

Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Bacillus thuringiensis* aislados de cultivos de *Capsicum* sp., sobre *Fusarium oxysporum*

Evaluation of the biocontrol capacity of *Bacillus thuringiensis* isolated from *Capsicum* sp., crops against *Fusarium oxysporum*

Diana Lucía Vanegas-Padilla¹, Pedro José Fragoso-Castilla², Angélica Patricia Vanegas-Padilla³

Resumen

Introducción. La producción de ajíes en Colombia supera las 100.000 toneladas anuales, sin embargo, el rendimiento de *Capsicum* spp., ha disminuido, influido por plagas y enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, que causan pérdidas superiores al 40%. El control químico, aunque ampliamente utilizado, conlleva riesgos significativos tanto para el medio ambiente como para la salud humana, además de generar resistencia en microorganismos. El uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se perfila como alternativa biológica eficaz, **Objetivo.** Evaluar la capacidad biocontroladora de *Bacillus thuringiensis* aislados de suelos cultivados con plantas de *Capsicum* sp., en el municipio de San Diego, Cesar, sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. **Metodología.** La ejecución de este proyecto se desarrolló en tres fases. En la Fase I, se recolectaron y procesaron muestras de suelo de cultivos de ají para aislar colonias de *Bacillus thuringiensis*. En la Fase II, se caracterizaron los aislados mediante análisis macroscópicos, microscópicos y bioquímicos, además de la identificación molecular mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). En la Fase III, se evaluó la actividad antagónica de los aislados de *Bacillus thuringiensis* sobre *Fusarium oxysporum*, realizando la medición de los halos de inhibición del crecimiento. Se aplicaron análisis estadísticos para evaluar diferencias significativas entre los aislados. **Resultados.** Se seleccionaron exitosamente aislados de *Bacillus thuringiensis* de muestras de suelo cultivadas con *Capsicum* sp., utilizando técnicas de aislamiento efectivas de enriquecimiento, superior al uso de acetato de sodio.

1. Profesional Microbiología Esp - Investigador Grupo de Investigación Parasitología Agroecología Milenio. Universidad Popular del Cesar, Valledupar, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6561-207X>

2. Profesional en Bacteriología MSc. PhD Docente de carrera e investigador, Líder Grupo de Investigación Parasitología Agroecología Milenio, Universidad Popular del Cesar, Valledupar, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3437-8664>

3. Profesional en Ingeniería Ambiental MSc. PhD Docente Investigador, Universidad Popular del Cesar, Valledupar, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5087-6172>

Correspondencia: dianavanegas1691@hotmail.com

Los aislados mostraron características típicas de (Bt). como bacilos grampositivos con esporas subterminales y cristales proteicos Cry, confirmados por observaciones con microscopía electrónica de barrido (SEM). Las pruebas bioquímicas verificaron su capacidad de fermentar glucosa y sacarosa y la producción de proteasas y amilasas. Las pruebas de antagonismo revelaron una capacidad variable de inhibir *Fusarium oxysporum*, destacando los aislados SAN 001 y SAN 004.

Palabras clave: Antagonismo, Aislamiento, Control biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Fusarium oxysporum*.

Abstract

Introduction. The production of chili peppers in Colombia exceeds 100,000 tons per year; however, the yield of *Capsicum* spp. has decreased due to the influence of pests and diseases caused by phytopathogenic fungi, leading to losses of over 40%. Chemical control, although widely used, poses significant risks to both the environment and human health, in addition to generating resistance in microorganisms. The use of *Bacillus thuringiensis* (Bt) emerges as an effective biological alternative. **Objective.** To evaluate the biocontrol capacity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils cultivated with *Capsicum* sp. plants in the municipality of San Diego, Cesar, against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Methodology.** This project was carried out in three phases. In Phase I, soil samples from chili crops were collected and processed to isolate *Bacillus thuringiensis* colonies. In Phase II, the isolates were characterized through macroscopic, microscopic, and biochemical analyses, as well as molecular identification using mass spectrometry (MALDI-TOF). In Phase III, the antagonistic activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against *Fusarium oxysporum* was evaluated by measuring the inhibition halos of fungal growth. Statistical analyses were applied to assess significant differences between isolates. **Results.** *Bacillus thuringiensis* isolates were successfully selected from soil samples cultivated with *Capsicum* sp., using effective enrichment isolation techniques, which outperformed the use of sodium acetate. The isolates exhibited typical Bt characteristics, such as Gram-positive bacilli with subterminal spores and Cry protein crystals, confirmed through scanning electron microscopy (SEM) observations. Biochemical tests verified their ability to ferment glucose and sucrose, as well as their production of proteases and amylases. Antagonism tests revealed a variable capacity to inhibit *Fusarium oxysporum*, with isolates SAN 001 and SAN 004 standing out.

Keywords: Antagonism, Isolation, Biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Fusarium oxysporum*.

Introducción

La producción de ajíes y pimientos en Colombia supera las 100.000 toneladas anuales, con un crecimiento significativo en el área cosechada desde 2011 hasta 2021 (1). Bolívar es el principal productor con un 28,87%, seguido por Magdalena (15,80%) y Córdoba (13,94%), mientras que otros departamentos presentan participaciones menores al 4,05% (2). El rendimiento de *Capsicum* spp., ha disminuido en los últimos años, pasando de 166,550 en 2017 a 126,584 en 2021 (1). Factores como plagas, enfermedades, calidad del suelo y baja adopción de tecnologías afectan la producción (3). Entre las principales enfermedades fúngicas están la pudrición por *Phytophthora* y *Sclerotium* en climas cálidos y fríos moderados (4), además de *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* y otras que pueden causar pérdidas superiores al 40%

(5-6-7). El control fitosanitario convencional con químicos sintéticos ha generado problemas ambientales, resistencia en microorganismos y un alto costo económico (8-9). Solo el 10 al 40% de los agroquímicos aplicados es absorbido por las plantas, generando un impacto residual mayor al 50% (10-11). Esto ha impulsado el uso de alter-

nativas biológicas, como *Bacillus thuringiensis* (Bt), reconocido por su efectividad en el control de plagas en cultivos como maíz, soja, arroz y papa (12-13). El agotamiento de recursos y la contaminación han motivado un enfoque sostenible en la agricultura (14-15). El uso de microorganismos en la producción agrícola, en especial (Bt), permite reducir el uso de pesticidas sintéticos, mejorando la salud del suelo y los cultivos (16-17). Además, se ha resaltado que diversas bacterias, incluidas las anaerobias, participan activamente en procesos como la hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis, esenciales en la degradación de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes, lo cual fortalece la sostenibilidad de los agroecosistemas (57).

Diversos estudios han investigado el potencial biocontrolador de especies del género *Bacillus* contra fitopatógenos como *Fusarium* sp., en este contexto, Castañeda Álvarez E, Sánchez LC (18) reportan la evaluación del crecimiento de cuatro especies nativas de *Bacillus* sp. en Medio Mínimo de Sales (MMS) a pequeña escala (10 ml), con el propósito de comprender su capacidad antagonista. A través de espectrofotometría, recuento en placa y pruebas de antagonismo dual, lo que dio como resultado la identificación de aislamientos como

Bacillus licheniformis, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus cereus*, los cuales demostraron actividad antagónica in vitro. Estudios similares reportados por Corrales y colaboradores (19) quienes centraron su estudio en evaluar el potencial biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., en condiciones de invernadero aplicado al cultivo de tomillo, llevando a cabo el aislamiento y la identificación del patógeno, realizando pruebas de antagonismo en placa y ensayos en plantas de tomillo bajo condiciones de invernadero, cuyos resultados indicaron que *Fusarium pseudonygamai* era el responsable de la enfermedad, y el tratamiento con *Bacillus* UCMC (B2) demostró ser el más efectivo tanto in vitro como en condiciones de invernadero. Este hallazgo sugiere que *Bacillus* UCMC (B2) posee un significativo potencial biocontrolador contra *Fusarium* sp., en plantas de tomillo bajo estas condiciones específicas, estas evidencias refuerzan el papel del género *Bacillus* como una herramienta prometedora en el control biológico de *Fusarium* sp.

