



Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*

Orietta Fernández -Larrea Vega¹

Introducción

Las primeras enfermedades bacterianas en insectos fueron reportadas en 1870 por Pasteur. En 1911 d^o Herelle presentó el primer estudio de bacterias entomopatógenas en locústidos en México y aisló un pequeño bacilo, al cual dio el nombre de *Coccobacillus acridorium*. Desde 1921, se informó la presencia de "infecciones lechosas" en el escarabajo japonés *Popillia japonica*; en 1940 determinaron que los agentes causantes eran *Bacillus popilliae* y *B. lentimorbus*, y aunque se encontraron otras especies, éstas resultaron las más importantes junto con *Serratia marcescens*, causante de la muerte de varios grupos de insectos.

En 1901 Ishiwata informó la presencia de una bacteria cristalífera que causaba la enfermedad y muerte de larvas de algunos insectos. Diez años después, Berliner en Thuringia, Alemania, determinó que un bacilo esporulante y cristalífero, al cual denominó *Bacillus thuringiensis* (Bt), era el causante de la muerte de larvas de *Anagasta khuniella*. *B. thuringiensis* presenta un cristal parasporal de forma bipiramidal, romboide, cuadrado o amorfo, de naturaleza proteínica que es el responsable de la capacidad insecticida; su toxicidad es muy variada y depende del tipo de cristal.

El mecanismo de acción de esta bacteria es por ingestión y producto del pH alcalino del intestino del insecto, el cristal parasporal libera la toxina, la cual se asocia a puntos específicos de la membrana intestinal, formando poros que rompen la pared, a través de la cual ocurre una alteración del balance iónico, que lleva a la parálisis intestinal y cese de la alimentación. Posteriormente, y producto de una septicemia provocada por la multiplicación de la bacteria ocurre la muerte de las larvas, las cuales se tornan flácidas y con un exudado lechoso; estas larvas pueden posteriormente desintegrarse. *B. thuringiensis* resulta tóxico a varios órdenes de insectos, ácaros e incluso nematodos

Aunque varios grupos de bacterias han sido descritos como patógenas a insectos, sólo *B. thuringiensis* ha sido estudiada y utilizada ampliamente, por lo cual constituye una alternativa para el control de plagas. Los insecticidas derivados de esta bacteria constituyen el ejemplo más importante de este tipo de productos y ocupan la mayor parte del mercado mundial de bioinsecticidas. Estos productos se han utilizado comercialmente por más de 35 años y han sido aceptados como productos biodegradables y seguros para los vertebrados y el ambiente

Sin embargo, la posibilidad de producir y aplicar productos bacterianos a gran escala fue posible hasta después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se produjo en Francia el primer producto comercial a partir de *B. thuringiensis* llamado Sporiene.

Características y clasificación

B. thuringiensis pertenece a la familia Bacillaceae, y presenta células vegetativas en forma de bastoncillos más o menos largos, agrupados en cadenas de 2 a 3 células. Son Gram +, aerobias y esporógenas, durante su cultivo y asociadas a la formación de esporas, se forman cuerpos parasporales en forma de cristales que tienen efecto insecticida y se conocen como delta endotoxinas.

Para la clasificación de esta especie se han usado varios métodos. Los primeros se basaron en la caracterización morfológica y bioquímica, utilizando técnicas convencionales. Más tarde se desarrollaron esquemas de clasificación basados en el análisis serológico de antígenos flagelares (antígeno H) de células vegetativas. Se introdujo además el criterio de patrones electroforéticos de esterasas y de patrones plasmídicos dada la presencia de plásmidos como portadores de los genes que codifican para la toxinas cristalíferas.

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Playa, C. Habana Cuba. oflarrea@inisav.cu

El análisis de ácidos grasos se ha utilizado para la separación de cepas. Al final, la genética molecular permitió la clasificación de *B. thuringiensis*, ya que se demostró que los genes que codifican para la toxina cristal, los cuales están localizados en plásmidos, tienen una correlación estrecha con la toxicidad fenotípica. La clasificación por antígenos flagelares aún es útil, y hasta el momento se han logrado identificar 55 serotipos. Esta clasificación no permite correlacionar la cepa con la actividad patogénica, la cual está determinada por el tipo de delta endotoxina. La clasificación basada en los genes que codifican estas toxinas, a los cuales se denominan genes CRY, están basados en cinco grupos fundamentales, de los cuales se han caracterizado varias decenas de subgrupos que permiten establecer una correlación con la actividad insecticida.

