

# Evaluación del lactosuero como sustrato alternativo para la producción de *Bacillus thuringiensis*

## Evaluation of whey as an alternative substrate for *Bacillus thuringiensis* production

Gino Francesco Olivieri<sup>1</sup>, Pedro José Frago<sup>2</sup>, Dinary Eloisa Durán Sequeda<sup>3</sup>

### Resumen

**Introducción.** *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva esporulada, ampliamente estudiada por su capacidad de producir estructuras proteicas (Cry) con potencial entomopatógeno, muy utilizada en la agricultura sostenible para biocontrol. **Objetivo** de esta investigación fue evaluar el lactosuero como sustrato alternativo para la producción de *Bacillus thuringiensis*, mediante el aprovechamiento de residuos agroindustriales disponibles a nivel regional. **Metodología.** Se caracterizó la composición fisicoquímica del lactosuero y se formularon tres tratamientos: Lactosuero sin aditivos (LS), Lactosuero con aditivos minerales (LSA) y Lactosuero desproteinizado con aditivos (LSAD). Se llevó a cabo la activación e identificación de la cepa mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. Se determinó la cinética de crecimiento microbiano y el consumo de azúcares reductores a lo largo de 72 horas, en los tres tratamientos. **Resultados.** El tratamiento LS evidenció el mayor rendimiento celular, alcanzando  $2,78 \times 10^8$  UFC/mL, mientras que los tratamientos LSA y LSAD mostraron crecimientos significativamente menores. El consumo de lactosa fue proporcional al aumento de biomasa en los diferentes tratamientos. **Conclusiones.** El lactosuero sin suplementación externa constituye una fuente eficiente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de *B. thuringiensis*, lo que permite proponer su uso como medio de cultivo no convencional, económico y ambientalmente sostenible.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, lactosuero, medio de cultivo, biotecnología ambiental, crecimiento microbiano y sostenibilidad.

1. Universidad Popular del Cesar, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, Valledupar Cesar, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8589-7948>

2. Universidad Popular del Cesar, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, Valledupar Cesar, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3437-8664>

3. Universidad Popular del Cesar, Grupo de investigación Parasitología y Agroecología Milenio, Valledupar Cesar, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3368-1338>

Correspondencia: [ginoolivieri@unicesar.edu.co](mailto:ginoolivieri@unicesar.edu.co)

## Abstract

**Introduction.** *Bacillus thuringiensis* is a spore-forming Gram-positive bacterium widely studied for its ability to produce protein structures (Cry) with entomopathogenic potential, and is broadly used in sustainable agriculture. **Objective.** To evaluate the use of whey as an alternative substrate for the production of *Bacillus thuringiensis* by utilizing agro-industrial residues available at the regional level. **Methodology.** The physicochemical composition of whey was characterized, and three treatments were formulated: whey without additives (LS), whey with mineral additives (LSA), and deproteinized whey with additives (LSAD). The strain was activated and identified through morphological, biochemical, and MALDI-TOF mass spectrometry analyses. Microbial growth kinetics and the consumption of reducing sugars were determined over a period of 72 hours, in these three treatments. **Results.** The LS treatment showed the highest cellular yield, reaching  $2.78 \times 10^8$  CFU/mL, while the LSA and LSAD treatments exhibited significantly lower growth. Lactose consumption was proportional to biomass increase across treatments. **Conclusions.** It is concluded that whey without external supplementation constitutes an efficient source of carbon and nitrogen for the growth of *B. thuringiensis*, supporting its use as a non-conventional, cost-effective, and environmentally sustainable culture medium.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, whey, culture medium, microbial growth, sustainability, environmental biotechnology

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva esporulada muy utilizada en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), debido a su capacidad para producir proteínas cristalinas (Cry) con elevada especificidad y toxicidad frente a diversas órdenes de insectos de importancia agrícola y sanitaria, como Lepidoptera, Coleoptera y Diptera (1–3). Estas proteínas actúan como endotoxinas que, una vez ingeridas, se activan en el tracto digestivo del insecto,

provocando la lisis de las células epiteliales y generando su muerte por septicemia (4–6). Debido a su selectividad y bajo impacto ambiental, *B. thuringiensis* se ha posicionado como una alternativa biotecnológica relevante frente al uso indiscriminado de insecticidas químicos (7–9).