Además, investigaciones recientes han explorado sustancias con potencial antifúngico complementario, como el sulfato de zinc, que en concentraciones del 5% y 7% logró inhibir completamente el crecimiento de *Candida albicans* e incluso causó lisis celular, demostrando su posible aplicación como agente antimicótico en estudios preliminares (56).

Adicionalmente, algunas cepas de *Bacillus* han demostrado capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, como lo es la solubilización de fosfatos, lo cual amplía su utilidad agrícola al actuar también como biofertilizantes (55).

Investigaciones recientes han resaltado la capacidad de *Bacillus* spp. para promover el crecimiento vegetal mediante la producción de fitasas y nitrogenasas, enzimas que permiten la solubilización de fósforo y la fijación de nitrógeno atmosférico, funciones claves para su aprovechamiento como biofertilizante sostenible (59).

Esta investigación se centra en el aislamiento de *Bacillus thuringiensis* en suelos cultivados con *Capsicum* sp., en San Diego, Cesar, para evaluar su capacidad en el control natural de hongos patógenos, dada la importancia nutricional y productiva de este cultivo en Colombia

Metodología

Fase I. Aislamiento de cepas *Bacillus thuringiensis*

Recolección y procesamiento de las muestras de suelo

Para la toma de cinco muestras de suelo cultivados con plantaciones de ají (*Capsicum* sp), se descartó la capa superficial del

suelo sin superar los 5 cm de profundidad, las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas estériles y almacenadas en una nevera hielera de icopor, bajo un rango de temperatura entre 0°C y 4°C, hasta su traslado al laboratorio (20-13-21-22).

Posterior al almacenamiento y transporte de las muestras, se procedió al desembalaje y rotulación de los materiales. Seguido de ello, en una balanza se pesaron 10 gramos de suelo y se agregaron en frascos de vidrio tapa rosca, que contenían 90 mililitros de caldo nutritivo tal como lo propone Gillis & Santana (23). No obstante, este procedimiento se hizo por duplicado, en el cual, al duplicado se le adicionó acetato de etilo al 0.25M. Luego, en un shaker, los frascos se sometieron a agitación orbital de 250 rpm a 30°C durante 4 horas. Pasado el tiempo de pre-enriquecimiento, los frascos se sometieron a choque térmico, que consistió en introducir en un baño maría a 80 °C durante 5 minutos, y luego colocarlos en hielo con gel refrigerante dentro de una nevera de poliestireno expandido (Icoport) durante 5 minutos (24-25-26-22). Posteriormente a que se atemperaron los frascos, se hizo por duplicado diluciones seriadas de 10-1 a 10-4, agregando 1 mililitro de cada frasco en tubos con 9 mililitros de solución salina, para así poder lograr concentraciones de 1:10 por cada tubo. Seguidamente, mediante la técnica de siembra en placa por profundidad, se procedió a agregar 1 mililitro de cada tubo previamente agitado en

dos (2) cajas de petri rotuladas. Inmediatamente, a cada caja se le adicionaron aproximadamente 25 ml de agar nutritivo y se agitó 5 veces en dirección a la manecilla del reloj y 5 veces en contra de la manecilla del reloj. Luego, cuando el medio solidificó, con la tapa hacia abajo (la caja al revés), se incubaron a 30°C entre 18 a 24 horas (20-27-28-29).

Fase II. Caracterización microscópica, bioquímica y molecular de los aislados de *Bacillus thuringiensis*

Selección de cepas y microscopía

Inicialmente, se tuvieron en cuenta las características macroscópicas de cada cepa, las cuales se percibieron por su forma, estructura, color, textura y tamaño. Luego, se seleccionaron las cepas que presentaron características típicas de *B. thuringiensis* como colonias pequeñas y en algunos casos, grandes, circulares con borde irregular, perfil plano y color marfil claro (30-31-32-33). Cabe mencionar que para lograr la identificación de las estructuras celulares de las cepas seleccionadas, se emplearon dos métodos: Primero, por microscopía óptica a 100X con ayuda de colorantes como cristal violeta y safranina para describir el tipo de pared celular (tinción de Gram), además de la tinción con vapores de verde de malaquita para observar las esporas y su ubicación, estructuras sexuales de

resistencia, así como patrones de agrupación celular (34-30-20-31) estos se cuantificaron mediante observación en microscopio óptico Nikon (100X), asignando:

- (+): 1-10 cristales y esporas por campo óptico.
- (++): 10-20 cristales o esporas por campo óptico.
- (+++): Más de 20 cristales ó esporas por campo óptico.

Las cepas que presentaron más de 20 cristales por campo óptico, se les realizó un segundo análisis mediante observación microscopía electrónica de barrido (SEM) tal como lo propone Ramírez (33).

Adquisición de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL JSM-6490LV, con el objetivo de observar la superficie de las muestras con gran detalle y resolución, para obtener imágenes tridimensionales de alta calidad, los principios operativos y las características de este equipo consistieron en la emisión de un haz de electrones de alta energía desde un cañón de electrones hacia la superficie de la muestra, cuando el haz de electrones impactó en la muestra, se generaron diferentes tipos de señales, como electrones secundarios y retrodispersados,

las señales emitidas por la muestra fueron detectadas por diferentes tipos de detectores, lo que permitió formar una imagen de la superficie y la obtención del relieve, la textura y las características morfológicas de la muestra con una gran profundidad de campo y resolución (35). El proceso de preparación de las muestras se realizó en los siguientes pasos:

1. Fijación con glutaraldehído al 2.5% (1 hora)
2. Tres (3) lavados con PBS salino (salina tamponada con fosfato) de 15 minutos
3. Fijación con tetroxido de osmio (20 minutos)
4. Dos (2) lavados de 10 minutos con agua destilada
5. Deshidratación (OH 70%, 1 de 10 minutos), (OH 95%, 2 de 10 minutos) y (OH 100% 3 de 20 minutos.)
6. Recubrimiento en oro

Finalmente, la muestra se colocó en la cámara de vacío del SEM y se tomaron imágenes, de acuerdo al procedimiento establecido en el Manual de usuario del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV.

Pruebas bioquímicas convencionales

Se realizaron pruebas bioquímicas respectivas para cada aislado, prueba agar almidón, caldo nitrato, citrato simons, caldo ureasa, hidrólisis de gelatina, reducción indol, manitol, fermentación fructuosa, fermentación manosa, fermentación maltosa, catalasa y esculina teniendo en cuenta las cepas de control (36).

Identificación molecular a través de métodos proteómicos con la técnica de análisis espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF MS

Para la caracterización molecular de los aislados de *Bacillus* sp, se aplicó la técnica de desorción/ionización asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF), empleando el sistema VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia), que integra esta técnica para la identificación de microorganismos. La identificación de los microorganismos con el equipo VITEK® MS se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, se seleccionó la colonia previamente cultivada en una placa de agar sangre e incubada durante 24 horas a 37 °C. La colonia se recogió y se colocó directamente en un portaobjetos, a continuación, las células se lisaron mediante suspensión en 0,6 µL de ácido fórmico al 28,9% (VITEK MS-FA) y se dejó secar durante 2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se añadió 1 µL de matriz de alfa-ciano-4-hi-

droxicinámico (VITEK® MS-CHCA) y se permitió que se secara al aire, la identificación se llevó a cabo utilizando una base de datos que incluye proteínas con un rango de masa de 2–20 kDa, solo se aceptaron puntuaciones del 99,9% para validar la identificación a nivel de especie (37).