Toxinas de *B. thuringiensis*

Heimpel en 1967, consideró tres exotoxinas y una endotoxina, esta última es la principal responsable del efecto insecticida. Entre las exotoxinas la más importante es la beta, conocida también como thuringensin, seguidas en importancia por la alfa y la gamma.

Existen diferentes tipos de delta endotoxinas y, cada una de ellas se asocia a un grupo determinado de insectos. Sus pesos moleculares varían entre 72 y 135 Kdaltons y su composición es proteínica, por lo cual se desnaturalizan por el calor y son solubles en condiciones alcalinas.

Las beta exotoxinas son solubles en agua, termoestables y dializables; su estructura química es un derivado fosforilado del nucleótido de adenina. Se han encontrado varios tipos de beta exotoxinas y a diferencia de las delta, éstas no son producidas por todas las cepas de *B. thuringiensis*. Su producción se asocia con algunos serotipos como H1, H4, H8, H9 y H10.

Las exotoxinas alfa y gamma se consideran fosfolipasas C y lecitinasas, respectivamente.

En relación a la toxicidad, la delta se considera no tóxica; sin embargo, algunas investigaciones señalan que las beta pueden tener efectos citotóxicos a determinadas concentraciones, por lo cual el empleo de productos de *B. thuringiensis* a partir de cepas que producen este tipo de toxina están sujetos a regulaciones adicionales.

Recientemente, se ha descrito un cristal proteínico más pequeño, de peso molecular de 28 Daltons, que no está relacionado con los genes CRY y presenta baja toxicidad a mosquitos y sólo lo producen las variedades *morrisoni*, *israelensis*, *darmstadiensis*, *kyushiensis*; el gen Cyt la codifica.

Las delta endotoxinas se producen en forma de cuerpos de inclusión o cristales paraesporales y forman una familia de proteínas cuyos miembros pueden ser tóxicos contra diversos grupos de invertebrados: seis ordenes de insectos, nematodos, ácaros, platelmintos y protozoos.

Principales grupos de genes Cry en *B. thuringiensis*

Cry I Lepidópteros
Cry II Lepidópteros y Dípteros
Cry III Coleópteros
Cry IV Dípteros
Cry V Lepidópteros y coleópteros.

En 1989, Hofte y Whiteley propusieron una nomenclatura y clasificación de las proteínas Cry basados en la similitud de su secuencia de aminoácidos y el rango de especificidad. En esos años, las proteínas Cry I, Cry II, Cry III, Cry IV eran las específicas contra lepidópteros, lepidópteros-dípteros, coleópteros y dípteros, respectivamente. Las clases V y VI, activas contra nematodos, fueron consideradas posteriormente en la clasificación por Feitelson y colaboradores en 1992. En 1998, Schnepf y colaboradores propusieron una nueva clasificación basada solamente en la similitud de secuencias primaria entre las proteínas Cry.

La nomenclatura actual de las toxinas Cry las agrupa como: 1. proteínas tóxicas a lepidópteros grupos Cry1, Cry2 y Cry9; 2. toxinas activas contra coleópteros grupos Cry3, Cry7 y Cry8; 3. proteínas con actividad dual grupos Cry1B y Cry11; 4. proteínas con actividad nematocida, grupos Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14; 5. proteínas tóxicas a dípteros, grupos Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las Cyt.

La búsqueda y caracterización de nuevos genes *cry* continúa siendo un proyecto de interés mundial, porque este conocimiento proporciona nuevas alternativas para el control de las diversas plagas y quizás contribuiría a solucionar el problema del desarrollo de resistencia por parte del insecto. Estos estudios han estimulado el desarrollo de técnicas moleculares para caracterizar de manera fácil y rápida los genes *cry* presentes en los aislamientos de *B. thuringiensis*. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido las más utilizadas en los últimos años, permitiendo la determinación precisa de los genes *cry*. La identificación de genes *cry* conocidos en las cepas de *B. thuringiensis* es muy importante por-

