huánuco en convenio con la Universidad Nacional Hermilio Valdizán de Huánuco.

3.2. Ubicación geográfica

Región : Huánuco
Provincia : Huánuco
Distrito : Pillco Marca
Altitud : 1930 msnm
Latitud : 09°57'28"
Longitud : 76°14'57"
Superficie : 68,74 km²
T° promedio : 24°C

3.3. Muestra biológica

Cepa *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (A51) procedente del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Centro colaborador de OMS-OPS para el estudio y control biológico de vectores. La Habana. Cuba.

3.4. Metodología

3.4.1. Diseño metodológico de la investigación

Para la formulación de medios de cultivo y su efecto en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se realizó un estudio de tipo experimental con tres repeticiones para los tratamientos, siguiendo los lineamientos de un Diseño Completamente Aleatorio (DCA).

3.4.2. Cultivo y mantenimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* fue sometida a procesos de conservación de largo, mediano y corto plazo, este último sirvió para la preparación del inóculo inicial del proceso de fermentación.

A partir de la cepa madre de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se realizó siembras por agotamiento en placas de Petri conteniendo Agar Nutritivo, se incubaron a 30°C por 24 horas en una estufa marca "Binder". Posteriormente las colonias fueron evaluadas y se determinaron la pureza con una coloración de Gram y Azul de Coomassie. Una vez corroborada su pureza, las placas fueron sellados herméticamente con parafilm y almacenadas en refrigeración (8°C) hasta su uso.

3.4.3. Formulación y preparación de medios de cultivo

Para la formulación de los diferentes medios de cultivo se tuvo en cuenta los nutrientes mínimos requeridos por *Bacillus thuringiensis*²³; considerando que se necesitaba desarrollar para un proceso de escalamiento industrial, se tuvo en cuenta en la elección de los nutrientes, la fácil disponibilidad de ellos. Las variaciones realizadas en los diferentes medios de cultivo fueron: fuentes de carbono, papa y fécula de maíz; la presencia y ausencia de sales minerales; y como fuente de nitrógeno: levadura de cerveza deshidratada. Para el pesado de los diferentes componentes de cada medio de cultivo se utilizó una Balanza analítica marca "Sartorius".

a) Medio de cultivo 1 (P). Estuvo compuesto por extracto de papa (*Solanum tuberosum tuberosum*) variedad "papa blanca" a una concentración de 300 g/L.

• Pretratamiento del sustrato

Se peló el tubérculo y se cortó en trozos pequeños, se hirvió a temperatura de ebullición por 20 minutos, manteniendo la concentración de 300 g de papa por litro de agua destilada. Posteriormente se filtró con una gasa.

b) Medio de cultivo 2 (PS). Estuvo compuesto por los siguientes componentes:

- Medio cultivo 1 (extracto de papa) 300 g/L
- FeSO₄.7H₂O 0,05 g/L
- MgSO₄.7H₂O 0,03 g/ L
- MnSO₄.H₂O 0,02 g/L
- ZnSO₄.7H₂O 0,02 g/L
- CaCl₂.H₂O 0,01 g/L

c) Medio de cultivo 3 (ML). Compuesto por los siguientes componentes:

- Fécula de maíz (Marca Comercial DURYA) 2 g/L
- Levadura de cerveza deshidratada 8 g/L

d) Medio de cultivo 4 (MLS). Compuesto por los siguientes componentes:

- Fécula de maíz (Marca Comercial DURYA) 2 g/L
- Levadura de cerveza deshidratada 8 g/L
- FeSO₄.7H₂O 0,05g/L
- MgSO₄.7H₂O 0,03 g/ L
- MnSO₄.H₂O 0,02 g/L
- ZnSO₄.7H₂O 0,02 g/L
- CaCl₂.H₂O 0,01 g/L

e) Medio de cultivo 5 (CN). Estuvo compuesto por el Caldo Nutritivo como medio estándar:

- Peptona 5 g/L
- Extracto de levadura 3 g/L
- NaCl 5 g/L

3.4.4. Ajuste de pH

Cada medio de cultivo fue ajustado a pH 7,4 con NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N, antes de ser esterilizados. Para el cual se usó el Potenciómetro marca "Hanna".

3.4.5. Esterilización de los medios de cultivo

Se esterilizaron a 121°C por 15 Lb/pulg² de presión durante 15 minutos en una Autoclave vertical marca "Fravill", modelo "Avda".

3.4.6. Preparación de la concentración de inóculo

A partir de las placas conservadas con *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, se tomó como inóculo una asada y se cultivó en placas petri con Agar Nutritivo por el método de agotamiento en superficie, se incubó a 30°C durante 24 h en una estufa. A partir de estas, y una vez corroborada la homología de las colonias (pureza), se preparó un preinóculo del cultivo de Bti en un tubo de ensayo contenido de 5ml de Caldo Nutritivo el cual fue incubado a 30°C durante 12 h, el que sirvió como inóculo para ser usado en un matraz con 30 ml de Caldo Nutritivo en un 5% v/v del preinóculo para luego ser incubado a 30°C durante 2 h. En cada obtención de cultivo y antes de inocular los medios de cultivo se realizó una coloración Gram y Azul de Coomassie, para verificar la pureza del inóculo, posteriormente se realizó la determinación de la concentración del inóculo por el método de Breed.

3.4.7. Proceso de fermentación a nivel de laboratorio

- La fermentación se realizó en matraces de 300 ml de capacidad con 150 ml de medio de cultivo: 1, 2, 3, 4 y 5 con 3 repeticiones.

- Se inoculó 200 μ l la suspensión de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* con una concentración de 10^6 cel/ml (inóculo final).
- Las fermentaciones se llevaron a cabo en un Agitador marca "Rotator" durante 72 h bajo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura a 30 °C, agitación 200 RPM y pH 7,4 según la literatura¹⁰.

3.4.8. Determinación de la cinética de crecimiento y cuantificación de esporas.

Durante el transcurso de la fermentación se tomaron muestras en condiciones estériles cada 6 h durante 72 h para determinar: crecimiento microbiano y variación de pH.

A. Recuento celular

Los cultivos celulares fueron homogenizados y luego muestreados. El recuento se realizó por el método de Breed, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{esporas} - \text{celulas} / \text{ml} = X \times F.M \times 100 \times I.D$$

Dónde:

- X** : Promedio de células o esporas por campo microscópico
F.M : Factor microscópico, calculado según el área del campo
100 : Inverso del inóculo depositado en el portaobjeto (0,01 ml)
I.D : Inversa de la dilución (de ser el caso)

B. Determinación de la tasa de crecimiento

Con los valores obtenidos del recuento celular y esporas mediante el método de Breed, se determinó la tasa de crecimiento (K_e), las divisiones por hora (k), el tiempo de duplicación por hora (T_d) y el número de generaciones por hora (n), aplicando las siguientes fórmulas⁵⁴:

$$K_e = \frac{\ln(N_1/N_0)}{t_1 - t_0} \qquad k = \frac{K_e}{\ln 2}$$

$$T_d = \frac{1}{k} \qquad n = \frac{t}{T_d}$$

Dónde:

- N_0** : Concentración inicial del cultivo (cel/mL)
 N_1 : Concentración final del cultivo (esp/mL)
 t_0 : Tiempo inicial (horas)
 t_1 : Tiempo final (horas)
 $\ln 2$: 0,6931

C. Evaluación de la variación de pH

Las medidas se realizaron mediante un pHmetro marca "Hanna", el que fue calibrado previamente con tampón pH 4,1 y pH 7,1.

3.5. Análisis de datos

Para determinar el efecto de las diferentes formulaciones de medios de cultivo en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, se utilizó un análisis de varianza a fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al medio de cultivo usado como control, así mismo se realizó pruebas de comparación múltiple de Dunnet y el de Tukey. En estos análisis estadísticos el nivel de significancia fue del 0,05 empleando el programa Minitab versión 17.

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Fases de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco - 2015.

Medios de Cultivo	Fases		
	Exponencial (h)	Transición (h)	Estacionaria* (h)
Medio 1 (P)	0 – 24	18 – 48 (30)	24 – 72 (48)
Medio 2 (PS)	0 – 30	24 – 54 (30)	30 – 72 (42)
Medio 3 (ML)	0 – 30	24 – 54 (30)	30 – 72 (42)
Medio 4 (MLS)	0 – 42	30 – 54 (24)	42 – 72 (30)
Medio 5 (CN)	0 – 42	30 - 54 (24)	42 – 72 (30)

* Esporulaci3n.

D3nde:

P = Medio de cultivo compuesto por papa.

PS = Medio de cultivo compuesto por papa y sales minerales.

ML = Medio de cultivo compuesto por f3cula de ma3z y Levadura de cerveza deshidratada.

MLS = Medio de cultivo compuesto por f3cula de ma3z, levadura de cerveza deshidratada y sales minerales.

CN = Medio de cultivo control compuesto por Caldo Nutritivo.

Tabla 5. Cinética de crecimiento en la fase exponencial durante el proceso de fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco - 2015.

Medios de cultivo	Fase Exponencial (h)	Tasa de crecimiento K_e	Divisiones por hora K	Tiempo de duplicación T_d [hora ⁻¹]	Número de generaciones por hora
Medio 1 (P)	0 – 30	0,34	0,44	2,03	14,78
Medio 2 (PS)	0 – 30	0,37	0,53	1,90	15,79
Medio 3 (ML)	0 – 30	0,37	0,53	1,89	15,87
Medio 4 (MLS)	0 – 30	0,41	0,59	1,69	17,75
Medio 5 (CN)	0 – 30	0,41	0,60	1,68	17,86

Dónde:

P = Medio de cultivo compuesto por papa.

PS = Medio de cultivo compuesto por papa y sales minerales.

ML = Medio de cultivo compuesto por fécula de maíz y Levadura de cerveza deshidratada.

MLS = Medio de cultivo compuesto por fécula de maíz, levadura de cerveza deshidratada y sales minerales.