Fase III. Determinación de la actividad antagónica de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Fusarium oxysporum*

Se preparó una suspensión bacteriana de 6 mL con una concentración de 1×10^7 UFC, obtenida mediante el raspado de un cultivo bacteriano en agar nutritivo, incubado durante 5 días, utilizando un portaobjetos estéril. Esta suspensión se aplicó en cuatro puntos igualmente distribuidos alrededor del fitopatógeno y a una distancia de 2 cm del mismo. Las cajas de Petri de control contenían únicamente el hongo sin la presencia de las cepas bacterianas. Las muestras se incubaron a 28 °C y, tras siete (7) días, se midió el halo de inhibición presente entre la colonia del hongo y las bacterias. Se seleccionaron aquellos aislados que alcanzaron un halo de inhibición superior a 3.0 mm contra al menos una cepa del hongo (38).

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los resultados, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de un solo factor para evaluar las diferencias en

la capacidad de inhibición entre los cinco aislados de *Bacillus thuringiensis*. El factor analizado fue el aislado de *Bacillus thuringiensis*, y la variable dependiente fue el diámetro del halo de inhibición medido en milímetros. Se utilizó el software estadístico SPSS para llevar a cabo el ANOVA, con un nivel de significancia establecido en 0.05. Posteriormente al ANOVA, se aplicó el Test de Tukey para realizar comparaciones múltiples entre las cepas. Este test permitió identificar qué pares de cepas presentan diferencias significativas en la capacidad de inhibición del hongo. Se calcularon los intervalos de confianza para cada par de comparaciones y se determinó la significancia estadística basada en un valor p ajustado para comparaciones múltiples.

Resultados

Fase I. Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

De las cinco (5) muestras de suelos analizadas, se obtuvieron un total de 72 aisla-

mientos en las muestras con acetato y 77 cepas en las muestras sin acetato. Las diferencias entre el número de recuperación de aislado con acetato con respecto a las que no contenían acetato se deben a que el acetato de sodio es un componente que permite únicamente el aislamiento de microorganismos del género *Bacillus* (25)., el crecimiento evidenciado presentó bordes irregulares, color blanco crema, ligeramente plano, opaco y de aspecto cremoso. Asimismo, se observó que la mayoría de estas colonias presentaron la tendencia a crecer en masa, resultados similares a los obtenidos por Rodríguez (39), quienes realizaron caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como método para predecir la susceptibilidad sobre insectos plaga de la agricultura. Del total de los aislados se identificaron cinco (5) colonias con morfología característica tal como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Aislamiento presuntivo de *Bacillus thuringiensis* por características morfológicas de las colonias.

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS					
ID	Color	Forma	Bordes	Elevación	Textura
SAN 001	Blanca	Irregular	Espiculado	Plana	Seca
SAN 002	Blanca	Irregular	Lobulado	Plana	Seca
SAN 003	Blanca con anillo central	Irregular	Lobulado	Plana	Seca

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS					
ID	Color	Forma	Bordes	Elevación	Textura
SAN 004	Blanca	Fusiforme	Redondeado	Plana	Cremosa
SAN 005	Blanca	Rizoide	Rizoide	Convexa	Seca

Fase II. Caracterización de los aislados

Caracterización microscópica de los microorganismos aislados

Los resultados de la tinción de Gram mostraron que las bacterias aisladas tenían forma de bastón y bacilos gram positivos (Figura 1), se observó que la mayoría de los aislados formaron esporas con endosporas en posición subterminal y paracentral. La presencia del cristal (proteína Cry) se determinó cualitativamente por observación al microscopio óptico en el objetivo 100X con aceite de inmersión, mediante tinción simple con violeta cristal 0,5% tal como lo describe Solis (40), asimismo, cada aislamiento fue sometido a la tinción verde de malaquita-safranina (coloración de

ShaefferFulton), con el fin de confirmar la producción de esporas por parte de las cepas aisladas. Las tinciones de gram y las de verde de malaquita-safranina revelaron que los tres aislamientos estudiados (SAN 001, SAN 002 y SAN 003) producen esporas y cristales. El aislamiento que mostró la mayor producción de cristales fue SAN 003, seguido por SAN 002 y SAN 001. En las figuras 1a, 1b y 1c se observan las tinciones correspondientes a los aislamientos, donde se evidencia la morfología cilíndrica de las cepas, características de bacilos Gram-positivos, y la presencia de esporas en diferentes posiciones según lo descrito en la tabla 2, lo cual refuerza la identificación de las cepas como pertenecientes al género *Bacillus*.

Tabla 2. Tinción Gram y posición de las endosporas en las cepas seleccionadas.

Cepas	Tinción de Gram		Tinción con verde malaquita		
	Morfología		Posición de la espora		
	Pared	Forma	Central	Subterminal	Terminal
SAN 001	+	Cilíndrica	+	+	-
SAN 002	+	Cilíndrica	-	+	+
SAN 003	+	Cilíndrica	-	+	+
SAN 004	+	Cilíndrica	+	-	+
SAN 005	+	Cilíndrica	-	+	+

Caracterización bioquímica de las cepas aisladas

Las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas con características de (Bt), permitieron determinar la actividad enzi-

mática de las cepas, se incluyeron pruebas sugeridas por Cabrerías (36), que incluyen las pruebas relacionadas en la tabla 3.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para caracterización enzimática de (Bt).

PRUEBA	CEPA					OBSERVACION
	SAN 001	SAN 002	SAN 003	SAN 004	SAN 005	
Prueba con agar urea	-	-	-	-	-	La bacteria no genera el viraje de color
Prueba con agar almidón	+	+	+	+	+	Formación de un halo claro alrededor de la colonia
Prueba de catalasa	+	+	+	+	+	Burbujeo debido a la liberación de oxígeno
Prueba de agar proteína	+	+	+	+	+	Formación de halo alrededor del papel filtro, que indica la capacidad de producir enzimas proteasas
Prueba con agar gelatina	+	+	+	+	+	Se solidifica la gelatina que indica que no se generó la digestión de la gelatina
Siembra en agar TSI	+	+	+	+	+	Se observó pico rojo (alcalino) y fondo amarillo (acidez); esto se debe a que la bacteria es fermenta glucosa
Tinción Gram	+	+	+	+	+	Bacteria Gram Positiva por presencia de una coloración violeta
Tinción verde de malaquita	+	+	+	+	+	Bacterias bacilares de color verde con endoesporas cristalinas

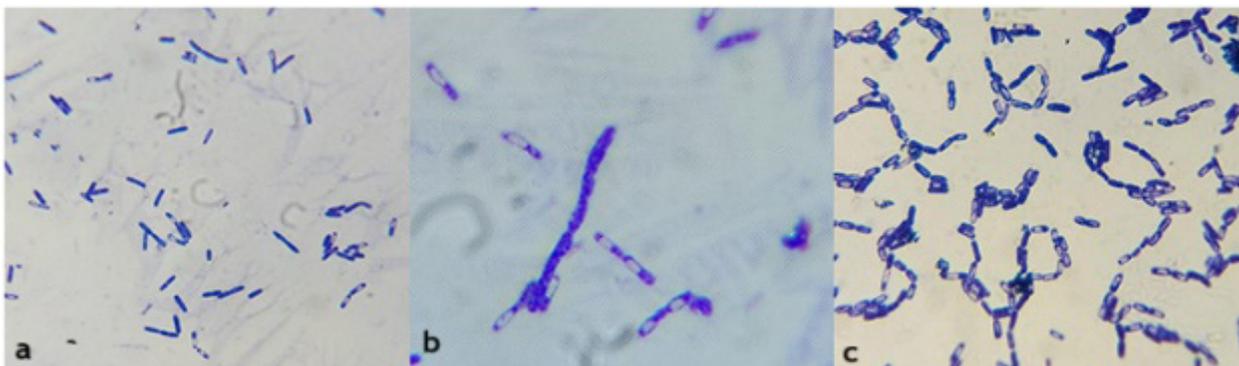


Figura 1. Reacción Gram de bacterias aisladas. **a** cepa SAN 001; **b** cepa SAN 002; **c** cepa SAN 003; en las microfotografías se observan las paredes celulares de las bacterias, confirmando la morfología típica de *Bacillus*, con cadenas más largas y una coloración homogénea.