Uno de los desafíos actuales para su producción a gran escala es la optimización de medios de cultivo que permitan generar altos rendimientos de biomasa y esporas con bajo costo y sostenibilidad ambiental (10,

11). Tradicionalmente, los medios de cultivo utilizados contienen fuentes de carbono y nitrógeno como glucosa y extracto de levadura, lo que incrementa los costos de producción (12). En este contexto, el uso de subproductos agroindustriales como el lactosuero ha ganado interés como posible alternativa, al tratarse de un residuo orgánico con concentraciones considerables de lactosa, proteínas y minerales, generado en grandes cantidades por la industria láctea (3, 13, 14).

El lactosuero representa una carga contaminante significativa debido a su alta Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y su vertimiento sin tratamiento en cuerpos de agua, especialmente en regiones donde la producción de queso es una actividad económica central, como en el departamento del Cesar, Colombia (15,16). Por tal motivo, su valorización como sustrato para la producción de microorganismos con aplicaciones biotecnológicas resulta una estrategia prometedora para mitigar su impacto ambiental y reducir los costos de fermentación en procesos industriales (17,18).

Si bien se han reportado estudios sobre la utilización de residuos agroindustriales para el cultivo de *B. thuringiensis*, la información relacionada específicamente con el uso de lactosuero como único sustrato de crecimiento, sin suplementación química, sigue siendo limitada (19–21). En consecuencia, el presente estudio tuvo como

objetivo evaluar la viabilidad técnica del lactosuero como medio de cultivo alternativo para la producción de *B. thuringiensis*, a partir de la caracterización bromatológica del sustrato y la cinética de crecimiento microbiano.

## **Materiales y métodos**

### **Área de estudios y condiciones experimentales.**

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Grupo de Investigación Parasitología y Agroecología Milenio (PAM) de la Universidad Popular del Cesar (Valledupar, Colombia). Las etapas de formulación, cultivo y análisis se realizaron bajo condiciones de temperatura controlada a 30 °C y agitación constante (180 rpm), durante un periodo de incubación de 72 horas (22,23).

### **Activación del microorganismo**

Se utilizó una cepa de *Bacillus thuringiensis*, previamente conservado en papel filtro a –20 °C, aportado por el grupo de investigación PAM. La cepa fue activada mediante inoculación en caldo BHI (Brain Heart Infusion), seguido de incubación a 30 °C por 24 horas en agitación orbital (23). Posteriormente, se hizo la verificación de su identidad mediante técnicas microbiológicas y de patrón espectral (24–27).

### **Identificación fenotípica y espectral**

La caracterización de la cepa se complementó con pruebas de Gram, esporulación (tinción de verde de malaquita), pruebas bioquímicas (TSI, citrato, ureasa, indol, movilidad, oxidasa, catalasa, hidrólisis de almidón, gelatina, manitol, lecitina, entre otras), así como análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM). Para confirmación taxonómica, se aplicó MALDI-TOF, utilizando el sistema VI-TEK-MS y comparando los espectros con la base de datos interna del equipo (22,26–29).

### **Preparación del sustrato y formulaciones**

El lactosuero utilizado fue caracterizado fisicoquímicamente en cuanto a pH, contenido de proteínas, carbohidratos, cenizas, humedad y minerales (calcio, fósforo, sodio, potasio, entre otros), mediante métodos estandarizados de referencia como Espectrofotométrico UV-VIS, Volumétrico (Kjeldahl), Refractométrico, Potenciométrico, Gravimétrico y Espectrometría de absorción atómica. Parte del lactosuero fue sometido a desproteinización térmica (100 °C por 15 minutos), luego filtrado y almacenado a 4 °C (30,31).

Se formularon tres (3) tratamientos experimentales LS (lactosuero sin aditivos), LSA (lactosuero con aditivos) y LSAD (lactosuero desproteinizado con los mismos aditivos

del tratamiento LSA), los aditivos estaban conformados por sales minerales como KCl,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{FeSO}_4$ , propuestas por Olivieri & Fragoso (24).

A cada tratamiento se le aplicó tres (3) replicas, las cuales fueron ajustadas a un pH 7, esterilizados por autoclave (121 °C, 15 psi, 15 min) e inoculados con 100  $\mu\text{L}$  del cultivo activado de *B. thuringiensis* a una concentración celular de  $2.60 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) (16,24).

### **Diseño experimental**

Se aplicó un diseño factorial mixto con tres tratamientos y un tiempo de evaluación de 72 horas. Las variables de respuesta fueron: concentración de esporas viables (UFC/mL), consumo de azúcares reductores y observaciones morfológicas. Las muestras fueron tomadas cada 12 horas para análisis cinético.

### **Cuantificación de esporas**

El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) utilizando el método de siembra en profundidad con agar PCA (Plate Count Agar OXOID) (32,33). Las muestras fueron sometidas a choque térmico (80 °C por 15 minutos) para eliminar células vegetativas, permitiendo la cuantificación exclusiva de esporas. Se realizaron diluciones seriadas decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ )

en solución salina isotónica estéril (0,85 % NaCl) (34,35).

### **Determinación de azúcares reductores**

El consumo de lactosa fue determinado mediante el método colorimétrico DNS, utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se preparó una curva de calibración con soluciones patrón de glucosa, y las absorbancias se midieron a 540 nm en espectrofotómetro UV-Vis. Se realizaron mediciones cada 12 horas durante el periodo de incubación (36,37).

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con el software RStudio® v4.3. Se evaluó la cinética de crecimiento y la reducción de azúcares para cada tratamiento mediante análisis exploratorio de datos(38,39).

## **Resultados**

Las técnicas aplicadas permitieron evidenciar características morfológicas como células vegetativas pequeñas, de color morado, con forma bacilar y agrupadas en cadenas; esporas grandes, elipsoidales y centrales; así como cristales pequeños y elipsoidales.

Fisiológicamente la cepa posee actividad enzimática asociada a la producción de oxidasa, catalasa, ureasa, amilasas, gelatinasa y precipitar la lecitina. También, positiva

para la prueba de Voges–Proskauer (VP). Y aunque mostró movilidad, se observaron resultados negativos en la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), indol, utilización de citrato, hidrólisis de manitol y en la prueba de rojo de metilo (MR). En el medio TSI (Triple Azúcar Hierro), se registró un perfil ácido/ácido (A/A), indicando fermentación de glucosa, lactosa o sacarosa, sin producción de gas ni H<sub>2</sub>S.

El patrón espectral arroja picos de masa entre los 2000 y 15000 m/z (Da), con una mayor concentración entre los 3000 a los 4000 m/z. Sumado a ello, la intensidad se ubicó entre los 5000 a los 60 000 valores arbitrarios, mostrando una alta similitud con los perfiles proteicos almacenados en la base de datos vinculada al sistema VITEK® MS, alcanzando un nivel de confianza del 99,9 % para la identificación de la cepa como perteneciente al *Bacillus cereus* group.

### **Composición fisicoquímica del lactosuero**

El análisis bromatológico reveló que el lactosuero utilizado presentó una acidez característica (pH 4.2), alta humedad (>90%), y un contenido moderado de carbohidratos (2.28%) y proteínas (<2.5%). El contenido mineral fue relevante en sodio (862 mg/L), calcio (256 mg/L) y fósforo (233 mg/L), mientras que elementos traza como hierro, manganeso y zinc no fueron detectados

bajo la metodología aplicada. Estos resultados indican que el lactosuero, sin requerir enriquecimiento adicional, posee los ele-

mentos básicos para apoyar el crecimiento bacteriano (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición fisicoquímica del lactosuero

Parámetro	Valor obtenido	Referencias comparativas*
Carbohidratos (%)	2.28	1.85 – 6.21
Proteína cruda (%)	<2.5	0.03 – 4.20
pH	4.2	5.0 – 6.5
Humedad (%)	>90	92 – 95
Cenizas (%)	0.42	0.42 – 1.18
Calcio (mg/L)	256	25 – 100
Sodio (mg/L)	862	30 – 80
Fósforo (mg/L)	233	ND