CN = Medio de cultivo control compuesto por Caldo Nutritivo

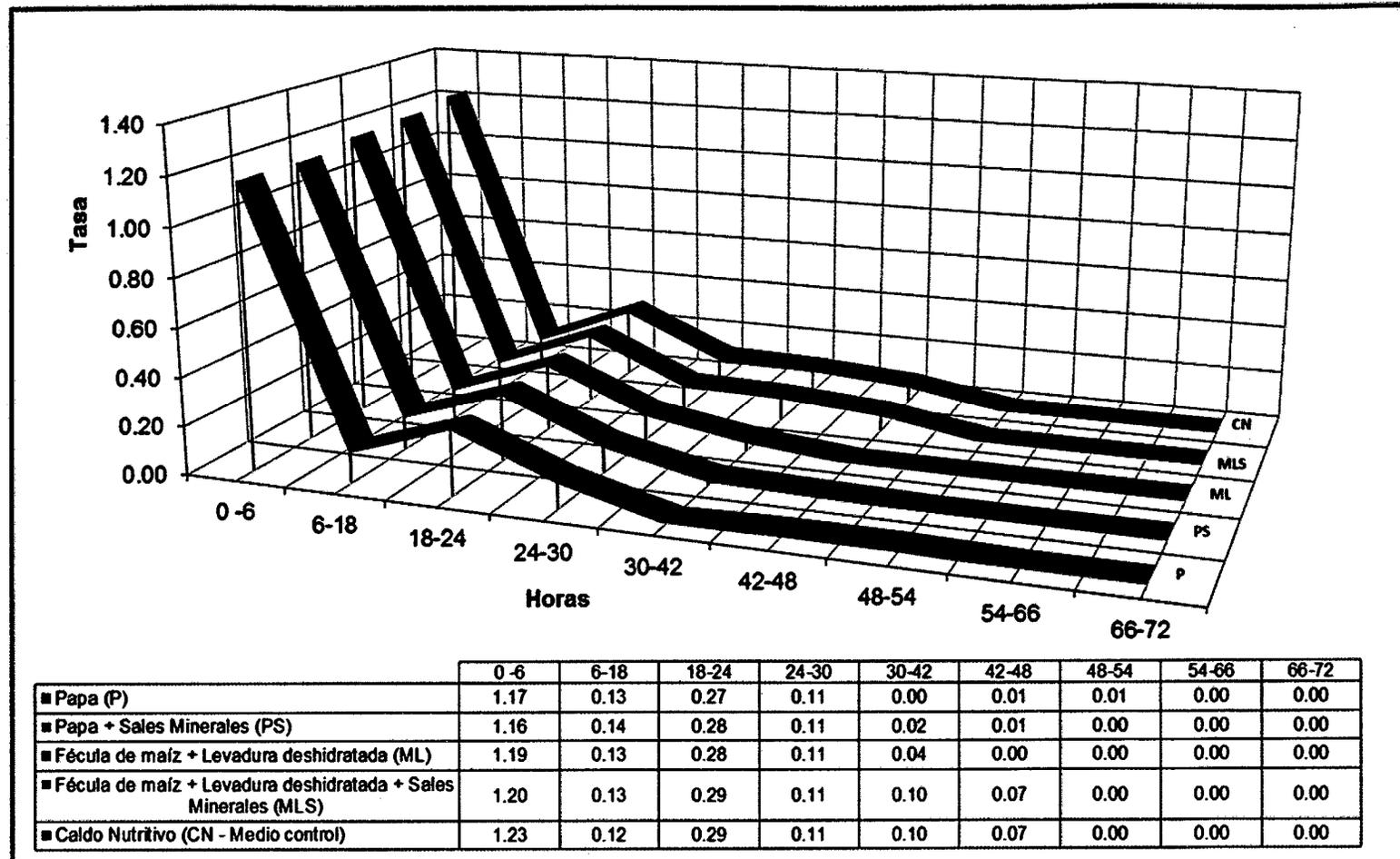


Figura 2. Tasas de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo con sustratos no convencionales, durante las 72 h de fermentación. Huánuco - 2015.

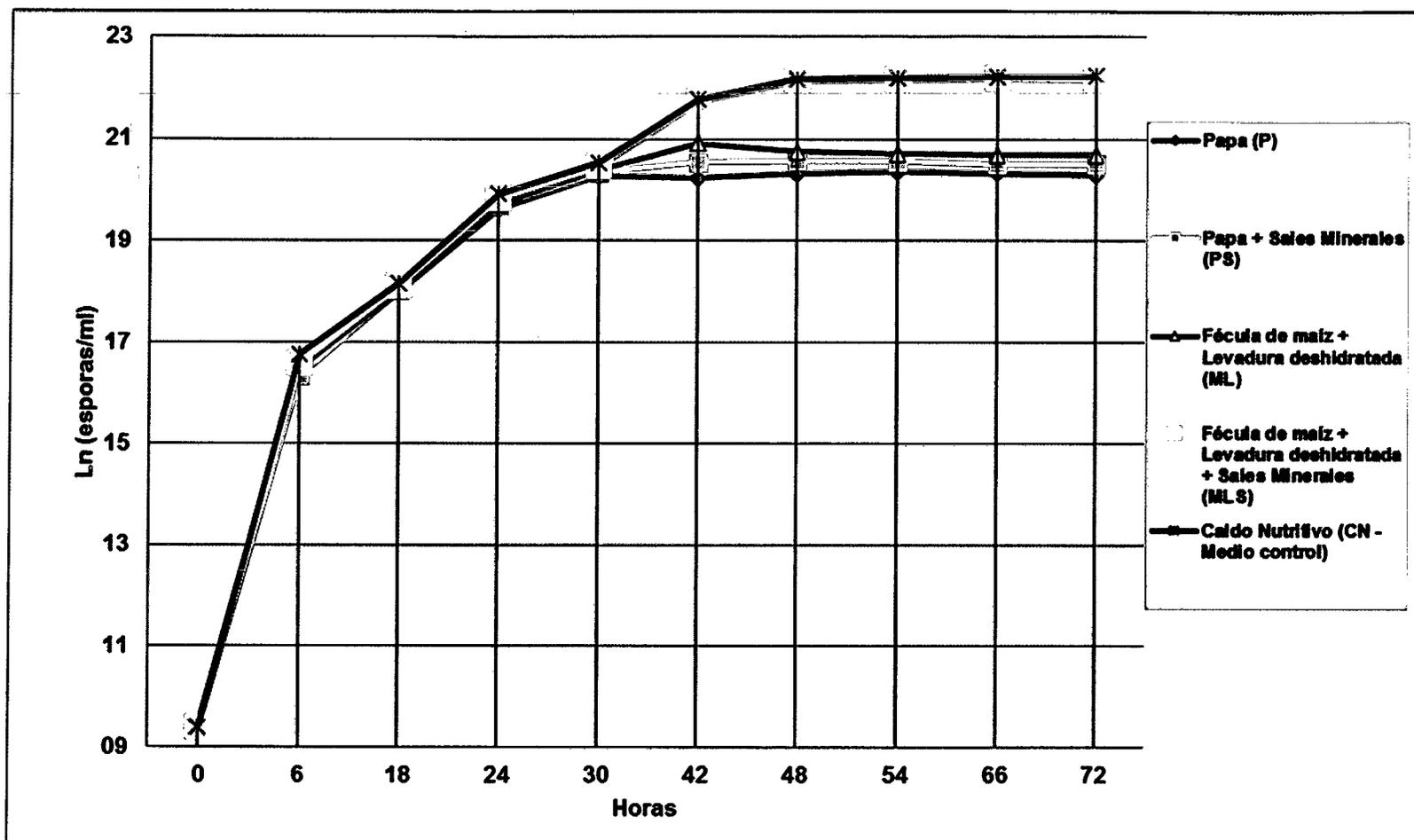


Figura 3. Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo con sustratos no convencionales, durante las 72 h de fermentación. Huánuco - 2015.

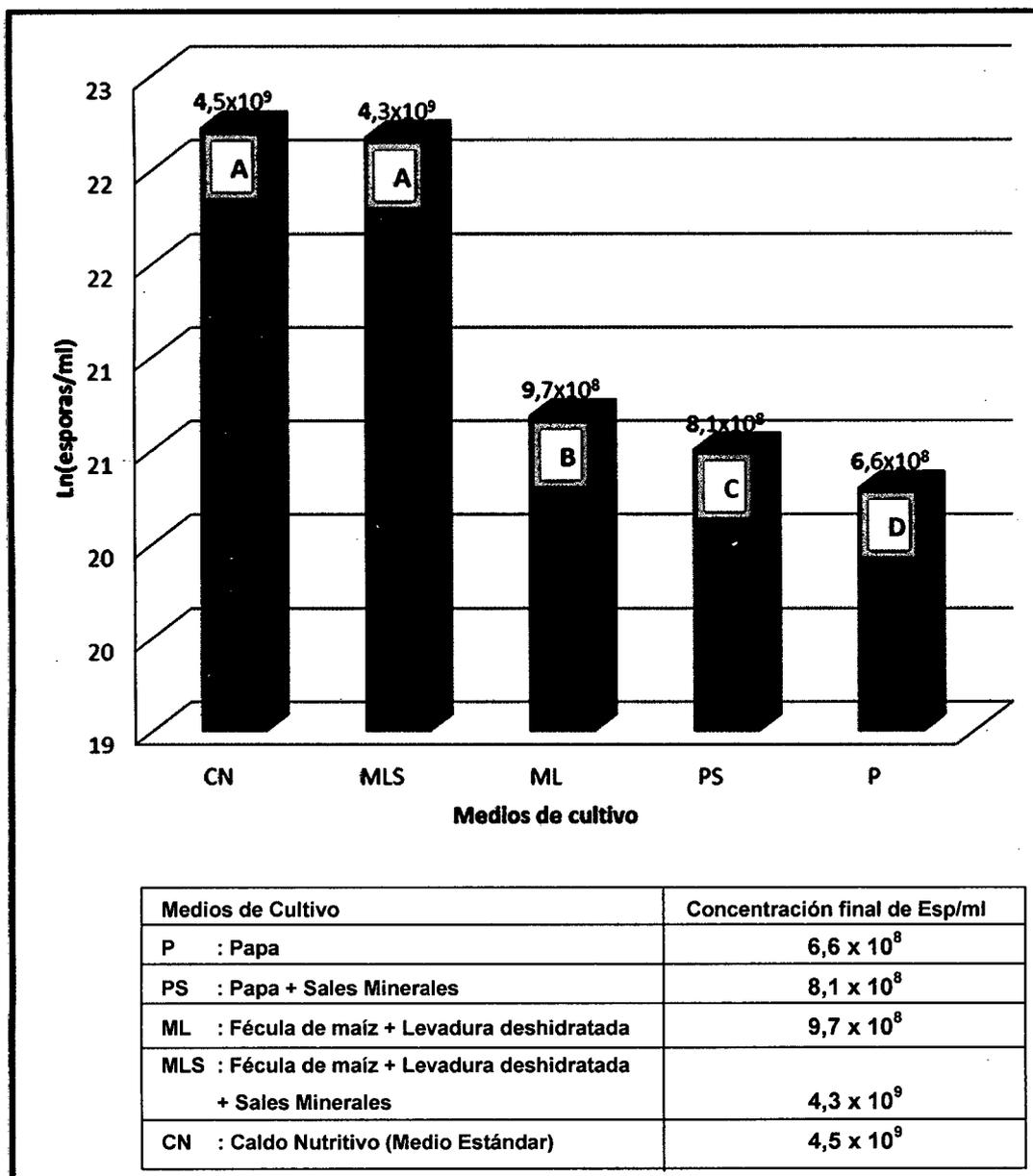


Figura 4. Comparación de la concentración de esporas (esp/ml) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en cinco medios de cultivo obtenidas durante las 72 h de fermentación, aplicando la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). Huánuco - 2015.