Las pruebas de fermentación de azúcares se llevaron a cabo en medio de cultivo que contenía glucosa, manitol, lactosa, sacarosa y maltosa. Los resultados contenidos en la tabla 3, indicaron que las cepas SAN 001, SAN 002, SAN 003, SAN 004 y SAN 005 fermentan la glucosa, manitol y sacarosa, evidenciando la producción de ácido con un cambio de color en los tubos.

Confirmación morfológica de cepas identificadas mediante microscopía electrónica

A las cepas seleccionadas en el paso anterior, y que cumplieron con las características bioquímicas y enzimáticas de (Bt), se les realizó montaje en microscopio electrónico de barrido, con la finalidad de confirmar la morfología de las mismas, obteniendo las imágenes de la figura 2:

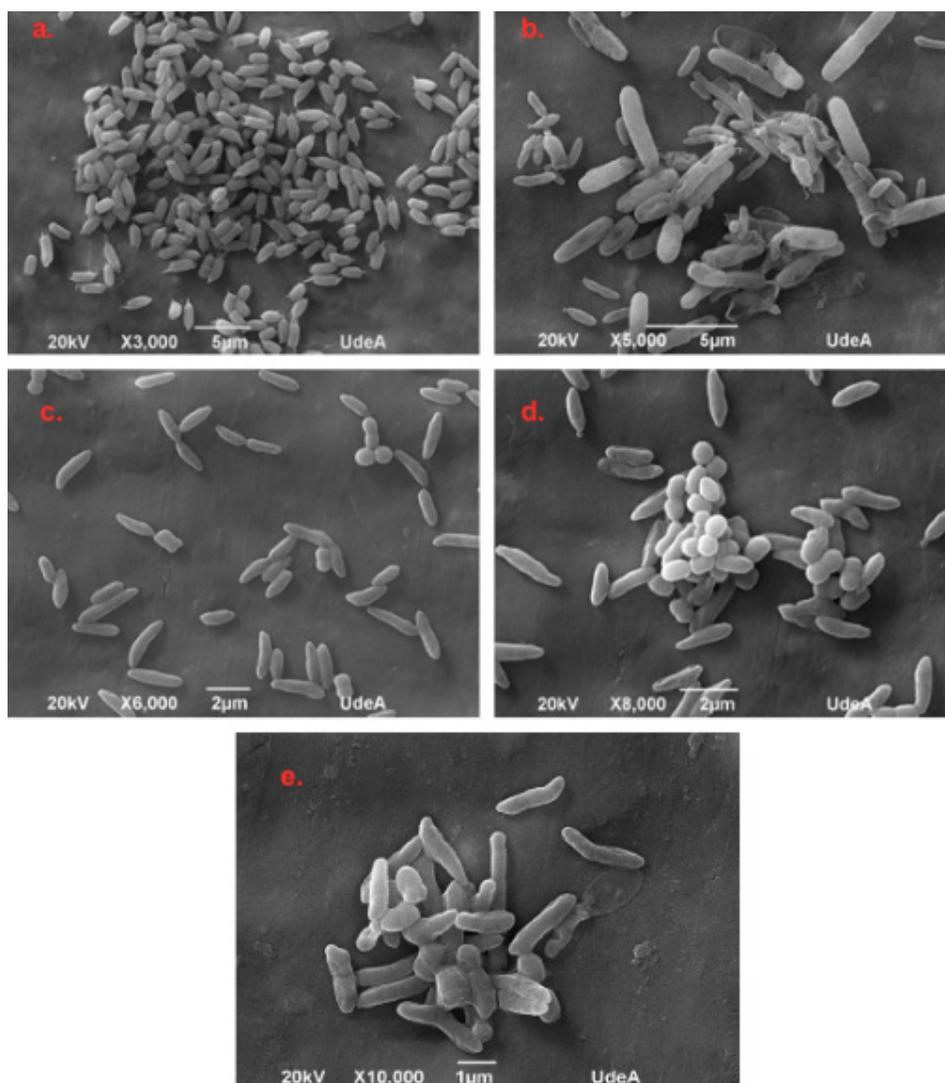


Figura 2. Microfotografías SEM de cepas de Bt. (a. Cepa SAN 001; b. Cepa SAN 002; c. Cepa SAN 003; d. Cepa SAN 004; e. Cepa SAN 005)

Las fotografías obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) (figura 2) muestran una imagen detallada de la superficie de *Bacillus thuringiensis*, observando la forma bacilar característica de (Bt), con células alargadas y ligeramente curvadas. Los bacilos se presentan en forma de cadenas o agrupaciones, lo que es típico de esta especie, dichas características se observan en todas las microfotografías.

Identificación proteómica – MALDI-tof

En cuanto a la identificación proteica de las cinco cepas aisladas (SAN 001, SAN 002, SAN 003, SAN 004 y SAN 005), cada cepa de *Bacillus thuringiensis* generó un perfil único de espectros de masa. Los espectros obtenidos revelaron picos prominentes correspondientes a proteínas específicas, con masas entre 2,000 y 20,000 Da. La comparación de estos perfiles con bases de datos de referencia permitió la identificación precisa de las cepas como especies de (Bt). Los resultados obtenidos, permitieron la identificación de las cepas dentro de un grupo de microorganismos denominado *Bacillus cereus group* (figura 3), el cual, está conformado por bacilos grampositivos, con forma de bastón y formadores de esporas, generalmente aislados del suelo y de otras matrices ambientales y alimentarias (41). El grupo *B.cereus* es una subdivisión del género *Bacillus* que comprende ocho especies formalmente reconocidas: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihen-*

tephanensis, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis*. Al respecto, es válido precisar, que de acuerdo con lo sugerido por Fritz (42), *Bacillus thuringiensis* comparte características fenotípicas con las otras siete especies pertenecientes al grupo antes mencionado, por ello, mediante la técnica maldi-tof fue posible su identificación proteómica. Los perfiles de masas permitieron la identificación de proteínas clave en cada cepa. Se observaron diferencias en la presencia y abundancia de proteínas específicas entre las cepas, lo que permitió una diferenciación entre ellas. Por ejemplo, se identificaron proteínas de 15,000 Da en las cepas SAN 001, SAN 003 y SAN 004 que no estaban presentes en las otras cepas. La técnica MALDI-TOF permitió una comparación directa de los perfiles proteicos de las cinco cepas. La presencia de proteínas comunes en todas las cepas y la variabilidad en las proteínas específicas subrayan las diferencias entre ellas. Las diferencias en los picos de masa observados sugieren variaciones en los perfiles proteicos que podrían estar relacionadas con la expresión genética específica de cada cepa. La técnica MALDI-TOF proporcionó una identificación precisa y rápida de las cepas basándose en el perfil proteico. La coincidencia con bases de datos específicas permitió una identificación inequívoca de las cepas, corroborando la identificación taxonómica a nivel de especie. Los resultados obtenidos mediante la técnica MALDI-TOF confirman su eficacia para la identificación y diferenciación

de cepas de *Bacillus thuringiensis*. La variabilidad en los perfiles proteicos entre las diferentes cepas resalta la capacidad de la técnica para detectar diferencias sutiles en la composición proteica que no siempre son evidentes mediante otros métodos de identificación bacteriana (43).

Fase III – Antagonismo de *Bacillus thuringiensis* contra *Fusarium oxysporum*

Las pruebas de antagonismo entre las cinco cepas identificadas como *Bacillus thuringiensis* enfrentadas con *Fusarium*

oxysporum se llevaron a cabo mediante el método de cultivo dual en placas de Petri. En las placas se observó un claro efecto antagonista de *B. thuringiensis* sobre *F. oxysporum*. La presencia de (Bt) llevó a una notable reducción en el crecimiento de *F. oxysporum* en las áreas cercanas a las colonias de (Bt). Se evidenció una inhibición del crecimiento fúngico en un radio promedio de 10,4 mm alrededor de las colonias de *Bacillus thuringiensis* tal como se evidencia en la siguiente tabla.

Tabla 4. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual.

CEPA	REPETICIÓN	PROMEDIO HALO (mm)	INHIBICIÓN/CEPA (mm)	DS
SAN 001	a	12	13,00	1,00
	b	14		
	c	13		
SAN 002	a	11	9,33	1,53
	b	9		
	c	8		
SAN 003	a	11	10,67	0,58
	b	10		
	c	11		
SAN 004	a	12	11,67	0,58
	b	12		
	c	11		
SAN 005	a	10	7,33	2,52
	b	5		
	c	7		

Las pruebas de antagonismo realizadas para evaluar la capacidad de las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* (SAN 001, SAN 002, SAN 003, SAN 004 y SAN 005) para inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* han proporcionado información valiosa sobre su potencial como agentes de biocontrol. Los resultados obtenidos muestran variabilidad significativa en la eficacia de inhibición entre las cepas, lo cual tiene implicaciones importantes para su aplicación en el control de patógenos fúngicos. Dentro de los resultados se aprecia que los diámetros promedios fueron los siguientes: SAN 001 (13,00 mm), SAN 002 (9,33 mm), SAN 003 (10,67 mm), SAN 004 (11,67 mm) y SAN 005 (7,33 mm). Estas mediciones indican que las cepas SAN 001 y SAN 004 mostraron los diámetros de halo más amplios, sugiriendo que tienen una capacidad superior para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*. En contraste, la cepa SAN 005 mostró el diámetro de halo más pequeño, indicando una menor efectividad antagonista. El análisis de las desviaciones estándar revela que las cepas SAN 003 y SAN 004 presentaron las menores desviaciones estándar (0,58 mm), lo que indica una alta consistencia en la actividad de inhibición observada, al respecto, Carmona (44) sugiere que estos tratamientos (con menor desviación) tienen una producción estable y confiable de metabolitos. En cambio, la cepa SAN 005 exhibió la mayor desviación estándar (2,52 mm), lo que podría reflejar una variabilidad en la eficacia de la inhi-

bición, posiblemente debido a diferencias en la producción de metabolitos antimicrobianos o variaciones en las condiciones de cultivo. La capacidad de las cepas SAN 001 y SAN 004 para generar halos de inhibición más grandes y consistentes sugiere que estas cepas son particularmente prometedoras para su uso en aplicaciones de biocontrol. Estos resultados están en línea con investigaciones previas que destacan el potencial de *Bacillus thuringiensis* para producir metabolitos con actividad antifúngica (45). Por otro lado, la cepa SAN 005, con su menor diámetro de halo y mayor variabilidad en los resultados, sugiere que no todos los aislados de (Bt) tienen la misma capacidad para controlar el hongo evaluado. La menor eficacia de esta cepa podría ser atribuible a una producción subóptima de metabolitos antimicrobianos (46), a diferencia en la capacidad de adhesión a la superficie del cultivo, o a otros factores que afectan su desempeño en el entorno de cultivo. En general, los resultados subrayan la importancia de seleccionar cepas específicas para el control biológico, ya que no todas las cepas de *Bacillus thuringiensis* tienen la misma capacidad para inhibir patógenos fúngicos. La identificación de cepas con alta actividad antagonista y baja variabilidad en los resultados es crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de manejo integrado de plagas. La capacidad de (Bt) para producir compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum* abre posibilidades para su uso en el desarrollo

de formulaciones biológicas que pueden ser aplicadas en la agricultura para proteger los cultivos de enfermedades fúngicas (47).

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
C1	3/9/24 8:53 AM	Bacillus cereus group		99.6		

Key: [Validate selection](#) [Add comment](#)

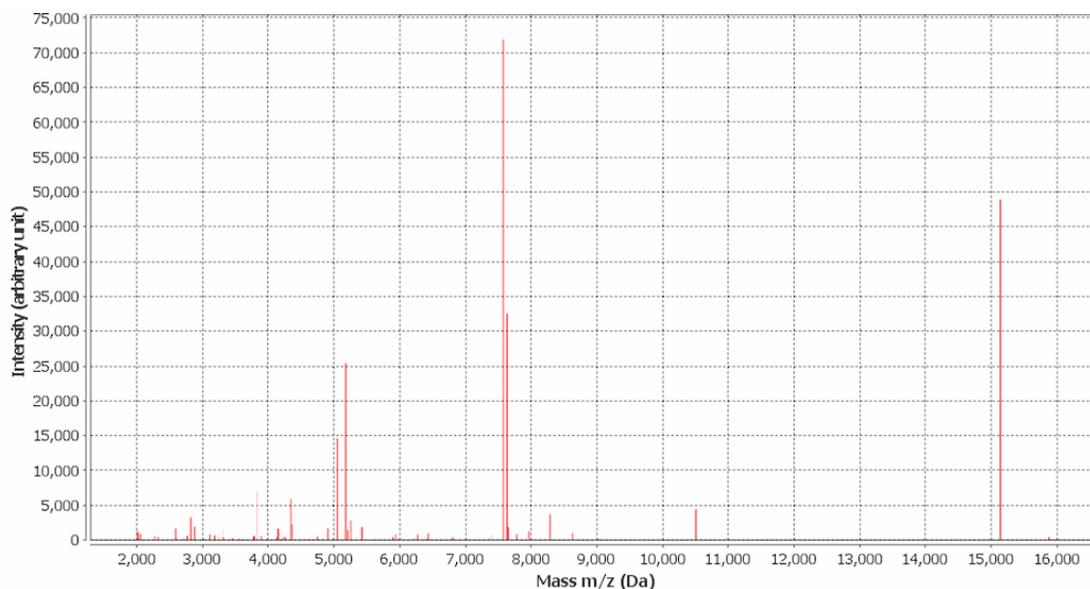


Figura 3. En la imagen se observa los resultados de la identificación de la cepa SAN 001, con un nivel de confianza del 99.6% confirmando la pertenencia al grupo *Bacillus cereus* mediante espectrometría de masas. El gráfico respalda esta identificación al mostrar patrones de picos característicos de las proteínas del organismo.

Los resultados del Test de Tukey, aplicado a los datos de la prueba de antagonismo presentados en la tabla 5, indicaron diferencias significativas en la capacidad de inhibición entre las cepas de *Bacillus thuringiensis*.

La siguiente tabla resume los promedios de los diámetros de halo de inhibición (mm) y las diferencias significativas detectadas entre las cepas.

Tabla 5. Resumen de promedio de halos de inhibición (Test Tuckey).

CEPA COMPARADA	DIFERENCIA DE MEDIAS (mm)	SIGNIFICATIVA (P < 0,05)
SAN 001 vs SAN 002	3.67 mm	Sí
SAN 001 vs SAN 003	2.33 mm	Sí
SAN 001 vs SAN 004	1.33 mm	Sí

CEPA COMPARADA	DIFERENCIA DE MEDIAS (mm)	SIGNIFICATIVA (P < 0,05)
SAN 001 vs SAN 005	5.67 mm	Sí
SAN 002 vs SAN 003	1.33 mm	Sí
SAN 002 vs SAN 004	-2.33 mm	No
SAN 002 vs SAN 005	2.00 mm	Sí
SAN 003 vs SAN 004	-3.67 mm	Sí
SAN 003 vs SAN 005	0.67 mm	No
SAN 004 vs SAN 005	4.00 mm	Sí

El Test de Tukey reveló diferencias estadísticamente significativas en los diámetros de inhibición entre los aislados de *Bacillus thuringiensis*. Las cepas SAN 001 y SAN 004 demostraron los diámetros de halo más amplios, indicando una mayor capacidad de inhibición sobre *Fusarium oxysporum*. La diferencia significativa observada entre SAN 001 y SAN 005 (5.67 mm) sugiere que SAN 001 es notablemente más efectiva en la inhibición del crecimiento del hongo en comparación con SAN 005. Las cepas SAN 002 y SAN 003 mostraron diferencias menores en su capacidad de inhibición, con algunas comparaciones no significativas (por ejemplo, SAN 002 vs SAN 003 con 1.33 mm). Esto indica que estas cepas tienen una eficacia de inhibición más similar entre sí, a diferencia de las diferencias más pronunciadas entre SAN 001 y otras cepas.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio destacan que el método propuesto por Travers no es completamente efectivo para el aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). De las cinco (5) muestras analizadas, las cepas características fueron aisladas con mayor efectividad utilizando otro método. Patel y colaboradores (48) resaltan la necesidad de desarrollar metodologías novedosas o más eficientes que se basen en principios diferentes, ya que un método único podría no ser adecuado para aislar organismos de distintos tipos de muestras y entornos. En su investigación, Patel y colaboradores (48) diseñaron un método de enriquecimiento simple que permitió la propagación de esporas y células vegetativas de (Bt), aumentan-

do proporcionalmente su población. Este método arrojó (Bt) en 44 de 58 muestras, en comparación con los métodos de selección con acetato de sodio y pretratamiento con calor seco, que solo lograron aislar (Bt) en 16 y 18 muestras, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con estos hallazgos, mostrando mayores porcentajes de aislamiento mediante el método de enriquecimiento sin acetato. En lo que respecta a la actividad de enzimas específicas como proteasa, amilasa y lipasa, las cepas analizadas mostraron actividad proteolítica positiva, evidenciada por la solidificación de gelatina. Estos resultados son consistentes con estudios previos que destacan la versatilidad enzimática de este microorganismo (49). Este perfil bioquímico detallado confirma la capacidad de las cepas para fermentar carbohidratos como glucosa y sacarosa, resaltando la importancia del metabolismo de carbohidratos en (Bt). En cuanto a la identificación microscópica, las observaciones realizadas en este estudio son concordantes con los hallazgos de Jones y Roberts (50), quienes destacaron que la superficie granular de la pared celular se debe a la interacción de electrones con las proteínas y polisacáridos de la membrana bacteriana. Esta granularidad proporciona información valiosa sobre la composición de la pared celular y es visible con claridad en las figuras 2b y 2e. Sin embargo, los mismos autores sugieren que la granularidad podría estar influenciada por procesos de deshidratación durante

el procesamiento de las muestras. Las microfotografías SEM también permitieron identificar inclusiones específicas de (Bt), como los cristales de endotoxinas o proteínas Cry. Estas estructuras prominentes y refractivas, visibles en las figuras 2a y 2b, presentan formas geométricas definidas que varían desde estructuras irregulares hasta cristales cúbicos. Los cristales Cry son responsables de la actividad insecticida de Bt y constituyen una característica clave para su aplicación en el control biológico (51). El análisis de antagonismo entre las cepas reveló una alta similitud entre SAN 001 y SAN 002, lo que sugiere una relación genética o fenotípica estrecha. Por otro lado, las divergencias observadas con otras cepas podrían estar asociadas con adaptaciones ambientales o diferencias en el perfil de expresión de proteínas (52). Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para la biotecnología y el control biológico, donde la identificación precisa y la diferenciación de cepas son esenciales para garantizar la efectividad y seguridad de las aplicaciones. La mayor desviación estándar observada en SAN 005 podría deberse a factores como diferencias en la producción de metabolitos antimicrobianos o variaciones en las condiciones de cultivo, lo que podría impactar la estabilidad y consistencia de su actividad antagonista.

La aplicación de microorganismos en estrategias de control biológico y biorremediación ha mostrado resultados prometedores en

diversos contextos. Mientras que *Bacillus thuringiensis* ha sido ampliamente utilizado como agente biocontrolador de insectos en cultivos agrícolas, otras investigaciones han demostrado la capacidad de hongos filamentosos para degradar contaminantes orgánicos complejos, como el petróleo crudo, mediante procesos en microcosmos simulados (53). Estos hallazgos refuerzan la importancia del aislamiento y la caracterización funcional de cepas nativas con potencial biotecnológico.

Además, enfoques emergentes como la metabolómica han permitido estudiar de forma integral las respuestas biológicas frente a pesticidas, identificar biomarcadores y comprender mecanismos de acción, lo que amplía las herramientas para evaluar y mejorar estrategias de control biológico (58).

Asimismo, estudios con hongos filamentosos aislados de la rizósfera han evidenciado actividades enzimáticas como la celulolítica y quitinolítica, asociadas a su potencial antagonista frente a patógenos como *Rhizoctonia solani*, lo que refuerza el valor del aislamiento microbiano local como estrategia eficaz de control biológico (60).

Conclusiones

Se logró la selección exitosa de *Bacillus thuringiensis* de muestras de suelo cultivadas con *Capsicum sp.*, utilizando técnicas de aislamiento que permitieron obtener cinco colonias con morfología característica de

esta especie. La metodología basada en el método de Gillis & Santana (23) mostró una mayor eficacia en comparación con el método de selección con acetato de sodio. Esto subraya la importancia de utilizar técnicas de aislamiento adecuadas para obtener cepas representativas de (Bt) en estudios de biocontrol. Las cepas aisladas fueron caracterizadas como bacilos grampositivos, con formación de esporas en posición subterminal y paracentral, y presencia de cristales proteicos Cry, confirmando su identidad como *Bacillus thuringiensis*. Las observaciones al microscopio electrónico de barrido (SEM) revelaron la estructura bacilar típica y la presencia de cristales de endotoxinas, cruciales para su actividad insecticida. Las pruebas bioquímicas confirmaron que todas las cepas aisladas exhiben características bioquímicas y enzimáticas asociadas a *Bacillus thuringiensis*, como la capacidad de fermentar glucosa y sacarosa, y la producción de enzimas como proteasas y amilasas. Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura existente y confirman la identificación correcta de las cepas. Las pruebas de antagonismo demostraron que *Bacillus thuringiensis* posee una capacidad variable para inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Las cepas SAN 001 y SAN 004 se destacaron por su capacidad superior de inhibición, mientras que la cepa SAN 005 mostró una eficacia menor y mayor variabilidad. Estos hallazgos subrayan la importancia de seleccionar cepas con alta y consistente actividad antagonista para apli-

caciones de biocontrol efectivas. En síntesis, este estudio aporta información valiosa sobre las características bioquímicas, morfológicas y funcionales de los aislados de (Bt) evaluados, proporcionando una base para futuras investigaciones orientadas a optimizar su uso en aplicaciones biotecnológicas y de control biológico.