que pueden contribuir a la selección de nuevos aislamientos y a la determinación de la especificidad de los nuevos aislamientos. La Beta exotoxina se produce durante la fase de crecimiento exponencial por algunas variedades de *B. thuringiensis*. Esta fue descubierta por Cantwell y colaboradores al inyectar el sobrenadante esterilizado de un cultivo de *B. thuringiensis* en el hemocele del último instar larvario de *Galleria mellonella*. Su aislamiento y caracterización fue realizado por De Barjac y Dedonder entre 1965 y 1968 y en estudios posteriores utilizando resonancia magnética nuclear se corroboró su peso molecular aproximado de 700 Da y su estructura química, la cual fue definida como un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a un ácido fosfoalárico. Una característica de este compuesto sobre la base de su estructura química es su espectro de absorción ultravioleta, el cual presenta una absorción máxima a 260 nm y una absorbancia mínima a 230 nm.

A las Beta exotoxinas se les atribuye acción biológica contra diferentes grupos de organismos entre los que se encuentran coleópteros, ácaros y nematodos. Se han informado efectos genotóxicos de estas toxinas; sin embargo, estudios posteriores muestran que el grado de genotoxicidad no es igual para todas las Beta exotoxinas. Existen diversos métodos de detección para este compuesto, pero la mayoría son complejos y requieren siete días como mínimo para obtener resultados, como en el caso de los bioensayos con larvas de *Musca domestica* L. Esto hace necesario encontrar métodos sencillos de detección de esta toxina, lo cual sería de gran utilidad en los programas de caracterización de cepas de *B. thuringiensis*, así como para el registro de cepas de importancia comercial.

Las toxinas Vip descritas recientemente por Estruch y colaboradores se producen durante la fase de crecimiento logarítmico vegetativo, antes y durante la esporulación por algunas cepas de *B. thuringiensis*. Esta proteína muestra toxicidad hacia una amplia variedad de lepidópteros plaga, entre los que se encuentran *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua* y *Helicoverpa zea*. Estas toxinas Vips no presentan homología con las toxinas Cry y Cyt conocidas. La localización de los genes que las codifican en el genoma de *B. thuringiensis* aún no se ha determinado, pero se considera que se encuentran en los mismos plásmidos que contienen los genes de las proteínas Cry. La proteína Vip3A puede ser detectada 15 h después del inicio del cultivo, y alcanza su nivel máximo durante las etapas tempranas de la fase estacionaria y sus niveles

permanecen altos durante y después de la esporulación. Se considera que pueden estar asociadas a algunos efectos patogénicos que en ocasiones no corresponden con los patrones de genes *cry* presentes en un determinado aislamiento. Las propiedades biológicas y moleculares de las proteínas Vip han mostrado un nuevo agente insecticida que podría complementar y ampliar el uso de las toxinas derivadas de *B. thuringiensis*.

Mecanismos de acción

Como se mencionó, estas toxinas deben ser ingeridas por el insecto sensible, cuyo intestino tiene un pH elevado, lo cual es esencial para la disolución de muchas protoxinas de *B. thuringiensis*. Estas son solubles solamente con pH superiores a 9,5. Las protoxinas son activadas por proteasas del intestino, las cuales llevan las protoxinas de 130 kDa a una toxina de 55-65 kDa, resistente a proteasa y que comprende la región N terminal de la protoxina.

La especificidad de la delta endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos, la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales y el próximo paso es la formación de un poro o lesión en esta membrana que conduce a una variación en su permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto. Por otra parte, las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas.

En el caso de las Beta exotoxinas, éstas interfieren con las síntesis de ADN y ARN y las proteínas y resultan menos específicas.

Resistencia por parte del insecto a *B. thuringiensis*

La habilidad de los insectos para sobreponerse y adaptarse al estrés ambiental hace que los métodos de control se vuelvan ineficientes, como sucede con el uso excesivo de algunos plaguicidas.

Hasta el momento aparecen pocos informes de resistencia a *B. thuringiensis*. Dos ejemplos son *Plutella xylostella* en repollo en Asia y *Plodia interpunctella*, plaga de productos almacenados. En el laboratorio se ha demostrado la posibilidad de que el insecto desarrolle resistencia al uso continuado de *B. thuringiensis*,

sobre todo a las delta endotoxinas, porque para la beta exotoxinas el efecto es mucho menor

Es importante señalar que los resultados de laboratorio no pueden extrapolarse a las condiciones de campo, porque las condiciones ambientales y la presión de selección natural juegan un papel importante.

La resistencia por parte del insecto a *B. thuringiensis* se explica por vía bioquímica, fisiológica y de conducta. En el primer caso, el insecto llega a metabolizar las toxinas, en el segundo parece existir una disminución de sensibilidad en los receptores y en el tercero disminuye la habilidad del insecto para aceptar el insecticida.

Se han desarrollado diferentes estrategias para disminuir la posible resistencia a esta bacteria. Una de las más utilizadas es su uso en programas de manejo integrado. Otra estrategia es el uso de productos a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, con diferentes tipos de deltaendotoxinas.

Producción de *B. thuringiensis*

En biotecnología son utilizados dos tipos de producciones básicas: cultivos superficiales sobre medios sólidos o semisólidos y producción en medios líquidos superficiales o sumergidos.

Uno de los aspectos más importantes de *B. thuringiensis* es su producción a escala industrial. La primer etapa, la cual es una de las más importantes de este proceso, es la selección y conservación de las cepas de trabajo. En muchos países se desarrollan programas de prospección de nuevos aislamientos de la bacteria para ampliar su espectro y aumentar su capacidad insecticida.

El mantenimiento y conservación de las cepas seleccionadas es una garantía del éxito del proceso y del producto final. Para la conservación se emplean diferentes métodos, entre los más utilizados están la liofilización, suelo estéril, papel de filtro, medio agarizado, etc. Lo más importante es evitar los subcultivos continuos, porque se puede perder la virulencia y podrían aparecer poblaciones acristalíferas.

El desarrollo del producto a partir de la cepa seleccionada comienza con la preparación de los inóculos, los cuales se obtienen generalmente en zarandas mediante cultivos líquidos agitados y a partir de éstos se realizan 1 o 2 subcultivos en fermentadores de menor volumen, dependiendo de la magnitud del volumen final de trabajo. Se recomienda que los inóculos tengan una concentración inicial de 10^6 células /ml.

Pueden utilizarse cultivos totalmente esporulados o en fase de crecimiento exponencial, pero no es recomendable utilizar otros instares porque los cultivos obtenidos no serían homogéneos.

La composición del medio de cultivo es muy importante porque es necesario ajustar el balance de los nutrientes, principalmente carbono y nitrógeno para obtener una concentración elevada de biomasa bacteriana y una buena cantidad de cristales tóxicos. Otros nutrientes también son importantes, tales como las sales de magnesio, manganeso, carbonatos y fosfatos.

Como fuentes nitrogenadas se utilizan harinas de soya, maíz, trigo y pescado entre otras y como fuentes de carbono se emplean principalmente almidones y en ocasiones melazas.

El valor de pH es un parámetro importante y aunque generalmente se deja libre durante el proceso, es necesario ajustar los medios de cultivo para que no sea menor a 5,0. En general, el pH inicial debe ser de 6,8-7,2, pero baja después de las primeras 8-12 h, hasta llegar a 5,0. Posteriormente, se incrementa lentamente y al final el proceso tiene un valor aproximado de 8,0. Esta cinética es un buen indicador del proceso.

Durante el proceso de producción de *B. thuringiensis* es importante considerar el suministro de oxígeno porque esta bacteria requiere un elevado nivel de este gas, en especial durante la fase de crecimiento exponencial. Esta demanda disminuye durante la esporogénesis y en la etapa de lisis del esporangio y liberación de la delta endotoxina. Esto permite disminuir el suministro de aire en la etapa final de la producción, lo que representa una economía en el proceso.

Cuando se eleva el suministro de oxígeno y dado que se utilizan medios de cultivo ricos en proteínas, existe el riesgo de que se produzca un exceso de espuma; por lo cual es necesario, en ocasiones, adicionar antiespumantes. Esto debe hacerse con cuidado y el antiespumante seleccionado no debe afectar el desarrollo de la bacteria. Además un exceso de este producto puede crear una anaerobiosis parcial con detrimento de la calidad del proceso. También puede ocasionar problemas durante el recobrado y la formulación.

Los procesos industriales se realizan en grandes fermentadores y el recobrado mediante procesos de sedimentación, filtración o centrifugación, este último es el más eficiente.