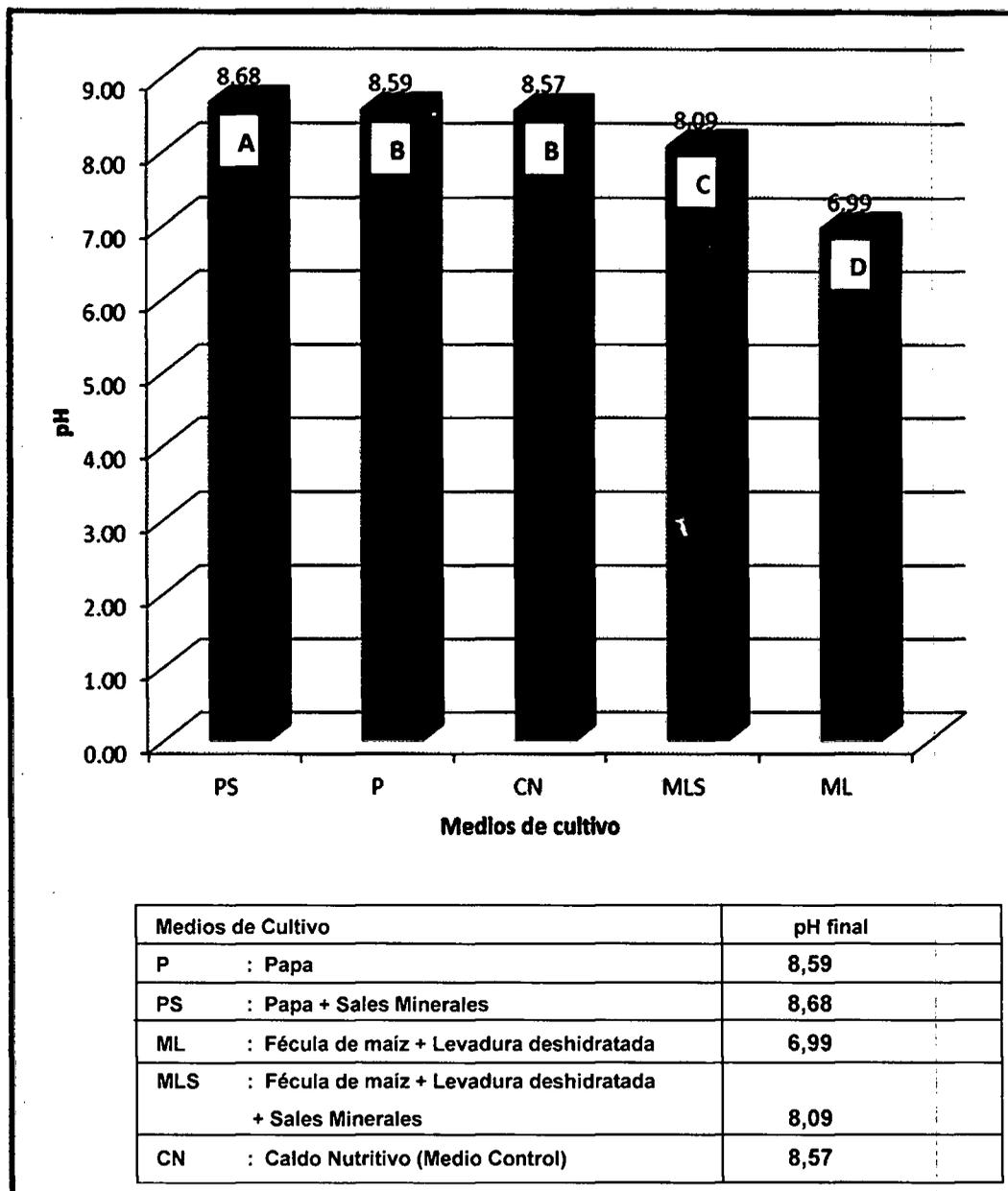


Figura 5. Comparación del pH a las 72 h de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en cinco medios de cultivo aplicando la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). Huánuco - 2015.

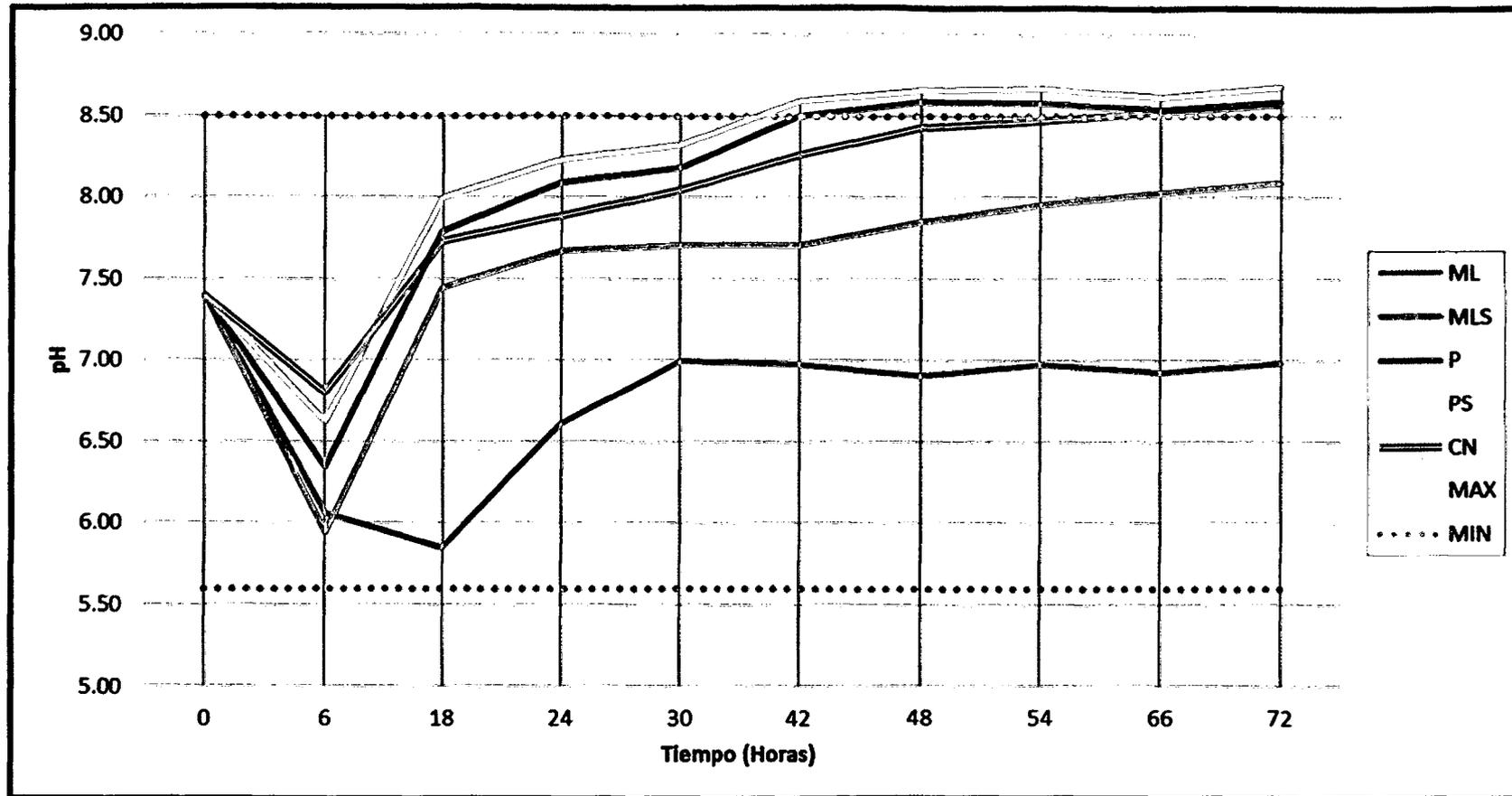


Figura 6. Tendencia del pH durante el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo con sustratos no convencionales. Huánuco - 2015.

V. DISCUSIÓN

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. Según los objetivos trazados y con los datos experimentales obtenidos respecto a los diferentes medios de cultivo se determinó la cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; donde se reconocieron y observaron las diferentes fases de crecimiento que presenta *Bacillus thuringiensis* durante su ciclo de vida²³. Se registró el crecimiento de Bt en las diferentes formulaciones de medio de cultivo, la tabla 4 muestra la comparación de tiempos de las diferentes fases de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* durante el crecimiento en los cinco medios de cultivo, no se registra una fase de adaptación pues la inoculación se realizó con células en fase logarítmica por lo que siguieron con su duplicación, la formulación MLS y el medio de cultivo control registran una fase de crecimiento más prolongada de 42 h, una fase de transición de 14 h y una fase estacionaria de 30 h; a diferencia de los medios de cultivo ML, P y PS, que presentan una fase logarítmica más corta. Se evaluó las tasas de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los cinco medios de cultivo, reportando un mayor valor el medio de cultivo MLS y CN (medio control) con una tasa de crecimiento de 0,41 durante su fase exponencial en 30 horas (Tabla 5). Asimismo en la figura 2 se muestra la variación de las tasas de crecimiento durante las 72 h de fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* presentando valores más prolongados los medios MLS y CN (medio control). La figura 3 nos muestra la curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los medios de cultivo con sustratos no convencionales durante las 72 h de fermentación, donde se observa un crecimiento homogéneo en los medios de cultivo MLS y CN, y por debajo de estos, los medios de cultivo MS, P y PS. En la figura 4 se muestra la concentración de esporas (esp/ml) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en

los medios de cultivo P, PS, ML, MLS y CN obtenidas a las 72 h de fermentación, en las que se obtuvo diferencia significativa mediante el análisis de varianza ($p = 0,000$; $\alpha = 0,05$). El bioformulado que presentó mayor crecimiento y producción de esporas respecto al medio control (CN), fue el medio de cultivo MLS formulado con fécula de maíz, levadura de cerveza deshidratada y sales minerales, obteniendo una concentración de esporas al final del crecimiento de $4,3 \times 10^9$ esp/ml, respecto a CN en el que se obtuvo $4,5 \times 10^9$, ambos no difieren significativamente (tukey, $p > 0,05$; $\alpha = 0,05$) mientras que en los bioformulados ML, PS y P se encontró diferencia significativa con concentraciones menores. Algunas investigaciones mencionan que este microorganismo necesita de una fuente de nitrógeno para un buen crecimiento microbiano³². En este caso el medio de cultivo MLS estuvo compuesto por fécula de maíz, como fuente de carbono; la levadura de cerveza deshidratada, como fuente de nitrógeno y sales minerales, llegando a completar todo el requerimiento nutricional de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, para su buen crecimiento y desarrollo. Los medios suplementados con las sales minerales influyeron en la concentración final de esporas, tal es así que el medio PS y MLS reportaron valores altos a diferencia de las formulaciones P y ML, presentando una diferencia significativa (Tukey, $p < 0,05$; $\alpha = 0,05$); tal reporte podría considerarse en estudios aplicados a la producción a gran escala de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, aun el análisis estadístico reporte la diferencia significativa entre PS y P, así también para ML y MLS, viendo los resultados a nivel de esp/mL podría considerarse el uso o no de las sales minerales en la producción a gran escala de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, esto por considerarse económicamente no rentable por el alto valor económico de estos medios comerciales. Algunos autores usaron en su estudio al medio de cultivo a base de "papa", en el cual registraron como el medio de cultivo que reportó una mayor densidad óptica respecto al medio control LB¹⁰, de esta manera podríamos concluir que respecto al uso de sustratos más económico y de fácil adquisición sería la "papa", pero el de fácil manipulación serían las formulaciones a base de fécula de maíz y levadura de cerveza deshidratada, los cuales cumplen con la mayor parte de los requerimientos nutricionales. La formulación ML a diferencia del medio P, contiene mayor cantidad de carbohidratos y proteínas, 88 % en carbohidratos de la fécula de maíz más el 36% de la levadura deshidratada y un promedio de 48 % en proteínas; la formulación a base de papa sólo cuenta con un 20% de

carbohidratos y aproximadamente 2% de proteínas, explicando de esta manera la alta concentración final de esporas.

Otro parámetro importante que se debe tener en cuenta en un proceso de fermentación es la variación del pH, la literatura menciona que el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se favorece en un pH entre 5,6 y 8,5³²; sin embargo otro autor consideraba que el pH óptimo de crecimiento está comprendido entre 6,5 y 7,5⁴¹. De esta manera para procesos fermentativos a gran escala, no conviene picos altos y bajos de variación durante el proceso, porque sería complicado mantener constante el proceso fermentativo.

La figura 5 muestra la comparación del pH final del fermentado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en las cuatro formulaciones y su control respectivamente, en el cual se encontraron diferencia significativa en el análisis de varianza ($p = 0,000$; $\alpha = 0,05$), en base a los resultados, la formulación que no difiere significativamente respecto al control es el medio de cultivo P (tukey, $p > 0,05$, $\alpha = 0,05$) con un pH de 8,59 cerca al control con un pH de 8,57 a las 72 h de fermentación. La determinación del pH de las formulaciones líquidas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* son determinantes para su respectiva evaluación y la comparación entre las mismas y su control; es importante monitorear continuamente el pH durante la fermentación, debido a que las desviaciones en el pH pueden ser el primer signo de un problema en la fermentación. La disminución del pH durante la fermentación es debido a que *Bacillus thuringiensis* produce y excreta ácidos a partir de glucosa y otras fuentes de carbono, los ácidos que producen son: ácido láctico, acetato, piruvato; los cuales pueden llegar a ser inhibidores del crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, las disminuciones del pH en la fermentación inhiben el crecimiento de la bacteria y de alguna manera influyen sobre la producción de la espora y el cristal insecticida³⁴, conforme avanza el tiempo de fermentación, el medio se alcaliniza, esto es debido a que existen más proteínas que carbohidratos en el caldo de fermentación, cuya degradación de las primeras favorece la alcalinización por la excreción de aminoácidos⁵⁵. En la figura 6 se muestra la tendencia de pH en el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, las formulaciones P y PS superan los niveles máximos pero respecto a los niveles mínimos reflejan valores cercanos al medio control; las formulaciones MLS y ML, muestran valores más constantes, los cuales a nivel de procesos fermentativos a gran escala son mucho más manejables. Algunos autores expresan que los patrones

de pH en las fermentaciones dependen principalmente del medio que está siendo usado y del microorganismo que está creciendo en él⁵⁵, es así que los niveles bajos de ML y MLS son a consecuencia por las concentraciones altas de carbohidratos en la fécula de maíz y la levadura de cerveza deshidratada.

De esta forma, por los resultados obtenidos en esta investigación, las formulaciones líquidas a base de fécula de maíz y levadura de cerveza deshidratada podrían ser consideradas alternativas costo-efectivas para la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a escala industrial, debido a su efecto en la concentración final de esporas los cuales teóricamente son equivalentes a la cantidad de cristales proteínicos. Además de reportar valores de pH que son más manejables para asegurar la viabilidad de los cristales.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ La tasa de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en cada una de las formulaciones y el control, respectivamente, fue de 0,41 para los medios de cultivo MLS y CN, seguido por los medios de cultivo ML y PS con 0,37; finalmente del medio de cultivo P con 0,34.
- ✓ La concentración final de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en los cuatro medios de cultivo con sustratos no convencionales y el medio control respectivamente fue de; $4,3 \times 10^9$ esp/ml con el medio MLS; $4,5 \times 10^9$ esp/ml con el medio control (CN), los cuales no difieren significativamente (Tukey, $p > 0,05$; $\alpha = 0,05$); por el contrario valores menores en los medios ML con $9,7 \times 10^8$ esp/ml, el medio PS con $8,1 \times 10^8$ esp/ml y finalmente el medio P con $6,6 \times 10^8$ esp/ml, a las 72 horas de fermentación.
- ✓ La presencia de las sales minerales en los medios de cultivo influyen en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, pues existe diferencia significativa ($p < 0,05$; $\alpha = 0,05$) en la concentración final de esporas entre los medios MLS y ML, de igual forma en los medios PS y P.
- ✓ El medio de cultivo que no muestra diferencia significativa en el pH es el medio de cultivo P respecto al medio control (CN) a las 72 horas de fermentación y el medio de cultivo que muestra un rango de pH que no varía respecto al pH neutro durante la fermentación es el medio de cultivo ML.
- ✓ El medio de cultivo MLS compuesto por fécula de maíz 2 g/L; levadura de cerveza deshidratada 8 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L; es el medio ideal para la fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por presentar una mayor concentración final de esporas al final de la fermentación.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones en escalamientos fermentativos, para incursionar más en el uso de bioinsecticidas y reducir el impacto de los insecticidas químicos.
2. Realizar investigaciones para determinar la actividad tóxica de los cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, en larvas de insectos más manejables respecto a la necesidad de oxígeno y turbulencia en los bioensayos *in vitro*.
3. Realizar nuevas investigaciones para comprobar la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, sobre insectos plaga que atacan diversos cultivos y sobre insectos agentes de transmisión de enfermedades.
4. Realizar aislamientos de *Bacillus thuringiensis* autóctonos que demuestren mayor actividad insecticida.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cranshaw W. Questions and answers about *Bacillus thuringiensis*. Colorado State University Cooperative Extension. 2007; 16:124-145.
2. Dulmage H, Correa J, Gallegos G. Bacterial Control of / mosquitoes and black flies. Rutgers University: Rightslink. 1990; 22(2):121-129.
3. Mercado M. Frutos de la investigación Corpoica Cinco Años. Santa Fe de Bogotá: Estudio 3 Gráficas LTDA. 2007.
4. Fernandez Avila C. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y su toxicidad contra tres poblaciones de *Aedes aegypti* [tesis doctoral]. Nuevo León – México: Servicio de publicaciones, Universidad de Nueva León; 2010.
5. Ventosilla P, Chauca J. Instructivo para el control de calidad de bioinsecticidas bacterianos. Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt" Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima: Delta; 2000.
6. Velez J, Aguirre J. Contribución a la optimización de biorreactores semidiscontinuos. Aplicación a la producción de *Bacillus thuringiensis*. Colombia: Elviron S.A; 2009.
7. Guevarra O, Armengol G, Crickmore N, Orduz S. Expresión de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* en *Asticcacaulis excentricus*, para el control de larvas acuáticas de dípteros de la familia Culicidae, vectores de enfermedades. Rev. Colombiana de Biotecnología. 2004; 6(1): 24-30.
8. Robles, H. Optimización de la producción de bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis*. [tesis de maestría]. Trujillo – Perú: Servicio de publicaciones, Universidad Nacional de Trujillo; 1995.
9. Ventosilla P, Infante B, Merello J, Chauca J. Guía de Prácticas para la Producción de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades. OPS/OMS/ROW/IMTA vH. 2001; 1:60-64.
10. Poopathi S, Kumar K. Novel Fermentation Media for Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Journal of Economic Entomology. 2003; 96(4): 1039-1044.
11. Khodair T, Abdhafez A, Sakr H, Ibrahim M. Improvement of *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticide Production by Fed-batch Culture on Low Cost Effective Medium. Res. J. Agric. & Biol. Sci. 2008; 4(6): 923-935.
12. Soccol C, Teresinha E, Pollow V, Cancio R, Prochman A, Mohan R et al. Development of a Low Cost Bioprocess for Endotoxin Production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Intended for Biological Control of *Aedes aegypti*. Braz. Arch. Biol. Technol. 2009; 52: 121-130.
13. Carrera M. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio [tesis doctoral]. México: Space; 2009.
14. Hercos F, De Souza E, Santos I, Lyon F, Maceda C. Production of *Bacillus thuringiensis* Biopesticide using Commercial Lab Medium and Agricultural by-products as Nutrient Sources. Rev. Brasileira de Milho e Sorgo. 2010; 9(51): 1-11.
15. Paucar A. Optimización de la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo para la producción de un bioacaricida a partir de *Bacillus thuringiensis* en un biorreactor discontinuo a escala piloto. Escuela Politécnica del Ejército de Sangolquí – Ecuador: Edina; 2011.
16. Hossein M. Nutritional Requirements of *Bacillus thuringiensis* During Different Phases of Growth, Sporulation and Germination Evaluated by Plackett-Burman Method. Iran J. Chem. Chem. Eng. 2012; 31(4): 131-136.

17. Poopathi S, Archana B. Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Indian J. Exp. Biol. 2012; 50: 65-71.
18. Chandrashekhar P, Hemant B, Satish P. Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*. T. ScientificWorldJournal. 2014; 10: 1-6.
19. Bravo A, Soberón M, Gómez I, Muñoz C, Pardo L, Galán L et al. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev. Latinoam. Microbiol. 2006; 48(2):113-120.
20. Llagostera M. Estudio de la ecología de *Bacillus thuringiensis* en la hoja. Barcelona - España: Limusa Wiley; 2007.
21. Gallegos G. Producción y toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo para el control de insectos plaga lepidópteros. Monterrey - México: S.A.C Mex; 2003.
22. Ponce E. Recuperación de cepas HD de *Bacillus thuringiensis*, su propagación en 14 medios de producción y la evaluación de la actividad tóxica contra *Trichoplusa ni* (Huber) y *Heliothis virescens* (Fabricius). [tesis doctoral]. México: Servicio de Publicaciones, Universidad Nuevo León; 2005.
23. Dulmage H, Correa T, Martinez A. Coprecipitation with lactose as means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr. Pathol. 1970; 15:15.
24. Margalit J. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; history and presents status. Israel J Entomol. 1989; 23: 3-8.
25. Palacios R. Aspectos de la Fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawaiaa* nivel de planta piloto. Rev. Digital Mex. 2001; 16(3): 45-53.
26. Dharmisthini S. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1583 on glutamate factory. J. Invertebr. Phatol. 1985; 46:231-238.
27. Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. Gene. 1991; 108:115-119.
28. Carreras B. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario [tesis de maestría]. Cuba: Servicio de publicaciones científicas. Universidad de La Habana; 2003.
29. Benintende G, López-Meza J, Cozzi J, Piccinetti C, Ibarra J. 2000. Characterization of INTA 51-3, a New Atypical Strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina. Curr. Microbiol. 2000; 41: 396-401.
30. Al-yahyae S, Ellar D. Maximal toxicity of cloned CytA-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C-termini. Microbiology. 1995; 141:3141-3148.
31. Lara I. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* y su uso como bioinsecticida. México: S.A.C Mex; 2008.
32. Gutiérrez H, De la Vara R. Análisis y diseño de experimentos. Mc Gra. w-Hill. Interamerica. 2008; 1: 50-52.
33. Soberon M, Bravo A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Toxicon*. 2008; 27: 303-314.
34. Escobar H. Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. Colombia: S.A Idex; 2004.
35. Amicarelli E. Estrategias de control de oxígeno disuelto aplicadas a la fermentación Batch de Bt [tesis de maestría]. Argentina: Enxarxa; 2006.
36. Vandekar M, Dulmage H. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. UNDP/WORLD BANK/WHO. Special program for research and traing in tropical diseases. Geneve, Suiza. 1982; 1: 95-197.

37. Prabakaran G, Balaraman K. Development of a cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biological Control*. 2006; 36: 288–292.
38. Reyes M, Gómez-Sánchez I, Espinoza C, Bravo F y Ganoza L. Tablas peruanas de composición de alimentos. 8ª ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2009.
39. Composición nutricional de la Fécula de maíz. Los Alimentos [Acceso 23 de julio de 2015]. Disponible en: <http://alimentos.org.es/maizena>
40. Composición nutricional de la Levadura de Cerveza disecada. Botanical-online [Acceso 23 de julio de 2015]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/levaduradecerveza.htm>
41. Medrano O, Luna O, Peña J, Sánchez J. Supervivencia de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en la espermosfera-rizosfera de frijol. *Terra*. 2000; 18:333-337.
42. Abarca E. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *aisawai* [tesis doctoral]. México: Alfredd. UNAM; 1992.
43. Fernandez O y Larrea V. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *RMIP*. 2002; 5: 64–71.
44. Madigan M. Biología de los microorganismos. 10ª ed. España: Pearson; 2004.
45. Olivas E, Alarcón L. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. México: Printed; 2004.
46. Bobrowski V, Pasquali G, Bodanese M, Fiuza L. Detection of cry1 Genes in *Bacillus thuringiensis* Isolates from South of Brazil and Activity Against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian J. Microbiol.* 2001; 32:105-109.
47. Galan L, Garcia J, Ellis S, Quintero Z, Luna O. 1996. Production of *Bacillus thuringiensis*. En: *Avances en la biotecnología de Bacillus thuringiensis*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey – Mexico: Océano; 1996.
48. Goldberg I, Sneh B, Battat E, Klein D. Optimization of medium for high yield production of spore-cristal preparation of *Bacillus thuringiensis*. Effective against the aegyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* *Boisd.* *Biotechnol. Lett.* 1980; 2: 419-426.
49. Martínez R. Estudio faunístico y ecológico de los Simúlidos (*Diptera, Simuliidae*) de Extremadura [tesis]. Salamanca – España. Servicio de publicaciones. Universidad de Salamanca; 1996.
50. Post R. The annual cycle of *Simulium erythrocephalum* (*Diptera-Simuliidae*) at a site in Norfolk. *Fresh. Biol.* 1983; 13: 379-388.
51. Grenier P, Bertrand H. *Simuliidae (Diptera, Nematocera)* d'Espagne. *Ann. Paras. Hum. comp.* 1954; 29 (4): 447-459.
52. P.I.P. Manejo Integrado de simúlidos en la ciudad de Huánuco y alrededores, con Código SNIP 46190. Huánuco – Perú. 2011.
53. Consultora Universidad Nacional Agraria La Molina y Fundación para el Desarrollo Agrario. Proyecto a nivel de Prefactibilidad del P.I.P. Manejo Integrado de simúlidos en la ciudad de Huánuco y alrededores. Huánuco – Perú. 2008.
54. Guillard R. Division rates. *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge: J.Stein; 1973.
55. Pescorán V, Robles H. (2004). Efecto del pH y la temperatura sobre la producción de bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis* en un medio de producción suplementado con "Saguanza". *Rebiol.* 2004; 31: 20-28.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de colorantes y tinción de esporas

Tinción Gram

1. Se preparó una extensión de bacteria y fijó suavemente al calor.
2. Se aplicó unas gotas de violeta de genciana por 30 segundos.
3. Se dejó caer la solución anterior para colocar lugol por 30 segundos.
4. Se lavó con agua destilada y decoloró con alcohol cetona dejándolo por 30 segundos.
5. Se lavó con agua destilada y aplicó una solución contraste en este caso la Safranina durante 15 segundos.
6. Se aclaró con agua destilada y secó cuidadosamente con papel y luego suavemente con calor.

Preparación del colorante Azul de Coomassie (1 L)

1. Se disolvió 3 g de Azul de Coomassie en 450 mL de metanol.
2. Se añadió 100 mL de ácido acético glacial en 450 mL de agua destilada.
3. Se filtró la solución.

Tinción de esporas (Coloración con Azul de Coomassie)

1. Se preparó una extensión de bacterias y fijó suavemente al calor.
2. Se aplicó el colorante Azul de Coomassie cubriendo toda la superficie dejando reposar durante 5 minutos.
3. Se enjuagó con agua destilada y dejó secar.
4. Se observó la preparación al microscopio a 1000 X con aceite de inmersión.

Tinción de esporas (coloración con verde de malaquita)

1. Se preparó una extensión de bacterias y fijó suavemente al calor.
2. Se aplicó el colorante verde malaquita cubriendo toda la superficie dejando reposar por un minuto y se siguió la tinción con calor hasta la emisión de vapores durante 5 – 10 minutos, se dejó enfriar.
3. Se lavó con agua abundante y se dejó secar.
4. Se aplicó el colorante safranina durante dos minutos.
5. Se lavó con agua y dejó secar.
6. Se observó la preparación al microscopio a 1000 X con aceite de inmersión.

Anexo 2

Conteo directo por el Método de Breed

1. Determinación del campo microscópico

- Se colocó el objetivo micrométrico en la platina del microscopio y se observó a 1000 X.
- Se midió el diámetro del campo microscópico, teniendo en cuenta que cada división del objetivo micrométrico mide 10 mm (= 0,01 mm = 0,001 cm).
- Se determinó la superficie del campo microscópico con la siguiente fórmula:

$$\text{Superficie.CampoMicroscópico} = \pi \times r^2$$

$$\text{Superficie.CampoMicroscópico} = 3,1416 \times (10\mu\text{m})^2$$

$$\text{Superficie.CampoMicroscópico} = 314,16\mu\text{m}^2$$

2. Determinación del Factor Microscópico (número de campos microscópicos)

- Se determinó según la siguiente fórmula:

$$F.M = \frac{\text{Superficie.Preparación}}{\text{Superficie.CampoMicroscópico}}$$

$$F.M = \frac{1\text{cm}^2}{314,16\mu\text{m}^2}$$

$$F.M = \frac{1000000\mu\text{m}^2}{314,16\mu\text{m}^2}$$

$$F.M = 3183,1$$

3. Conteo de esporas al microscopio

- En un portaobjetos limpio y desengrasado se marcó un área de 1 cm². Se invirtió la lámina.
- Se depositó 0,01 mL (10 ul) del cultivo bacteriano y se extendió en el área marcada del portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se fijó con calor y prosiguió con la coloración de esporas con Azul de Coomassie descrito en el Anexo 1.
- Observar la preparación al microscopio a 1000 X con aceite de inmersión.

- Realizar el conteo de 5 campos microscópicos como mínimo y sacar el promedio, posteriormente aplicar la siguiente fórmula para la obtención de la concentración final de esporas/mL.

$$N^{\circ} \text{esporas} / \text{mL} = \bar{X}_{\text{esp}} / \text{campo} \times F.M \times 100 \times I.D$$

Dónde:

- X** : Promedio de células ó esporas por campo microscópico
- F.M** : Factor microscópico, calculado según el área del campo
- 100** : Inverso del inóculo depositado en el portaobjeto (0,01 ml)
- I.D** : Inversa de la dilución (de ser el caso)

Anexo 3

Análisis de Varianza del promedio final de la concentración de esporas (esp/ml) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

H_a =al menos una media es diferente

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor P
Medios de cultivo	4	10,6601	2,66504	1499,61	0,000
Error	10	0,0178	0,00178		
Total	14	10,6779			

Anexo 4

Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) del promedio final de la concentración de esporas (esp/ml) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente.

Categoría	Media estimada	Grupos	
CN (Control)	$4,5 \times 10^9$	A	
MLS	$4,3 \times 10^9$	A	
ML	$9,7 \times 10^8$		B
PS	$8,1 \times 10^8$		C
P	$6,6 \times 10^8$		D

Anexo 5

Análisis de Varianza del pH final de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

H_a =al menos una media es diferente

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor P
Medios de cultivo	4	5,9948	1,49870	1396,30	0,000
Error	10	0,0107	0,00107		
Total	14	6,0055			

Anexo 6

Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) del pH final de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* por efecto de cuatro diferentes medios de cultivo (P, PS, ML y MLS) y su control (CN) respectivamente.

Categoría	Media estimada	Grupos	
CN (Control)	8,57	B	
MLS	8,09		C
ML	6,99		D
PS	8,68		A
P	8,59	B	

Anexo 7

Recuento de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en el medio de cultivo 1 (P)

TIEMPO	R1	R2	R3	R4	R5	\bar{x}	I.D	Esp/ml	\bar{x} esp/ml	$\ln \bar{x}$
HORA										
0	-	-	-	-	-	-	-	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	9,4
6	49	42	46	36	43	43	-	$1,4 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$	16,4
6	35	44	45	48	39	42	-	$1,3 \times 10^7$		
6	45	37	48	39	44	43	-	$1,4 \times 10^7$		
18	204	212	205	198	213	206	-	$6,6 \times 10^7$	$6,55 \times 10^7$	18,0
18	214	208	196	211	213	208	-	$6,6 \times 10^7$		
18	198	197	204	207	210	203	-	$6,5 \times 10^7$		
24	103	116	106	102	115	108	10	$3,4 \times 10^8$	$3,34 \times 10^8$	19,6
24	98	105	112	109	102	105	10	$3,3 \times 10^8$		
24	99	97	112	96	104	102	10	$3,3 \times 10^8$		
30	198	205	189	196	187	195	10	$6,2 \times 10^8$	$6,37 \times 10^8$	20,3
30	212	198	206	208	197	204,2	10	$6,5 \times 10^8$		
30	196	207	202	188	210	200,6	10	$6,4 \times 10^8$		
42	17	19	17	24	18	19	100	$6,1 \times 10^8$	$6,16 \times 10^8$	20,2
42	15	16	19	20	23	19	100	$6,1 \times 10^8$		
42	17	18	21	22	23	20	100	$6,4 \times 10^8$		
48	19	25	21	23	17	21	100	$6,7 \times 10^8$	$6,68 \times 10^8$	20,3
48	19	18	20	23	19	19,8	100	$6,4 \times 10^8$		
48	22	21	23	19	23	21,6	100	$7,0 \times 10^8$		
54	23	19	21	23	20	21	100	$6,7 \times 10^8$	$7,00 \times 10^8$	20,4
54	25	18	19	23	24	22	100	$7,0 \times 10^8$		
54	23	22	21	25	24	23	100	$7,3 \times 10^8$		
66	21	19	17	18	22	19	100	$6,1 \times 10^8$	$6,79 \times 10^8$	20,3
66	23	25	26	19	21	23	100	$7,3 \times 10^8$		
66	21	25	24	18	21	22	100	$7,0 \times 10^8$		
72	21	16	18	23	19	19	100	$6,1 \times 10^8$	$6,58 \times 10^8$	20,3
72	24	18	21	22	19	21	100	$6,7 \times 10^8$		
72	24	25	23	20	19	22	100	$7,0 \times 10^8$		

Anexo 8

Recuento de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en el medio de cultivo 2 (PS)

TIEMPO HORA	R1	R2	R3	R4	R5	\bar{x}	I.D	Esp/ml	\bar{x} esp/ml	ln \bar{x}
0	-	-	-	-	-	-	-	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	9,4
6	56	63	67	58	56	60	-	1,9 x10 ⁷	1,25x10 ⁷	16,3
6	64	52	56	61	58	58	-	1,9 x10 ⁷		
6	53	57	62	60	57	58	-	1,8 x10 ⁷		
18	215	212	206	213	208	211	-	6,7 x10 ⁷	6,74x10 ⁷	18,0
18	198	216	223	212	221	214	-	6,8 x10 ⁷		
18	206	214	215	217	196	210	-	6,7 x10 ⁷		
24	115	106	119	105	112	111	10	3,5 x10 ⁸	3,61 x10 ⁸	19,7
24	118	117	119	108	113	115	10	3,7 x10 ⁸		
24	103	115	118	117	116	114	10	3,6 x10 ⁸		
30	215	213	208	211	216	212,6	10	6,8 x10 ⁸	6,84 x10 ⁸	20,3
30	218	219	209	215	213	214,8	10	6,8 x10 ⁸		
30	221	218	213	216	217	217	10	6,9 x10 ⁸		
42	27	28	25	29	27	27	100	8,6 x10 ⁸	8,28 x10 ⁸	20,5
42	29	24	26	27	21	25	100	8,0 x10 ⁸		
42	24	26	28	25	27	26	100	8,3 x10 ⁸		
48	27	25	32	28	27	27,8	100	8,9 x10 ⁸	8,59 x10 ⁸	20,6
48	26	27	25	28	29	27	100	8,6 x10 ⁸		
48	26	25	26	25	27	25,8	100	8,3 x10 ⁸		
54	26	28	25	29	27	27	100	8,6 x10 ⁸	8,49 x10 ⁸	20,6
54	28	24	26	26	28	26	100	8,3 x10 ⁸		
54	27	29	27	28	26	27	100	8,6 x10 ⁸		
66	23	27	28	29	24	26	100	8,3 x10 ⁸	8,07 x10 ⁸	20,5
66	19	22	23	27	28	24	100	7,6 x10 ⁸		
66	26	26	28	24	25	26	100	8,3 x10 ⁸		
72	24	23	26	27	25	25	100	8,0 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸	20,5
72	26	28	25	23	27	26	100	8,3 x10 ⁸		
72	24	23	27	25	26	25	100	8,0 x10 ⁸		

Anexo 9

Recuento de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en el medio de cultivo 3 (ML)

TIEMPO	R1	R2	R3	R4	R5	\bar{x}	I.D	Esp/ml	\bar{x} esp/ml	In \bar{x}
HORA										
0	-	-	-	-	-	-	-	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	9,4
6	48	51	44	43	47	47	-	1,5 x10 ⁷	1,46x10 ⁷	16,5
6	47	39	50	41	45	44	-	1,4 x10 ⁷		
6	46	50	49	51	41	47	-	1,5 x10 ⁷		
18	219	198	211	215	214	211	-	6,7 x10 ⁷	6,69x10 ⁷	18,0
18	214	215	221	196	213	212	-	6,8 x10 ⁷		
18	205	212	214	198	208	207	-	6,6 x10 ⁷		
24	114	115	119	106	117	114	10	3,6 x10 ⁸	3,64 x10 ⁸	19,7
24	117	116	108	105	118	113	10	3,6 x10 ⁸		
24	116	115	110	121	117	116	10	3,7 x10 ⁸		
30	226	218	221	217	225	221,4	10	7,0 x10 ⁸	7,13 x10 ⁸	20,4
30	218	229	231	225	233	227,2	10	7,2 x10 ⁸		
30	216	219	224	228	231	223,6	10	7,1 x10 ⁸		
42	32	36	35	43	39	37	100	1,2x10 ⁹	1,2 x10 ⁹	20,9
42	39	41	36	42	37	39	100	1,2 x10 ⁹		
42	41	38	39	36	42	39	100	1,2 x10 ⁹		
48	31	29	34	32	31	31,4	100	9,9 x10 ⁸	1,03 x10 ⁹	20,8
48	36	36	35	29	33	33,8	100	1,1 x10 ⁹		
48	28	32	36	29	35	32	100	1,0 x10 ⁹		
54	32	31	29	28	34	31	100	9,9 x10 ⁸	9,87 x10 ⁸	20,7
54	28	27	32	34	29	30	100	9,6 x10 ⁸		
54	32	28	35	32	32	32	100	1,0 x10 ⁹		
66	32	33	27	28	29	30	100	9,6 x10 ⁸	9,66 x10 ⁸	20,7
66	27	29	32	26	32	29	100	9,2 x10 ⁸		
66	32	35	32	31	29	32	100	1,0 x10 ⁹		
72	28	29	32	35	36	32	100	1,0 x10 ⁹	9,7 x10 ⁸	20,7
72	29	27	26	33	35	30	100	9,6 x10 ⁸		
72	29	26	31	30	28	29	100	9,2 x10 ⁸		

Anexo 10

Recuento de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en el medio de cultivo 4 (MLS)

TIEMPO	R1	R2	R3	R4	R5	\bar{x}	I.D	Esp/ml	\bar{x} esp/ml	ln \bar{x}
HORA										
0	-	-	-	-	-	-	-	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	9,4
6	46	52	51	49	53	50	-	1,6 x10 ⁷	1,60x10 ⁷	16,6
6	49	51	53	54	48	51	-	1,6 x10 ⁷		
6	47	49	48	54	52	50	-	1,6 x10 ⁷		
18	223	227	231	232	228	228	-	7,3 x10 ⁷	7,35x10 ⁷	18,1
18	227	234	233	226	229	230	-	7,3 x10 ⁷		
18	229	233	241	236	235	235	-	7,5 x10 ⁷		
24	125	128	119	132	121	125	10	4,0 x10 ⁸	4,08 x10 ⁸	19,8
24	119	127	124	133	131	127	10	4,0 x10 ⁸		
24	134	135	128	137	129	133	10	4,2 x10 ⁸		
30	238	242	256	248	245	245,8	10	7,8 x10 ⁸	7,82 x10 ⁸	20,5
30	249	253	248	251	246	249,4	10	7,9 x10 ⁸		
30	238	243	247	239	241	241,6	10	7,7 x10 ⁸		
42	82	91	87	93	80	87	100	2,8x10 ⁹	2,72 x10 ⁹	21,7
42	78	85	92	87	88	86	100	2,7 x10 ⁹		
42	79	87	89	78	84	83	100	2,6 x10 ⁹		
48	125	127	133	135	133	130,6	100	4,2 x10 ⁹	4,17 x10 ⁹	22,2
48	134	135	128	132	136	133	100	4,2 x10 ⁹		
48	125	129	132	127	130	128,6	100	4,1 x10 ⁹		
54	134	135	132	136	132	134	100	4,3 x10 ⁹	4,23 x10 ⁹	22,2
54	133	129	134	132	133	132	100	4,2 x10 ⁹		
54	128	134	134	133	135	133	100	4,2 x10 ⁹		
66	135	142	139	132	136	137	100	4,4 x10 ⁹	4,32 x10 ⁹	22,2
66	132	135	136	138	139	136	100	4,3 x10 ⁹		
66	132	134	135	134	135	134	100	4,3 x10 ⁹		
72	134	135	138	137	136	136	100	4,3 x10 ⁹	4,3 x10 ⁹	22,2
72	129	136	128	134	136	133	100	4,2 x10 ⁹		
72	136	128	132	137	135	134	100	4,3 x10 ⁹		

Anexo 11

Recuento de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en el medio de cultivo 5 (CN)

TIEMPO	R1	R2	R3	R4	R5	\bar{x}	I.D	Esp/ml	\bar{x} esp/ml	$\ln \bar{x}$
HORA										
0	-	-	-	-	-	-	-	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	9,4
6	62	58	63	58	49	58	-	$1,9 \times 10^7$	$1,91 \times 10^7$	16,8
6	61	68	57	55	66	61	-	$2,0 \times 10^7$		
6	63	55	63	67	57	61	-	$1,9 \times 10^7$		
18	239	247	245	238	233	240	-	$7,6 \times 10^7$	$7,74 \times 10^7$	18,2
18	248	242	251	247	245	247	-	$7,9 \times 10^7$		
18	238	245	248	241	242	243	-	$7,7 \times 10^7$		
24	129	134	137	145	136	136	10	$4,3 \times 10^8$	$4,44 \times 10^8$	19,9
24	136	142	139	143	137	139	10	$4,4 \times 10^8$		
24	142	145	147	139	146	144	10	$4,6 \times 10^8$		
30	256	258	263	265	260	260,4	10	$8,3 \times 10^8$	$8,35 \times 10^8$	20,5
30	257	259	265	263	268	262,4	10	$8,3 \times 10^8$		
30	267	262	268	266	263	265,2	10	$8,4 \times 10^8$		
42	78	85	87	92	96	88	100	$2,8 \times 10^9$	$2,85 \times 10^9$	21,8
42	94	91	86	89	90	90	100	$2,9 \times 10^9$		
42	89	92	94	87	95	91	100	$2,9 \times 10^9$		
48	134	136	129	137	142	135,6	100	$4,3 \times 10^9$	$4,29 \times 10^9$	22,2
48	131	141	136	133	135	135,2	100	$4,3 \times 10^9$		
48	132	136	128	133	134	132,6	100	$4,2 \times 10^9$		
54	135	132	142	136	137	136	100	$4,3 \times 10^9$	$4,38 \times 10^9$	22,2
54	142	143	138	139	136	140	100	$4,5 \times 10^9$		
54	139	140	135	136	137	137	100	$4,4 \times 10^9$		
66	143	142	139	140	138	140	100	$4,5 \times 10^9$	$4,45 \times 10^9$	22,2
66	142	145	138	139	141	141	100	$4,5 \times 10^9$		
66	138	139	139	138	136	138	100	$4,4 \times 10^9$		
72	141	143	139	143	138	141	100	$4,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	22,2
72	145	142	138	147	145	143	100	$4,6 \times 10^9$		
72	138	136	142	145	139	140	100	$4,5 \times 10^9$		