\*Valores reportados por Yasmin et al., (40) López et al., (41) Naik et al. (42)

### ***Crecimiento celular de B. thuringiensis en lactosuero***

El crecimiento microbiano mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA,  $p < 0.05$ ) con un intervalo de confianza del 95% (IC95%). El medio con lactosuero sin aditivos (LS) permitió una curva exponencial sostenida durante las 72 h, alcanzando un pico de  $2.78 \times 10^8$  UFC/mL con un **IC95%** ( $2.71 \times 10^8 - 2.87 \times 10^8$  UFC/

mL). Por el contrario, los tratamientos con sales (LSA) y lactosuero desproteinizado (LSAD) presentaron crecimientos considerablemente menores, con máximos de  $3.05 \times 10^4$  a una **IC95%** ( $1.82 \times 10^4 - 3.98 \times 10^4$  UFC/mL) y  $4.2 \times 10^3$  UFC/mL, a una **IC95%** ( $3.96 \times 10^3 - 4.48 \times 10^3$  UFC/mL) respectivamente (Figura 1). La transformación logarítmica ( $\log_{10}$ ) evidenció una diferencia de al menos 4 unidades log entre LS y LSAD al final del experimento.



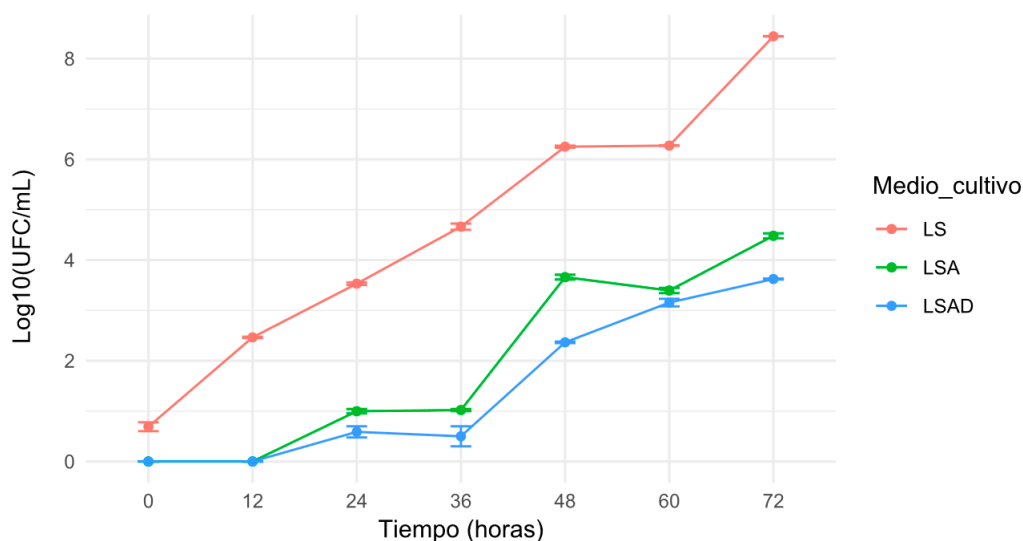


Figura 1. Crecimiento de *B. thuringiensis* en 3 medios de cultivo durante 72 horas.

### Consumo de azúcares y relación con el crecimiento de *B. thuringiensis*

El análisis de azúcares reductores (DNS) mostró que el medio LS fue el único con una disminución significativa de azúcares, pasando de 1.04 g/mL a 0.38 g/mL en 72h,

en concordancia con el aumento de biomasa bacteriana (Figura 2). En cambio, los medios LSA y LSAD presentaron disminuciones mínimas (< 0.2 g/mL), sin evidencia de consumo activo del sustrato. Esta correlación confirma la viabilidad del lactosuero como fuente de carbono fermentable

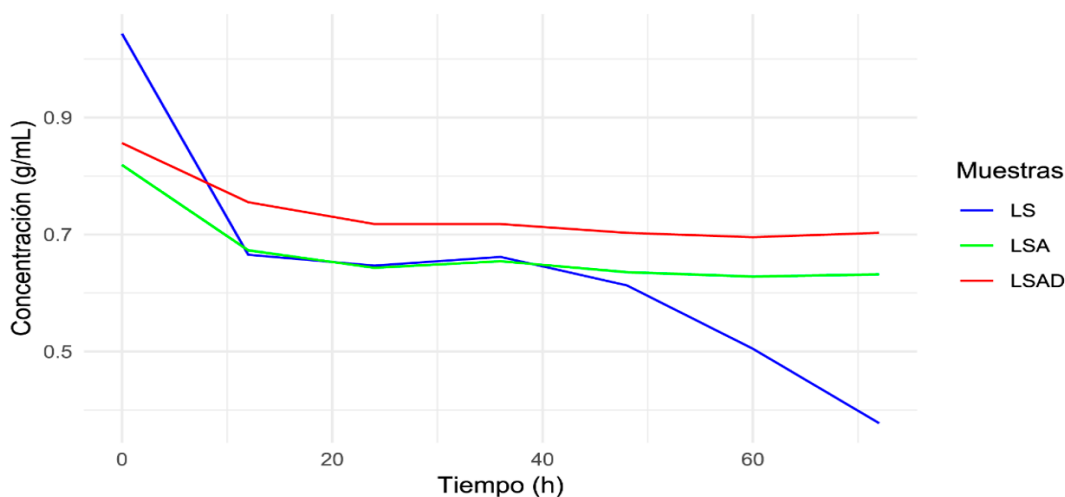


Figura 2. Consumo de azúcares durante la fermentación.

## Discusión

Los resultados obtenidos confirman el potencial biotecnológico del lactosuero como medio de cultivo no convencional para *B. thuringiensis*, en especial cuando no se adicionan suplementos. El tratamiento LS (lactosuero sin aditivos) evidenció un mayor crecimiento celular ( $2.78 \times 10^8$  UFC/mL), superando a los tratamientos LSA y LSAD. Esto sugiere que el lactosuero posee una composición nutricional suficiente para promover el crecimiento *B. thuringiensis* sin requerir suplementación adicional, hecho consistente con estudios previos realizados por El-Gayar et al. (16) y Santos et al. (43) quienes destacaron el valor de residuos agroindustriales como medios eficientes de producción microbiana.

La efectividad del tratamiento LS puede estar asociado a su contenido de lactosa, como principal fuente de carbono y energía. El consumo proporcional de azúcares en este tratamiento estuvo directamente relacionado con el aumento de biomasa, indicando adaptación metabólica de *B. thuringiensis* al sustrato. Este hallazgo concuerda con lo señalado por Li et al. (44), quienes demostraron que la presencia de carbohidratos simples, como la lactosa, favorece una tasa de crecimiento más acelerada y una mayor actividad enzimática en *Bacillus spp.*

La adición de sales minerales en los tratamientos LSA y LSAD no mejoró la produc-

ción celular. Este fenómeno puede explicarse por la posible formación de complejos no biodisponibles entre los aditivos y los componentes orgánicos del lactosuero. Según Devidas et al. (36), aditivos como el sulfato de amonio y el nitrato de sodio pueden interferir con la disponibilidad de nutrientes y afectar negativamente la síntesis proteica. Además, Rajendran et al. (45) argumentan que las fuentes inorgánicas de nitrógeno presentan una menor eficiencia para la producción de esporas y proteínas Cry en comparación con fuentes orgánicas.

El uso del lactosuero sin tratamiento adicional representa una alternativa sustentable para la valorización de un residuo que, de otro modo, contribuiría a la contaminación hídrica. La literatura indica que el lactosuero tiene una alta carga orgánica (DQO de 60.000-80.000 mg/L), generando impactos ecológicos negativos si no se gestiona adecuadamente (19,46). La conversión de este residuo en biomasa microbiana útil para aplicaciones agrícolas constituye una estrategia de economía circular, promovida también por Zapata ACC et al. (47).

La cinética de crecimiento mostrada en la Figura 2 refuerza el potencial del tratamiento LS para procesos industriales. La fase logarítmica entre las 12 y 36 horas representa un intervalo óptimo para la cosecha en fermentadores. Este periodo de tiempo coincide con la producción máxima de metabolitos secundarios y proteínas Cry,



según lo reportado por Mazmira MM *et al.* (48) en cultivos de *B. thuringiensis* destinados a la producción de biopesticidas.

El análisis de la Tabla 1 revela que el pH del medio LS se mantuvo en niveles compatibles con el crecimiento de *Bt*, incluso sin amortiguadores externos. Asimismo, el contenido de cenizas y humedad se encuentra dentro de los rangos aceptables para medios de cultivo líquidos, tal como lo describen Fatima *et al.* (29) y Ma *et al.* (49). Aunque el contenido de proteínas fue bajo, este no limitó el desarrollo celular, lo que indica que *Bt* puede adaptarse a medios pobres en nitrógeno, una característica evolutiva relacionada con su plasticidad genética. En la Figura 2, se observa una correlación clara entre el consumo de azúcares y el incremento celular, especialmente en el tratamiento LS. Esto sugiere una alta eficiencia en la conversión de carbohidratos en biomasa, lo cual es crucial para optimizar procesos de fermentación a gran escala. Mazmira MM *et al.* (48) documentaron que *B. thuringiensis* es capaz de metabolizar eficientemente lactosa, glucosa y maltosa, siendo la primera sustancialmente efectiva.

Unos de los desafíos para la producción de *B. thuringiensis* en un potencial escalamiento industrial a bajo costo, es garantizar la cantidad, la calidad y la disponibilidad de los insumos requerido para el proceso, ya que la mayoría de estos recursos son descartados por los productores primario.

Además de la debida caracterización de la cepa, garantizando que sea productora de endotoxinas, mas no de  $\beta$ -exotoxina (50).

Desde una perspectiva industrial, el uso de lactosuero sin tratamiento reduce los costos operativos al eliminar la necesidad de suplementación, esterilización intensiva o ajuste de pH. Esto ofrece una ventaja competitiva significativa frente a medios comerciales como el LB o el TSB. Por lo tanto, este estudio incentiva el aprovechamiento local de residuos agroindustriales, particularmente en regiones productoras de lácteos, lo cual puede fomentar la implementación de modelos de bioeconomía territorial y circular (51).

Los resultados confirman que el lactosuero sin aditivos representa un medio eficaz, económico y sostenible para el cultivo de *B. thuringiensis*. Este hallazgo tiene implicaciones aplicables en la producción de biopesticidas naturales, la reducción del impacto ambiental de residuos agroindustriales y la implementación de estrategias de economía circular. Futuros estudios deben explorar el perfil proteómico del *B. thuringiensis* producido bajo estas condiciones, así como la estabilidad de sus esporas y su potencial entomopatógeno en condiciones reales de campo.

## Conclusiones

El lactosuero sin aditivos (LS) es un medio de cultivo alternativo para la producción de *B. thuringiensis*. La concentración de azúcares y nutrientes presentes en el lactosuero permitió un crecimiento celular significativamente superior en comparación con los tratamientos suplementados con minerales (LSA) o desproteínizado (LSAD), lo que demuestra su potencial como un medio de cultivo económico y ambientalmente sostenible.

Existe una correlación directa entre el incremento de la biomasa microbiana y el consumo de lactosa, reafirmando el papel de este disacárido en la eficiencia fermentativa de *B. thuringiensis*. La limitada respuesta en tratamientos suplementados sugiere interferencias osmóticas o de disponibilidad nutricional que podrían alterar la expresión metabólica de *B. thuringiensis*.

Este estudio abre la posibilidad de escalar el uso del lactosuero como sustrato en procesos industriales. Sin embargo, se recomienda en futuras investigaciones realizar la evaluación del perfil proteico (Cry) del *B. thuringiensis* cultivado en este medio, así como bioensayos de eficacia biológica que permitan validar su potencial como controlador biológico.

## Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación – Minciencias (Convocatoria 15) y a la Universidad Popular del Cesar, por el apoyo académico, material y financiero. Además, de haber contribuido a la formación de un nuevo Magister.

## Conflicto de Intereses y Financiación

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés. Proyecto financiado por la Universidad Popular del Cesar.

## