

Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae) mutante por acción del cloruro de hidroxilamina

Production of *Bacillus thuringiensis* H-14 var. mutant *israelensis* (Bacillaceae) by the action of hydroxylamine chloride

Juan J. Pedro Huaman, Willian G. Blas Cerdán, Gina G. Zavaleta Espejo, José A. Saldaña Jiménez, Katherine N. Vasquez Villanueva & Rosmery A. Hoyos Honorio

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad nacional de Trujillo, PERÚ

bio.juphu@gmail.com // <https://orcid.org/0000-0001-6230-3670>

wgbc_unitru@hotmail.com

gzavaleta@unitru.edu.pe

jsalji@hotmail.com // <https://orcid.org/0000-0001-6111-869>

katherine_11_96@hotmail.com // <https://orcid.org/0000-0001-7421-4261>

ros.bioo29@outlook.com // <https://orcid.org/0000-0002-5870-2756>

Liz S. R. Pedro Huaman,

Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad nacional de Trujillo, PERÚ

lspedroh@gmail.com.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae) mutante por acción del cloruro de hidroxilamina. El diseño experimental que se realizó fue completamente al azar, con un testigo y tres concentraciones del mutágeno 10, 20 y 30 ppm con tres repeticiones para cada una. El bioproceso, se llevó a cabo empleando biorreactores tipo tanque cilíndrico aireado y agitado, con un inóculo microbiano de 10^8 UFC/ml durante 48 horas a temperatura de 30°C y un pH inicial de 7,0, el cual disminuyó hasta un valor final de 6,0. Obteniéndose la mayor producción de bioinsecticida a la concentración de 20 ppm. La cual fue cuantificada en gramos de peso seco por litro (2,10 g/L). Evidenciándose que no existe una relación directa entre la producción de bioinsecticida y la concentración del mutágeno.

Palabras clave: mutagénico, biorreactor, bioproceso, bioinsecticida y biomasa.

Abstract

In the present work, the production of mutant *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae) by the action of hydroxylamine chloride, was evaluated. The experimental design was completely randomized, with a control and three mutagen concentrations 10, 20 and 30 ppm with three repetitions for each. The bioprocess was carried out using agitated and aerated cylindrical tank bioreactors, with a microbial inoculum of 10^8 CFU / ml for 48 hours at a temperature of 30 ° C and an initial pH of 7,0, which decreased to a final value of 6,0. Obtaining the highest production of bioinsecticide at the concentration of 20 ppm. Which was quantified in grams of dry weight per liter (2,10 g / L). Evidence that there is no direct relationship between the production of bioinsecticide and the concentration of the mutagen.

Keywords: bioreactors, mutagenic, bioprocess, bioinsecticide, *Bacillus thuringiensis*.

Citación: Pedro, J.; W. Blas; G. Zavaleta; J. Saldaña; K. Vásquez; R. Hoyos & L. Pedro. 2019. Producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae) mutante por acción del cloruro de hidroxilamina. *Arnaldoa* 26 (3): 1142-1152 2019.

<http://doi.org/10.22497/arnaldoa.263.26319>

Introducción

La contaminación del medio ambiente, a través de los años, se ha incrementado de manera exponencial en diversas partes del mundo, de manera natural y antrópica. Uno de estos problemas es la contaminación por residuos químicos de los insecticidas que son utilizados como controladores para vectores como *Anopheles* sp. que transmiten la "malaria" (Chavez & Garboza, 2018). Estos insecticidas son tóxicos para los humanos y el medio ambiente, eliminan a los enemigos naturales y, cuando se usan indiscriminadamente, puede generar resistencia en las poblaciones de mosquitos objetivo (Lobo *et al.*, 2018).

Hasta el momento el uso del larvicida temephos y cipermetrinas para adultos de *Aedes aegypti* han tenido buenos resultados; sin embargo, se ha informado casos de resistencia (Carvalho *et al.*, 2018). Ante ello, una posible alternativa para solucionar el problema de resistencia es el control biológico, definido como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente cuyos productos reducen sus efectos (Blas *et al.*, 2017).

El género de *Bacillus* sp, agrupa bacilos Gram positivos, formadores de esporas muy resistentes a condiciones adversas presentan flagelos peritricos, son aerobios o anaerobios facultativos y catalasa positivo. Son bacterias muy ubicuas

en la naturaleza, con gran variedad de nichos ecológicos, lo que refleja la gran heterogeneidad del género. La mayoría de las especies son saprofitas y están ampliamente difundidas en el suelo, agua y plantas. Algunas son capaces de sobrevivir y crecer en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Chavez & Garboza, 2018). El comité de nomenclatura de toxinas de Bt define a las toxinas Cry como δ -endotoxinas que tienen similitud de secuencia primaria con las toxinas Cry reportadas y que presentan actividad pesticida o tóxica (Velásquez *et al.*, 2018).

La producción de esta bacteria a gran escala es muy importante, dependiendo de ciertos factores como los requerimientos nutricionales en el momento de producir Bt y sus toxinas proteicas. El balance carbono-nitrógeno y el balance de las sales como hierro, magnesio, manganeso, entre otros. Condiciones como temperatura, pH, suministro de oxígeno y agitación, son algunos de los parámetros principales para el desarrollo de este microorganismo. Sin embargo, los requerimientos cambian dependiendo de la variedad de Bt con el que se trabaja y la producción a gran escala presenta algunos inconvenientes de espacio y costo porque su rendimiento en biomasa no es muy alto (Pineda & Vélez, 2018).

Determinados agentes ambientales, físicos o químicos pueden alterar la estructura molecular del ADN, provocando una mayor frecuencia de mutaciones, a los mismos que se les denomina mutágenos o agentes mutagénicos. Dentro de los mutagénicos químicos se encuentran el 5-Bromouracilo, etil metano sulfonato (EMS), ácido nitroso, naranja de acridina, cloruro de hidroxilamina, entre otros, pudiéndose agruparse en varias categorías

como: análogo de bases, hidroxilantes, desaminantes, alquilantes e intercalares (Blas *et al.*, 2017). El cloruro de hidroxilamina aplicado a concentraciones variadas, ha permitido la obtención de mutantes bacterianos con diferentes propósitos, tal como se reporta para los bacilos Gram positivos: *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformes*, *B. polymyxa*; y Bacilos Gram negativos como *E. coli*. El cloruro de hidroxilamina reacciona uniéndose covalentemente al DNA, provocando la pérdida de la estructura helicoidal, ruptura de cadena, desacoplamiento de la doble hélice e induce mutaciones por transición GC-AT (Klug *et al.*, 2013; Polo, 1999; Passarge, 2004; Perunov *et al.*, 1984; Griffith *et al.*, 2002).

Debido a la importancia de *B. thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bti) en la producción de bioinsecticida, cuyos genes se encuentran muy emparentados entre sí, y conociendo el efecto genotóxico del cloruro de hidroxilamina, se ha creído conveniente desarrollar una nueva estrategia que permita incrementar la producción del bioinsecticida por Bti, con la finalidad de establecer la acción del efecto del cloruro de hidroxilamina sobre la producción de biomasa, y determinar la concentración que permita una mayor producción del bioinsecticida Bti.

Material y métodos

Material Biológico: Cepa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae), que fue proporcionada por el laboratorio de Biología Celular y Molecular.

Agente mutagénico: Cloruro de Hidroxilamina **sólido**.

Tamaño Muestral: El tamaño muestral fue calculado en base a los tratamientos y el número de repeticiones. En este experi-

mento, se empleó 4 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento con un total de 12 unidades experimentales. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde cada concentración es un tratamiento y cada tratamiento se repitió tres veces.

Diseño de exposición del Bti al mutágeno: Se eligieron cuatro concentraciones incluyendo al control: 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm de cloruro de hidroxilamina; luego se procedió a realizar la siembra en placa a 37°C por 48 horas.

Diseño de los Biorreactores: Se diseñaron y construyeron cuatro biorreactores tipo Tanque Cilíndrico Aireado Agitado (TCAA) de dos litros de capacidad, con un volumen de trabajo de 1,4 L y flujos de aire de 0,5 vvm a 220 rpm de agitación. Para ello se empleó acero inoxidable, con tapas herméticas acondicionadas con orificios de salida de CO₂; la entrada de aire se realizó por la parte inferior de los tanques, y se colocó llaves para la toma de las muestras. Los biorreactores fueron esterilizados con luz UV por media hora, y el aire insuflado se esterilizó por burbujeo en una solución de NaCl al 30% (Mendoza & Robles, 2000).

Preparación del medio fermentativo y de recuento: Para la obtención del bioinsecticida se tomó como referencia un medio de producción a gran escala (Abarca *et al.*, 1992), el medio fermentativo se esterilizó en autoclave a 121°C/15 min. a 1 atm de presión. También, se preparó placas con Agar Nysma para el recuento que se realizó durante el bioproceso.

Estandarización del inóculo: Se obtuvo una suspensión densa de Bti mutante en solución salina fisiológica al 0,9% para cada tratamiento, a partir de ellas se hicieron diluciones hasta obtener una concentración de 10⁸ UFC/ml (Pescoran, 1998).

Inoculación de Bti mutante en los biorreactores: Se agregó 170 ml de la suspensión bacteriana del inóculo a cada uno de los biorreactores conteniendo 1230 ml de medio fermentativo, según los tratamientos considerados (ppm, la inoculación se llevó a cabo en agitación y aireación constante con un pH 7.0 a temperatura regulada (30±1°C).

Registro de datos: El bioproceso duró 48 horas, durante la fermentación se realizó muestreos cada 8 horas, incluyendo el tiempo cero, se tomaron 5 ml de medio fermentativo para evaluar pH, recuento de células por el método de recuento en placa. Se realizaron coloraciones con verde de malaquita modificado y Gram para el control microbiológico (Parry *et al.*, 1988).

Obtención del bioinsecticida: Una vez terminado el tiempo de fermentación, se centrifugó el medio fermentativo de los diferentes biorreactores a 2500 rpm por 45 minutos, eliminándose el sobrenadante. El precipitado se deshidrató a 40 °C por 7 días, la biomasa seca fue triturada y pesada. Se consideró como formulación insecticida al contenido total de esporas, cristales proteicos y residuos celulares, cuantificándose en gramos de peso seco por litro.

Análisis Estadístico: Con los datos obtenidos se realizaron los cálculos para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al peso seco del bioinsecticida y las concentraciones del agente mutagénico. Se utilizó el software libre R para realizar el análisis de varianza y la prueba de Comparación de medias, con una PE≤0.05.

Resultados

Los resultados de la investigación se evaluaron en función a los objetivos planteados. El pH se mantuvo prácticamente

constante con una ligera disminución de su valor inicial. En la figura 1, se observa la curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae), mostrando el desarrollo en UFC/ml de los 4 tratamientos con cloruro de hidroxilamina (0, 10, 20, 30 ppm), donde se puede notar que el tratamiento de 20 ppm de cloruro de hidroxilamina es el que presente los valores más altos de crecimiento y el tratamiento de 10 ppm posee los valores más bajos. En la Tabla 1, Se puede observar que los valores más altos de producción (2,05, 2,17 y 2,09) corresponden al tratamiento con 20 ppm de cloruro de hidroxilamina, mientras que los valores más bajos de pro-

ducción (0,99, 0,8 y 1) corresponden al tratamiento con 10 ppm de cloruro de hidroxilamina. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los promedios de producción de los tratamientos, se aplicó el Análisis de Varianza para un Diseño Experimental Completamente Aleatorizado con un nivel de confianza de 95%. El Análisis de varianza reporto diferencias significativas entre las medias de los tratamientos ($p \leq 0,05$). La prueba de comparación de medias de Tukey (Tabla 2) con un nivel de confianza de 95% indica que las medias de los 4 tratamientos presentan diferencias entre sí y no existe ningún grupo homogéneo.

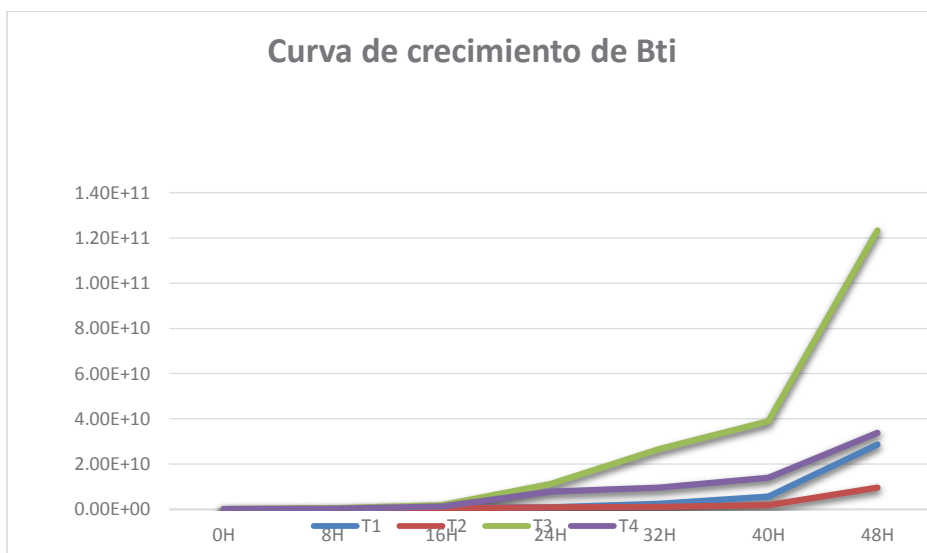


Fig. 1. Curva de crecimiento (UFC/ml) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, expuestas a 4 tratamientos con cloruro de hidroxilamina (0, 10, 20, 30 ppm.) evaluado cada 8 horas durante 48 horas. Leyenda: T1 = 0 ppm, T2 = 10 ppm, T3 = 20 ppm, T4 = 30 ppm de cloruro de hidroxilamina

Tabla 1. Producción (gr/L) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, expuestas a 4 tratamientos con cloruro de hidroxilamina (0, 10, 20, 30 ppm) evaluado a las 48 horas con 3 repeticiones cada uno.

	1	2	3
T1	1,19±0,03	1,26±0,03	1,22±0,03
T2	0,99±0,11	0,80±0,11	1,00±0,11
T3	2,05±0,06	2,17±0,06	2,09±0,06
T4	1,51±0,08	1,45±0,08	1,60±0,08

Leyenda: T1 = 0 ppm, T2 = 10 ppm, T3 = 20 ppm, T4 = 30 ppm de cloruro de hidroxilamina

1 = Primera repetición, 2 = Segunda repetición y 3 = Tercera repetición.

Tabla 2. Comparación de promedios aplicando la prueba Tukey para la producción (gr/L) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, expuestas a 4 tratamientos con cloruro de hidroxilamina (0, 10, 20, 30 ppm) evaluado a las 48 horas.

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T2	3	0.93	X
T1	3	1.22333	X
T4	3	1.52	X
T3	3	2.10333	X

P.E ≤ 0.05

Leyenda: T1 = 0 ppm, T2 = 10 ppm, T3 = 20 ppm, T4 = 30 ppm de cloruro de hidroxilamina

“X”: indica una diferencia significativa

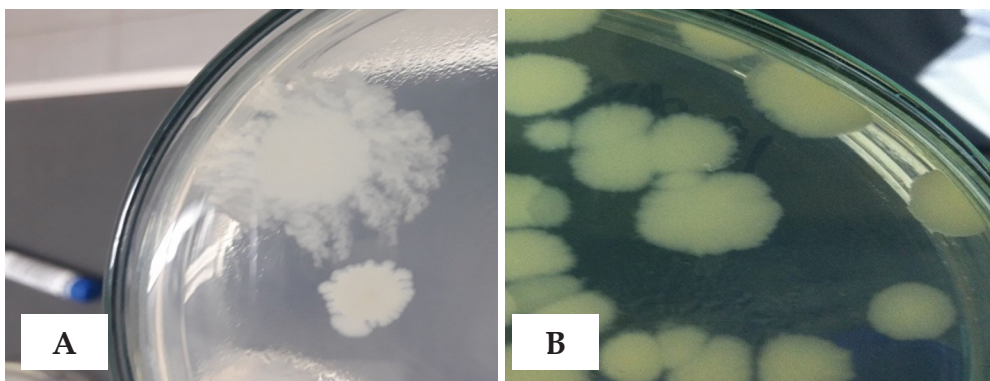


Fig. 2. A. Colonia de Bti que presenta cambios morfológicos debido a la exposición a 30 ppm de cloruro de hidroxilamina. B. Colonia de Bti del grupo control.

Discusión

Bacillus thuringiensis H-14 var. *israelensis* (Bti) es un microorganismo que se puede cultivar en fermentadores o biorreactores de tanque aireado y agitado que son eficientes ya que permiten una producción con menos contaminación, mejor calidad y alta transferencia de oxígeno (Zavaleta, 2010a). Se realizaron estudios a nivel de laboratorio, se demostró las características morfológicas de las colonias de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, las cuales presentan bordes irregulares, opacas de color cremoso, rugosas y sobrelevantadas. Esto corrobora lo sustentado por el trabajo de Zavaleta (2010a) que encontró las mismas características en algunas de las colonias expuestas a cloruro de hidroxilamina (Zavaleta, 2010b).

Es necesario tener en cuenta que los cambios fenotípicos observados se deberían a la acción del mutágeno utilizado, cloruro de hidroxilamina, el cual es un agente intercalante poderoso capaz de causar mutaciones de tipo transición GC - AT (Klug *et al.*, 2013; Polo, 1999; Griffith *et al.*, 2002) debiéndose a su acción específica a la hidroxilación del grupo amino ubicado en el carbono 4 de la citosina formándose N-4 hidroxicitosina la cual tiene un comportamiento similar a la timina, lo que va a determinar su nuevo apareamiento con la adenina, dicho apareamiento es incorrecto porque en la secuencia correcta debería aparearse con la guanina (Zavaleta, 2010b). Después de las replicaciones de ADN que ocurren antes de cada división celular, el cambio en el genotipo se hace notorio y evidente en el fenotipo.

El número de unidades formadores de colonias (UFC) de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* observados con intervalos de 8 horas mostro variaciones entre 4

tratamientos con cloruro de hidroxilamina (0, 10, 20 y 30 ppm), donde se puede notar que el tratamiento de 20 ppm de cloruro de hidroxilamina es el que presenta los valores más altos de crecimiento y el tratamiento de 10 ppm posee los valores más bajos. Con estos resultados se puede inferir que el cloruro de hidroxilamina presenta un efecto negativo en la producción fuerte a 10 ppm y 30 ppm, siendo 20 ppm la dosis que estimula en mayor medida la producción de colonias de Bti, esto concuerda con lo encontrado por Zavaleta (2010b) con cloruro de hidroxilamina en la misma bacteria. Adicionalmente, se probó una concentración mayor a 30 ppm resulto en una inhibición completa del crecimiento. Esto nos demuestra que el cloruro de hidroxilamina sobre el crecimiento de *B. thuringiensis* es inhibidor-estimulador-inhibidor completo, debido a esto se debe de usar una dosis única de mutágeno si se desea aumentar al máximo la producción del bioinsecticida.

El máximo rendimiento de producción del bioinsecticida de Bti al final del bio-proceso se logró a una concentración de 20 ppm de cloruro de hidroxilamina, con un peso seco promedio de 2,05, 2,17 y 2,09 g/L en sus tres repeticiones. Este resultado es mayor al conseguido por Abarca *et al.*, 1992 quien halló una producción final de 1,78 y 1,40 g/L de peso seco entre 24 y 48 horas de fermentación; sin embargo, estos valores podrían incrementarse después de las 56 horas (Blas *et al.*, 2017).

Los resultados conseguidos en el presente trabajo se encuentran por debajo de la producción del bioinsecticida de Bti obtenida por Blas *et al.* (2015), quien reporta 2,78 g/L de peso seco promedio. Esto se debería a la utilización de una fuente proteica adicional.

Los diferentes resultados en la producción del bioinsecticida de Bti mutante indicado con sus promedios fueron confirmados por el análisis de varianza. Consecuentemente, se hizo necesario aplicar un método más riguroso, específico y preciso, la prueba de comparación de medias. La producción de Bti mutante en la presente investigación es buena en comparación a otros trabajos. Por otro lado, las colonias de Bti mutante presentan poca estabilidad y los resultados hallados no son altamente reproducibles, por lo tanto, lograr la estabilidad del mutante es una finalidad a cumplir (Blas et al., 2017).

Conclusiones

Se logró la producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bacillaceae) por acción del cloruro de hidroxilamina.

El más alto rendimiento en la producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (2.10 g/L), se obtuvo a 20 ppm de cloruro de hidroxilamina

No existe una relación directa entre la producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* y la concentración de cloruro de hidroxilamina.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Trujillo por brindar las facilidades de uso de infraestructura y equipamiento para el desarrollo de la presente investigación.

Contribución de los autores

J. P., W.B., G.Z. y J.S.: Concepción, diseño, recolección de datos, revisión crítica del artículo y aprobación de la versión final. J.P. y W.B.: Análisis estadístico e interpretación de los resultados. L.P. y J.P.: diseño y simulación de funcionamiento del biorreactor. J.P., G.Z., K.V. y R.H.:

Bioproceso de producción de bioinsecticida y obtención de formulación bioinsecticida. Todos los autores han leído el manuscrito final y aprobado la versión.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Literatura citada

- Abarca, C.; A. Martínez; M. Caro & R. Quintero.** 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *aisawai*. Universidad: Ciencia y Tecnología.
- Blas, W.; G. Zavaleta; J. Saldaña; J. Pedro; P. Lezama & L. Tuesta.** 2015. Obtención de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante y producción de bioinsecticida por fermentación con sanguaza. Revista Científica Pakamuros, 2(2): 29–38. Recuperado de <https://www.unj.edu.pe/ojs/index.php/pakamuros/article/view/40/pdf%0D>
- Blas, W.; G. Zavaleta; J. Saldaña; J. Pedro; W. Blas & D. Meléndez.** 2017. Efecto biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* mutante sobre larvas III de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio. Sciendo, 37(2): 14–21. Recuperado de <http://revistas.unitr.u.edu.pe/index.php/facccbiol/article/viewFile/2137/2030>
- Carvalho, S.; M. Crespo; A. Araújo; R. Santana; M. Melo; C. De Maria & N. Lobo.** 2018. Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents, 1–11.
- Chavez, K.; & A. Garboza.** 2018. Efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus* sp. aisladas de humus sobre larvas de *Anopheles* sp. obtenidas en el distrito de Motupe, 2016. Universidad de Lambayeque. Recuperado de <http://repositorio.udl.edu.pe/handle/UDL/135>
- Griffith, A.; J. Miller; D. Susuki; R. Lewontin & W. Gelbart.** 2002. An introduction to Genetic Analysis. 7th. Ed. Edit. W. H. Freeman and Company. New York.
- Klug, W.; M. Cummings; C. Spencer & M. Palladino.** 2013. Conceptos de Genética. Edit. Prince Hall. 10ma. ed. Madrid. España.
- Lobo, K.; J. Soares; M. Silva; W. Tadei; R. Polanczyk & V. Pinheiro.** 2018. Isolation and molecular

- characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Revista Brasileira de Entomología*, 62(1): 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.11.004>
- Mendoza, L. & H. Robles.** 2000. Utilización de Sanguaza para la producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional de Trujillo. Programa de Gestión Ambiental. Trujillo. Perú. 1(1): 10-17.
- Parry, J.; P. Turnbull & J. Gibson.** 1988. A color atlas of bacillus species. Edit. Wolfe Medical Publications Ltd. Torrington Place. London WC1E7LT. England.
- Passarge, E.** 2004. Genética. Texto y Atlas. Edit. Med, Panamericana. S.A. 2da Ed. Buenos Aires-Argentina.
- Perunov, V.; V. Machkovakii; D. Iakovlev & E. Budovakii.** 1984. Effect of O – hydroxylamine on the transforming DNA form *Bacillus subtilis*. Correlation of chemical modifications with genetic consequences. *Biorg Khim.* 10: 1695-1697.
- Pescoran, M.** 1998. Efecto del pH y temperatura sobre la producción de bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis* en un medio de cultivo suplementado con “sanguaza”. Tesis para optar el título de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
- Pineda, C. & S. Vélez.** 2018. Optimización de las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*. Universidad de las Américas. Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9182/1/UDLA-EC-TIB-2018-12.pdf>
- Polo, E.** 1999. Efecto del cloruro de hidroxilamina en la producción de queratinasas por *Bacillus polymyxa* MIT-LVI, utilizando como sustrato plumas de aves. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
- Velásquez, L.; D. Rojas & J. Cerón.** 2018. Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2): 89–100.
- Zavaleta, G. 2010a.** Evaluación de la capacidad biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* cultivado en sanguaza sobre larvas de *Aedes aegypti* en el distrito de Laredo, La Libertad-Perú. 2008-2009. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
- Zavaleta, L. 2010b.** Efecto del cloruro de hidroxilamina sobre la viabilidad y crecimiento de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* bajo condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo. Universidad Nacional de Trujillo.