ANEXO 12

Determinación del pH del medio de cultivo 1 (P)

TIEMPO	0	6	18	24	30	42	48	54	66	72
pH 1	7,40	6,08	7,56	7,99	8,05	8,44	8,54	8,54	8,49	8,56
pH 2	7,40	6,50	7,85	8,13	8,22	8,52	8,61	8,60	8,56	8,61
pH 3	7,40	6,45	7,97	8,16	8,27	8,54	8,61	8,59	8,57	8,59
pH \bar{x}	7,40	6,34	7,79	8,09	8,18	8,50	8,59	8,58	8,54	8,59

ANEXO 13

Determinación del pH del medio de cultivo 2 (PS)

TIEMPO	0	6	18	24	30	42	48	54	66	72
pH 1	7,40	6,59	7,97	8,19	8,32	8,60	8,66	8,69	8,62	8,68
pH 2	7,40	6,63	7,97	8,26	8,32	8,57	8,66	8,66	8,62	8,68
pH 3	7,40	6,64	8,05	8,25	8,34	8,62	8,66	8,67	8,60	8,67
pH \bar{x}	7,40	6,62	8,00	8,23	8,33	8,60	8,66	8,67	8,61	8,68

ANEXO 14

Determinación del pH del medio de cultivo 3 (ML)

TIEMPO	0	6	18	24	30	42	48	54	66	72
pH 1	7,40	6,10	5,55	5,70	6,65	6,95	6,91	7,05	6,95	7,01
pH 2	7,40	6,04	5,62	6,98	7,16	7,04	6,91	6,98	6,96	6,98
pH 3	7,40	6,04	6,39	7,14	7,18	6,95	6,89	6,91	6,88	6,97
pH \bar{x}	7,40	6,06	5,85	6,61	7,00	6,98	6,90	6,98	6,93	6,99

ANEXO 15

Determinación del pH del medio de cultivo 4 (MLS)

TIEMPO	0	6	18	24	30	42	48	54	66	72
pH 1	7,40	5,99	7,43	7,66	7,74	7,59	7,79	7,93	8,05	8,09
pH 2	7,40	5,93	7,39	7,65	7,68	7,55	7,74	7,82	7,96	8,04
pH 3	7,40	5,90	7,51	7,70	7,71	7,99	8,02	8,12	8,07	8,15
pH \bar{x}	7,40	5,94	7,44	7,67	7,71	7,71	7,85	7,96	8,03	8,09

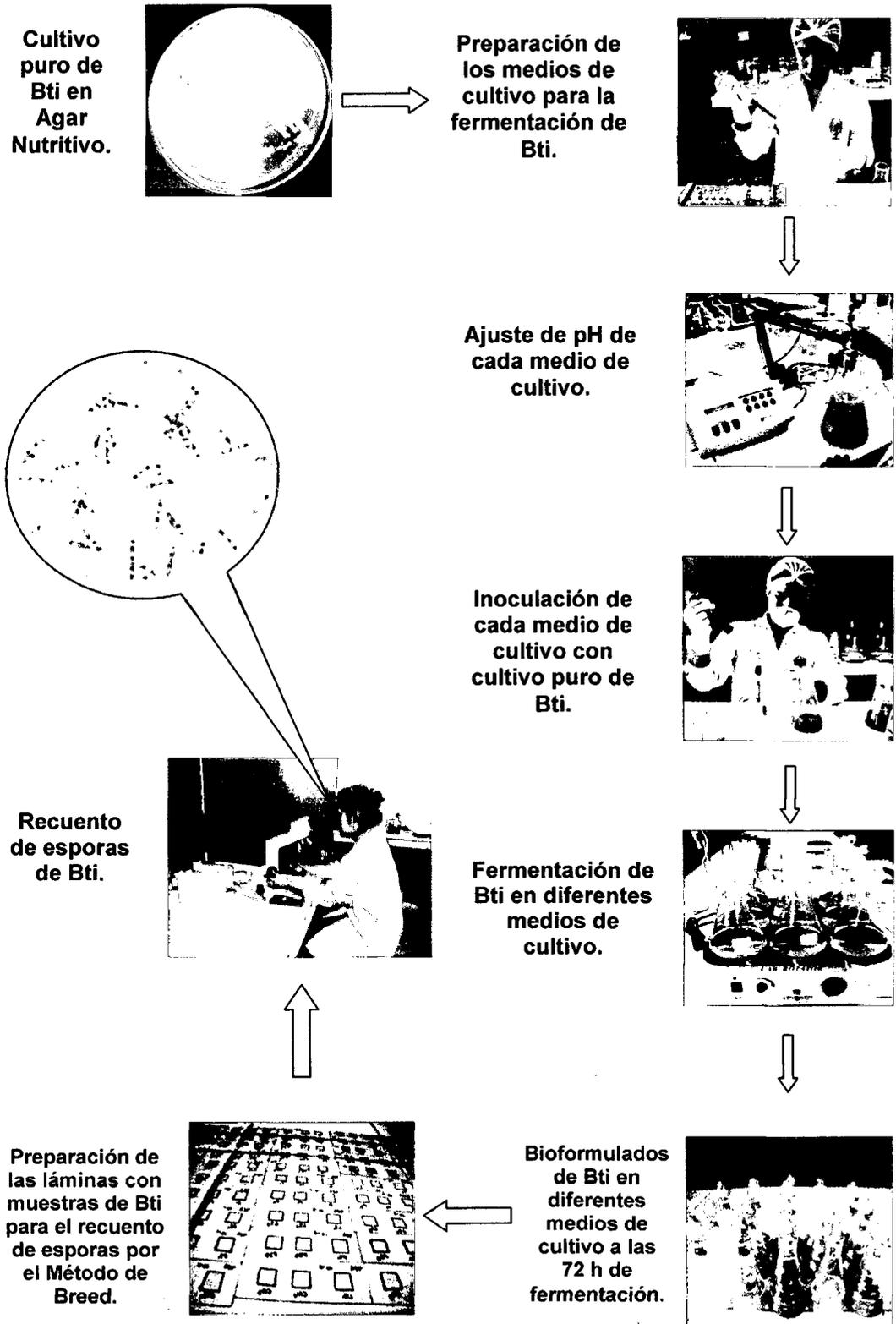
ANEXO 16

Determinación del pH del medio de cultivo 5 (CN)

TIEMPO	0	6	18	24	30	42	48	54	66	72
Ph 1	7,40	6,78	7,71	7,90	8,05	8,27	8,42	8,46	8,50	8,54
Ph 2	7,40	6,79	7,71	7,85	8,01	8,23	8,41	8,43	8,47	8,61
Ph 3	7,40	6,83	7,77	7,91	8,07	8,29	8,45	8,51	8,60	8,57
ph x	7,40	6,80	7,73	7,89	8,04	8,26	8,43	8,47	8,52	8,57

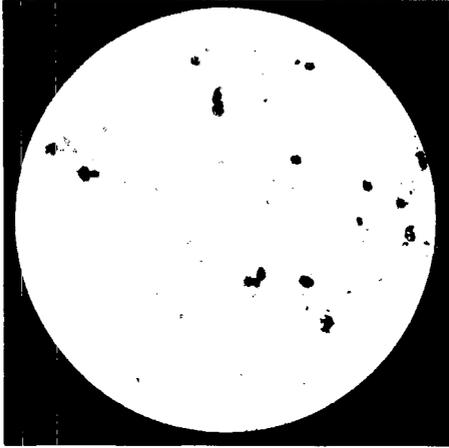
Anexo 17

Flujograma del proceso de fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.



Anexo 18

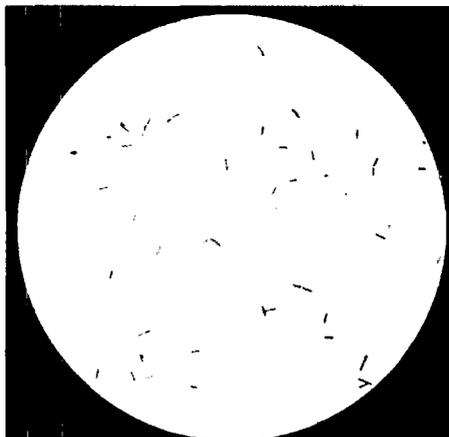
Observaciones microscópicas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*



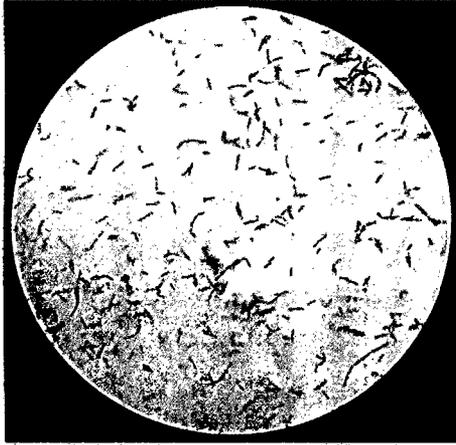
**Observación
microscópica del
crecimiento de Bti
en el medio MLS a
las 6 h de
fermentación.**



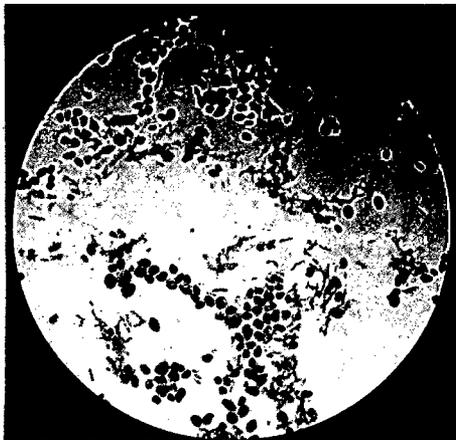
**Observación
microscópica del
crecimiento de Bti
en el medio PS a las
6 h de fermentación.**



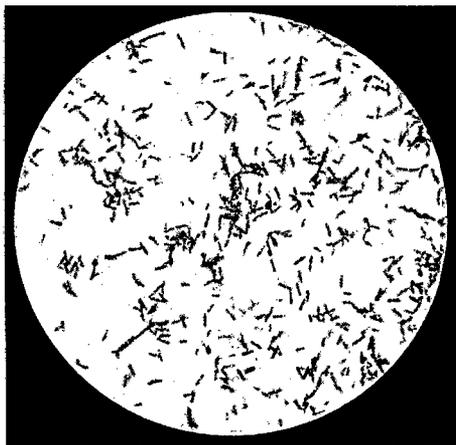
**Observación
microscópica del
crecimiento de Bti
en el medio CN
(control) a las 6 h de
fermentación.**



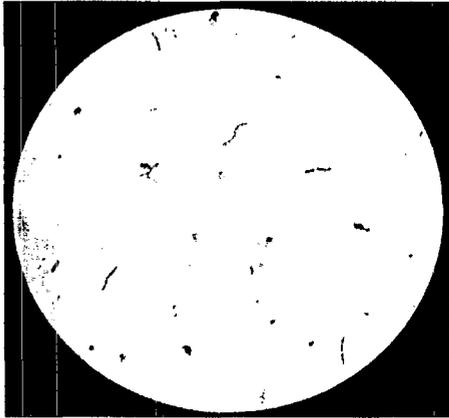
**Observación
microscópica de Bti
en la fase de
transición en el
medio PS a las 24 h
de fermentación.**



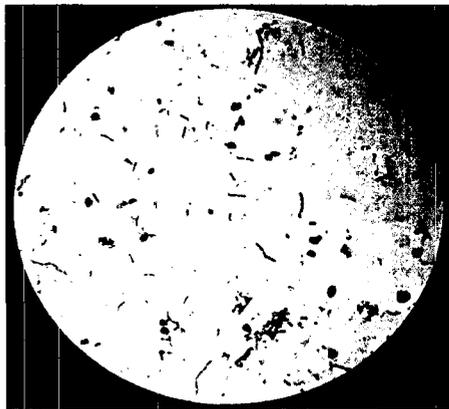
**Observación
microscópica de Bti
en la fase de
transición en el
medio MLS a las 30
h de fermentación.**



**Observación
microscópica de Bti
en la fase de
transición en el
medio CN (control) a
las 30 h de
fermentación.**



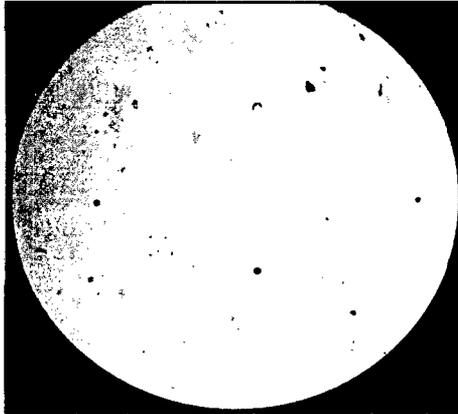
**Observación
microscópica de Bti
en la fase de
esporulación en el
medio PS a las 30 h
de fermentación.**



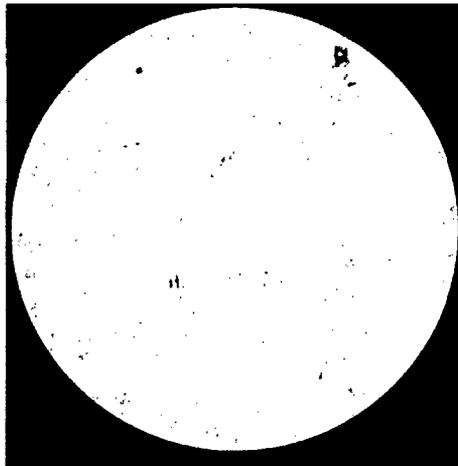
**Observación
microscópica de Bti
en la fase de
esporulación en el
medio MLS a las 42
h de fermentación.**



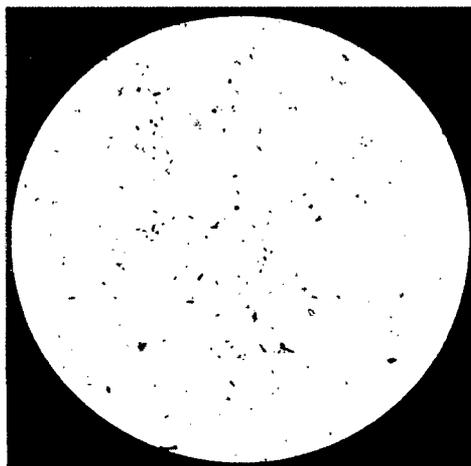
**Observación
microscópica de Bti
en la fase de
esporulación en el
medio CN (control) a
las 42 h de
fermentación.**



**Observación
microscópica de Bti
en el medio PS a las
72 h de
fermentación.**

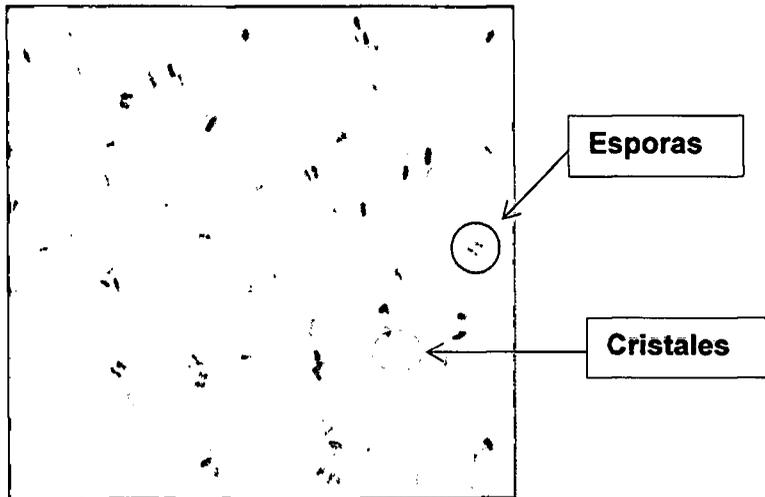


**Observación
microscópica de Bti
en el medio MLS a
las 72 h de
fermentación.**

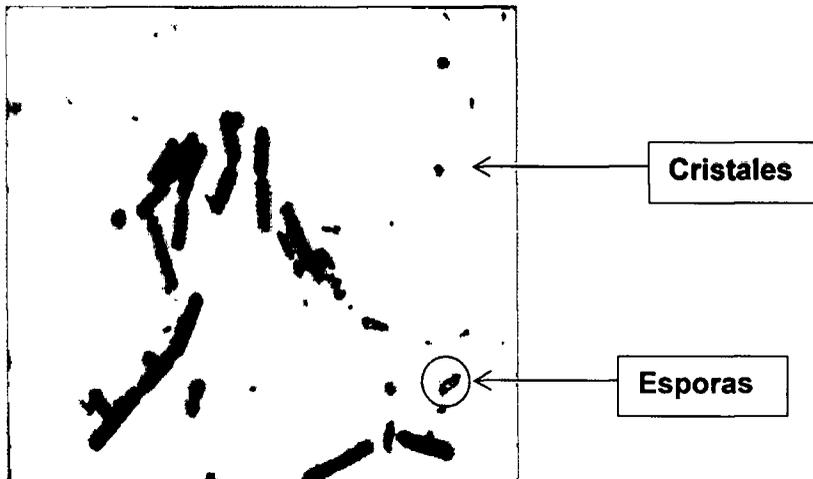


**Observación
microscópica de Bti
en el medio CN
(control) a las 72 h
de fermentación.**

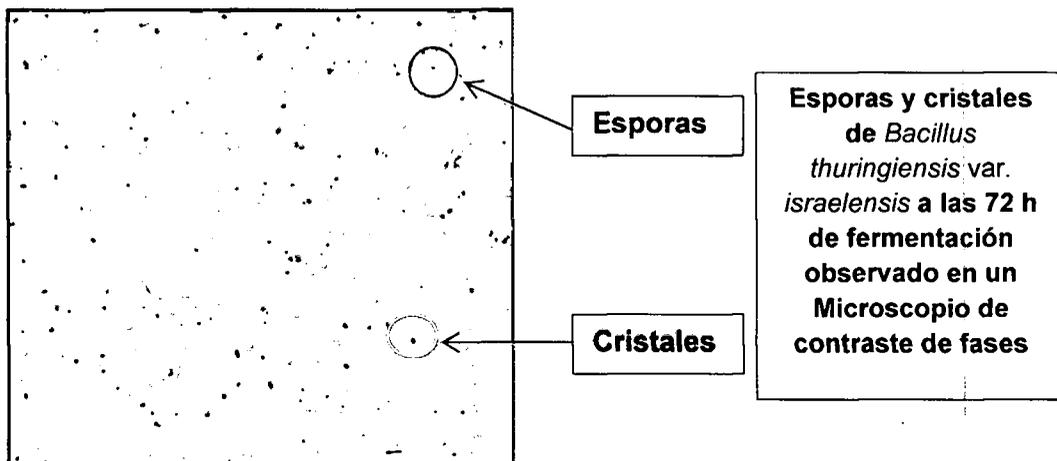
Esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* a las 72 h de fermentación



(coloración con Verde de Malaquita)



(coloración con Azul de Coomassie)



Anexo 19

MATRIZ DE CONSISTECIA

Título: Formulación de medios de cultivo y su efecto en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.
Huánuco, 2015.

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variable	Marco Teórico	Metodología
GENERAL: ¿Cuál será el efecto de las formulaciones de medios de cultivo en la producción de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> ?	GENERAL: Evaluar la formulación de medios de cultivo y su efecto en la producción de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> . ESPECÍFICOS: - Formular medios de cultivo para la producción de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> . - Evaluar los medios de cultivo en la producción de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .	La formulación de medio de cultivo óptimo permiten una mayor producción de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> a nivel de laboratorio.	VARIABLE INDEPENDIENTE: - Formulación de medios de cultivo. Indicadores: - Composición nutricional. VARIABLE DEPENDIENTE - Producción de esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> . Indicadores: - Cuantificación de esporas/ml. - Cinética de crecimiento.	Control biológico. <i>Bacillus thuringiensis</i> . <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> . Metabolismo. Mecanismo de acción. Condiciones de crecimiento. Requerimientos nutricionales.	TIPO DE INVESTIGACIÓN - Básica NIVEL DE INVESTIGACIÓN - Experimental MÉTODO - Experimental MUESTRA <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> . INSTRUMENTOS - Estufa - Autoclave - Potenciómetro - Microscopio