Los resultados obtenidos permiten confirmar el potencial biocontrolador de las cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de cultivos de *Capsicum* sp., lo cual abre la posibilidad de su aplicación en estrategias sostenibles de manejo integrado de plagas. No obstante, para garantizar su eficacia a largo plazo, es fundamental considerar la adecuada conservación de estas cepas, asegurando su viabilidad genética y funcional. En este contexto, la congelación ha sido reconocida como un método eficiente para preservar microorganismos sin afectar sus características esenciales, tal como lo evidencian estudios previos (54).

Adicionalmente, la presencia de fitopatógenos como *Fusarium* sp. en fuentes de agua de riego ha sido documentada en regiones agrícolas colombianas, lo cual evidencia un riesgo de diseminación de enfermedades que puede ser mitigado mediante la aplicación de biocontroladores como los propuestos en este estudio (61).

Finalmente, los hallazgos obtenidos reafirman el papel clave de los microorganismos

en soluciones biotecnológicas para la agricultura, destacando su aplicabilidad en sectores productivos y ambientales, como lo han evidenciado investigaciones previas en microbiología aplicada (62).

Agradecimientos

En primer lugar, expreso mi gratitud a la institución Universidad Popular del Cesar, mi alma mater, quien ha influido en mi desarrollo académico y profesional, a mi asesor Msc. PhD Pedro José Frago Castilla, por su valiosa guía y apoyo incondicional durante todo el proceso de investigación, sus conocimientos han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. A mi codirectora MSc. PhD Angelica Patricia Vanegas Padilla, por sus conocimientos y por impulsarme a crecer tanto personal como profesionalmente. A los colaboradores del grupo de investigación Parasitología agroecología milenio, les agradezco su disposición para ayudar y sus aportes académicos en momentos pertinentes durante la ejecución de este proyecto. A todos, gracias.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el proyecto de investigación denominado Formación de capital humano maestría y doctorado para el departamento del Cesar con código BPIN 2021 000100100130 financiado con recursos de la Asignación de Ciencia, Tecnología e Innovación ACTel del Sistema

General de Regalías SGR para la formación doctoral y/o maestría modalidad investigación en el programa de Maestría en Ciencias Ambientales de la universidad popular del Cesar.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. FAO STAT. 2023. «FAO STAT». Faostat. Recuperado 12 de marzo de 2020 (<http://www.fao.org/>).
2. DANE. Boletín Técnico Sistema de Información de Precios y Abastecimiento del Sector Agropecuario (SIPSA): Insumos y factores de la producción agropecuaria. 2020, Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_may_2020.pdf
3. Cárdenas Lindarte JC. Extracción y distribución de nutrientes en Ají (*Capsicum frutescens* L.) tipo Tabasco Var. Amazon y su relación con la presencia de *Fusarium oxysporum* Schltdl. 2020.
4. Aristizábal Castillo N, Torres G C. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora* in pepper (*Capsicum frutescens* var. Tabasco), Valle del Cauca. *Rev Cienc.* 2015;19(2):71-89.
5. Tamayo PJ, Jaramillo Noreña JE. Enfermedades del tomate, pimentón, ají y berenjena en Colombia: guía para su diagnóstico y manejo. Bogotá: CO-BAC; 2013. (No. Doc. 26730).
6. Bustamante Pareja JD. Manejo químico de la roya (*Puccinia pampeana*) en cultivo de ají habanero (*Capsicum chinense*) en las fincas Alejandrina y Samboní en la zona de Morales, Cauca, Colombia [tesis]. 2021.
7. Lafuente Rincón DF. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a partir de metabolitos antimicrobianos de *Bacillus thuringiensis* con efecto bioestimulante en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) [tesis doctoral]. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2018.
8. Nina R, Smeltekop H, Almanza JC, Loza-Murguía M. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. *J Selva Andina Res Soc.* 2011;2(1):43-52.
9. Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales HA, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra JM, Martínez-Escudero E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agron.* 2015;64(2):194-205.
10. Correa E, Martínez A, Orozco A, Silva G, Tordecilla L, Rodríguez M. Análisis de un sistema productivo agrícola en el Caribe: tecnología de producción, patrón de costos e indicadores económicos de la producción de ahuyama. *Rev Econ Caribe.* 2019;(23):47-70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14482/ecoca.23.3033>.
11. Montejo D. Respuesta foliar y radical del maíz a la fertilización biológica-química en un suelo Luvisol. *Agron Mesoam.* 2018;29(2):325-341. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15517/ma.v29i2.29511>
12. Gallardo F, Hernández M, Linares A. Scientific contributions of agroecology in Latin America and the Caribbean: a review. *Rev Fac Cienc Agrar Univ Nac Cuyo.* 2019;51(1):215-229.
13. Santiago C, Quesada E. Empleo de *Bacillus thuringiensis* en los sistemas agrícolas. En: Caballero P, Ferré J, editores. *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas.* España: Universidad Pública de Navarra, Phytoma; 2021. p. 191-204
14. Aguilar R. Implementación de micorrizas y *Azospirillum brasilense* en agricultura sustentable del estado de Morelos [Internet]. 2018 [citado el 27 de febrero de 2025]. Disponible en: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/772/AUTRBT09T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

15. Torres J, Rosas N, Garza R, Leal M. Diseño de una formulación insecticida biodegradable a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev TuRevista Digi.U@t* [Internet]. 2016 [citado el 27 de febrero de 2025];5:26.
16. Ángeles J, Cruz T. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Rev Mex Cienc Agric* [Internet]. 2015 [citado el 27 de febrero de 2025];6(5):929-942. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000500002&lng=es&tlng=es
17. McGuire M, Shasha B, Eastman C, Oloum. Starch- and flour-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* [Internet]. 2016 [citado el 27 de febrero de 2025];89:863-869.
18. Castañeda Álvarez E, Sánchez LC. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Revista NOVA*. 2016;14(25):27-38
19. Corrales LC, Sánchez LC, Cuervo J, Joya JA, Márquez K. Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova* 2012; 10(17).
20. Ashokrao PD, Moharil MP, Pralhad IK, Munje S. Isolation and characterization of native isolates of *Bacillus thuringiensis* from Vidarbha region. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* [Internet]. 2017 [citado el 27 de febrero de 2025];6(1):798-806. Disponible en: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.094>
21. Hassan AA, Youssef MA, Elasztokhy MMA, Ismail IM, Aldayel M, Afkar E. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains native of the Eastern Province of Saudi Arabia. *Egypt J Biol Pest Control* [Internet]. 2021 [citado el 27 de febrero de 2025];31(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00352-8>
22. Bukhari DA, Kanwal T, Iftikhar S, Rehman A. The potential mosquitocidal activity of *cry4A* toxic region crystal protein gene from local isolates of *Bacillus thuringiensis* against *Aedes aegypti*. *J King Saud Univ Sci* [Internet]. 2022 [citado el 27 de febrero de 2025];34(6):102191. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102191>
23. Gillis A, Santana MA. Detección de genes *cry1* y *cry2* en cepas venezolanas de *Bacillus thuringiensis* y sus posibles aplicaciones en el campo de la Biotecnología Agrícola. In: IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health: September 24th-28th, 2007 Margarita Island, Venezuela. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 975-8
24. Brownbridge M, Margalit J. New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol*. 1986;48(2):216-22. doi:10.1016/0022-2011(86)90126-6.
25. Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53(6):1263-6. doi:10.1128/aem.53.6.1263-1266.1987.
26. Meena C, Ashok TH, Kumar S, Tak K. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from soils of different regions of Karnataka state, India. *Eco Env Cons*. 2015;21(1):443-8.
27. Cappuccino JG, Welsh CT. *Microbiology: A laboratory manual, loose leaf edition*. 12th ed. Pearson; 2019.
28. Saberi F, Marzban R, Ardjmand M, Shariati FP, Tavakoli O. Optimization of culture media to enhance the ability of local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *J Saudi Soc Agric Sci*. 2020;19(7):468-75.
29. Willey J, Sandman K, Wood D. *Prescott's Microbiology ISE*. 12th ed. McGraw-Hill Education; 2022.
30. Logan NA, Vos PD. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley; 2015. p. 1-163. doi:10.1002/9781118960608.gbm00530.
31. Ereqat SI, Abdelkader AA, Nasereddin AF, Al-Jawabreh AO, Zaid TM, Letnik I, Abdeen ZA. Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2018;53(1):39-45. doi:10.1080/10934529.2017.1368300.
32. Lobo KS, Soares-da-Silva J, Silva MC, Tadei WP, Polanczyk RA, Pinheiro VCS. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Rev Bras Entomol*. 2018;62(1):5-12. doi:10.1016/j.rbe.2017.11.004.

33. Ramírez I. Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de ecoregiones de la costa del Perú con actividad larvicida para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L) [Tesis de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.
34. Carreras Solís B. Determinación de la composición de proteínas Cry por SDS-PAGE en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. *Fitosanidad*. 2005;9(1):47-50. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116169010>.
35. JEOL Ltd. *Manual de usuario: Scanning Electron Microscope (6490 SEM)*. JEOL Ltd.; s.f.
36. Cabrera JP. Evaluar la susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a dos cepas locales posibles *Bacillus thuringiensis* en comparación con producto comercial bajo condiciones *in vitro* [Tesis]. 2022.
37. Takahashi N, Nagai S, Fujita A, Ido Y, Kato K, Saito A, *et al.* Discrimination of psychrotolerant *Bacillus cereus* group based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins. *Food Qual Saf Res Lab*. 2020.
38. Mejía-Bautista MA, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Reyes-Ramírez A. Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*. 2016;50(8):1123-35.
39. Rodríguez R, Cifuentes R, Hernández J. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como método para predecir la susceptibilidad sobre insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros plaga de la agricultura. *Rev Mutis*. 2023;13(1):1-34.
40. Solís B. Determinación de la composición de proteínas Cry por SDS-PAGE en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. *Fitosanidad*. 2005;9(1):47-50.
41. Zhang Q, Hua G, Adang M. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Sci*. 2017;24(5):714-29. doi:10.1111/1744-7917.12401. PMID:27628909.
42. Fritz L, Berlitz D, Macedo VRM, Machado V, Fiuza LM. Frequência de *Bacillus* spp. em solos de diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado em Cachoeirinha, RS. *Bragantia*. 2010;69(2):405-12. doi:10.1590/S0006-87052010000200020.
43. du Pisanie A, du Preez L, van den Berg J, Pieters R. The rate of release of Cry1Ab protein from Bt maize leaves into water. *Water SA*. 2019;45(4):710-5. doi:10.17159/wsa/2019.v45.i4.7553.
44. Carmona G, Andrade GS, Citadin I, Pertille RH, Campos JR da R, Rohr A, Danner MA. Spatial and temporal distribution and bioinsecticides control of olive leaf moth in an olive orchard in Southwest of Paraná, Brazil. *Ciênc Rural*. 2023;53(8):e20220008. doi:10.1590/0103-8478cr20220008.
45. Smith J, Brown A, Clark M. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus thuringiensis*: characterization and applications. *J Agric Food Chem*. 2020;68(15):4567-75. doi:10.1021/acs.jafc.0c01092.
46. Sanabria S, Lozano L. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bacillaceae) and plant extracts for the biological control of *Aedes aegypti* (Culicidae). *Acta Biol*. 2022;44(117):e5. doi:10.17533/udea.acbi/v44n117a05.
47. Abbasi A, Ishfaq K, Muhammad W, Waqas A, Hafiza J, Inzamam U, Qamar U, Ahtsham H. Bio-control potential of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) against *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae). *Rev Soc Entomol Argent*. 2022;81(3):17-27. doi:10.1325/1325.
48. Patel K, Bhanshali F, Chaudhary A, Ingle S. A new enrichment method for isolation of *Bacillus thuringiensis* from diverse sample types. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;170(1):58-66. doi:10.1007/s12010-013-0145-y.
49. Lee H, Park S, Kim J. Enzymatic activity of *Bacillus thuringiensis*: protease, amylase, and lipase production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018;185(6):2234-46. doi:10.1007/s12010-018-2915-7.

50. Jones L, Roberts M. Characterization and fermentation studies of *Bacillus thuringiensis*. *J Microb Res.* 2019;58(4):567-78. doi:10.1016/j.jmres.2019.03.005.
51. Viana J, Soares J, Vieira M, Tadei W, Oliveira C, Abdalla F, Peixoto C, Pinheiro V. Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). *Braz J Biol.* 2021;81(1):114-24. doi:10.1590/1519-6984.223389.
52. Fragoso P, Armijo A, Gómez D, Gómez C, Buguéño M, Sánchez G, Venegas J. Molecular characterization of the *cry* gene profile of *Bacillus thuringiensis* isolated from a Caribbean region of Colombia. *Pol J Microbiol.* 2018;67(1):19-26. doi:10.5604/01.3001.0011.6138.
53. Bedoya Ciro CC, Estupiñán B LH. Evaluación in vitro de la capacidad biorremediadora de hongos filamentosos sobre petróleo crudo. *Nova.* 2018;16(29):39-47.
54. Sánchez Leal LC, Corrales Ramírez LC. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova.* 2005;3(3):110-20
55. Corrales Ramírez LC, Sánchez Leal LC, Arévalo Galvez ZY, Moreno Burbano VE. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova.* 2021;19(37):165-73.
56. Gallón Nausa J. Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc. *Nova.* 2015;13(23):7-15.
57. Corrales LC, Antolinez Romero DM, Bohórquez Macías JA, Corredor Vargas AM. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Revista NOVA.* 2015;13(23):55-81.
58. Zuluaga M, Robledo S, Osorio-Zuluaga GA, Yathe L, Gonzalez D, Tabora G. Metabolómica y pesticidas: revisión sistemática de literatura usando teoría de grafos para el análisis de referencias. *Revista NOVA.* 2017;15(28):121-38.
59. Corrales LC, Caycedo Lozano L, Gómez Méndez MA, Ramos Rojas SJ, Rodríguez Torres JN. *Bacillus spp.*: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Revista NOVA.* 2016;14(26):39-52.
60. Campuzano SE, Urquijo TL, Valderrama J. Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani*. *Revista NOVA.* 2016;14(25):74-84.
61. Corrales LC, Sánchez Leal LC, Quimbayo Salamanca ME. Microorganismos potencialmente fitopatógenos en aguas de riego proveniente de la cuenca media del río Bogotá. *Revista NOVA.* 2017;15(28):39-54.
62. Ostos Ortiz OL, Rosas Arango SM, González Devia JL. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *NOVA.* 2018;16(30):79-91.

© 2025 – Diana Lucía Vanegas-Padilla, Pedro José Fragoso-Castilla, Angélica Patricia Vanegas-Padilla.



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Attribution (CC BY). Se permite el uso, distribución o reproducción en otros foros, siempre que se acredite al autor original y al propietario del copyright y se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada. No se permite ningún uso, distribución o reproducción que no cumpla con estos términos.