Producción sólida de *B. thuringiensis*

Husz en 1931 utilizó un medio sólido y métodos estándares de laboratorio, mezclando esporas de *B. thuringiensis* de 224 cajas de Petri con 6 kg de talco para la producción de polvos. Steinhaus y Hall en 1951 y 1954 produjeron *B. thuringiensis* en cajas con agar. Actualmente, se desarrollan los métodos de producción por cultivo sumergido, los cuales son más eficientes, económicos, permiten la producción a mayor escala, con menos contaminación y mejor control de la calidad.

En China, la producción por cultivo sumergido se realiza en forma industrial y sobre sustratos sólidos a pequeña escala, en forma artesanal. También utilizan bandejas o frascos con medios líquidos en condiciones de cultivo estático

B. thuringiensis es producido en forma sólida, semisólida y por cultivo sumergido o líquido estático; sin embargo, la producción a escala comercial se realiza por fermentación sumergida en grandes tanques que contienen medio de cultivo.

En los medios semisólidos, la humedad debe controlarse muy bien para asegurar el desarrollo del microorganismo sin provocar agregación de las partículas y con una adecuada transferencia de oxígeno. La producción semisólida de esta bacteria en China permite obtener cantidades importantes del microorganismo, pero con menor eficiencia que por cultivo sumergido y sólo a escalas limitadas de producción. Otro de los aspectos negativos es la esterilidad durante el proceso de producción. Mantener condiciones uniformes durante el proceso y ajustar parámetros como el pH y la temperatura resultan difíciles en los medios sólidos y semisólidos. Por tanto, se considera que el mejor método de producción es el cultivo sumergido.

Formulaciones y limitaciones de uso de *B. thuringiensis*

Los tipos de formulaciones de esta bacteria son polvos humedecibles, polvos secos, granulados o emulsiones. Las formas secas son más estables durante su almacenamiento, mientras que las líquidas resultan más económicas.

A pesar de las ventajas de los productos de *B. thuringiensis*, éstos también presentan algunas limitaciones como: poca persistencia en el campo, no llega a todos los nichos ecológicos y el insecto puede desarrollar resistencia.

No obstante, estos problemas pueden solucionarse

mediante formulaciones más estables, el uso de cepas recombinantes y mejorar las estrategias de aplicación.

Mercado

Se considera que más del 90% de los productos biológicos utilizados actualmente en la agricultura son *B. thuringiensis*. Las ventas de estos productos en el año 2000 fueron de casi US\$ 200 millones. Algunos de los productos de *B. thuringiensis* son: Bitoxibacillín, Ek-sotoxin, Agritol, Bactospeine, Bathurin, Biospor, Dipel, Javelin, Sporeine.

En algunos países, el acceso a estos productos es aún limitado para los pequeños agricultores sobre todo por el costo elevado del producto y la falta de información sobre sus potencialidades y ventajas.

Producción de *B. thuringiensis* en Cuba

Este entomopatógeno se produce utilizando tres métodos: cultivos líquidos estáticos, sobre sustratos sólidos y por cultivo sumergido. Los primeros se obtienen en laboratorios llamados CREE (Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos), distribuidos en todo el país.

El proceso sobre cultivo líquido estático consiste en cultivar la bacteria en medios líquidos compuestos por subproductos agrícolas o industriales, principalmente de la industria azucarera. La composición de los medios puede variar y generalmente se adapta a las posibilidades de la región donde se ubica el Centro Productor. Se emplean frascos de cristal y se agrega al medio de cultivo en una relación 1:5. Después de esterilizados e inoculados, se mantienen en reposo a 28-30 °C durante 10-15 días, dependiendo de la cepa y del medio de cultivo utilizado. Transcurrido este tiempo, se cosecha el producto y se le agrega un preservante que permite su almacenamiento hasta por tres meses, a temperaturas no superiores a 25 °C. Con esta producción se obtienen concentraciones de esporas y cristales de 10^8 /ml. Su costo de producción es de US\$2-3/L.

La producción sobre sustrato sólido usando arroz es otra alternativa artesanal de producción de *B. thuringiensis*. Este proceso tiene una primera fase de propagación de la bacteria en un medio líquido compuesto por diferentes nutrientes y sales. Una vez desarrollado el cultivo inicial, en condiciones estáticas o en zaranda hasta la fase de esporulación, éste se utiliza para inocular el arroz previamente esterilizado y distribuido en los frascos de reproducción. Du-

rante esta etapa se debe ajustar la humedad a un nivel que permita el desarrollo de la bacteria. Al inocular, además de las esporas y cristales se incluyen residuos del medio de cultivo del inóculo que no fueron totalmente agotados durante la primera etapa de propagación y que favorecen el desarrollo de la bacteria sobre el sustrato sólido. La incubación después de 5-7 días permite la nueva propagación de la bacteria hasta la formación de esporas y cristales. En esta etapa se realiza la cosecha y se mantiene durante 48-72 horas en un cuarto a menos de 20 °C y un deshumificador para eliminar la humedad residual del producto. Una vez seco, el producto se envasa en bolsas plásticas y se almacena durante 3 meses a 20-25 °C. Para utilizarlo es necesario resuspender los granos de arroz en agua y filtrar por una malla o tamiz .

El otro método usado en Cuba para reproducir *B. thuringiensis* es el industrial y se realiza en tres plantas de fermentación ubicadas en el occidente y centro del país. Por este proceso se obtienen productos concentrados por sedimentación. El proceso tarda entre 72 y 96 horas, los productos alcanzan concentraciones de esporas y cristales de $4-6 \times 10^9$ equivalente a 18000-22000 UI(m), y es posible almacenarlos durante 6 meses a temperatura ambiente, inferior a 28 °C. Su costo de producción es de aproximadamente US\$ 2-3/ producto concentrado.

Actualmente en Cuba, se obtienen cuatro líneas de productos de *B. thuringiensis* bajo el nombre genérico de thurisav, con los cuales se controlan diferentes plagas de lepidópteros en cultivos de importancia económica. También se produce un producto eficaz para

el control de diferentes especies de ácaros plagas como el ácaro rojo de plátano y el ácaro del moho de los cítricos.

El control de la calidad de los productos se realiza mediante la aplicación de normas y programas, que garantizan la obtención de productos de calidad establecida.

Literatura consultada

- Bernhad, K; Utz, R. 1993. The production of *B. thuringiensis* for experimental and commercial uses. In An environmental Biopesticides. *Enstwiwlw*. p. 255-263.
- Burges, HD. 1981. Microbial control of pest and plants diseases. London, Academy Press. p. 108-201.
- Cory JS; Bailey, MJ. 1993. Theory and Practice of biopesticide. In An Environmental Biopesticides. *Enstwiwlw* p. 250-256.
- Crickmore, N; Zeigler, DR; Feitelson, J; Schnepf, E; Rie, J van; Lereclus, D; Baum, J; Dean, DH; van Rie, J. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):807-813.
- Estruch, JJ; Warren, GW; Mulling, MA; Nye, GJ; Craig, JA; Koziel, MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 93(11):5389-5394.
- Feitelson, JS; Payne, J; Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technol*. 10(3):271-275.
- Fernández-Larrea, OA. 1999. Review of Bt production and use in Cuba. *Biocontrol News and Information* 20(1):47-49.
- Galán, JL; García, SS; Santos, ME; Quintero, I. 1996. Avances recientes en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Monterrey, México, Universidad de Nuevo León.
- Ibarra, J. 1997. Producción, control de calidad y uso de *B. thuringiensis* In II Curso Taller de Producción Nacional de Agentes de Control Biológico (1997, Tecomán, Colima, México). Memorias. p. 86-96.
- Kostichka, K; Warren, GW; Mullins, M; Mullins, AD; Craig, JA; Koziel, MG; Estruch, JJ. 1996. Cloning of a cryV-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the cryV-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J-Bacteriol*. 178(7):2141-2144.
- Manual metodológico para la producción de Entomófagos y Entomopatógenos. 1991. Cuba, INISAV-CNSV- MINAGRI. 45 p.
- Vanderkar, M; Dulmage, H. 1982. Guidelines for production of *B. thuringiensis*. In Proceedings of Consultation. Suiza. p. 95-115.
- Yu-Cao Guo; Mullins-MA; Warren-GW; Koziel-MG; Estruch-JJ; Yu-CG. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied-and-Environmental-Microbiology*. 63(2):532-536.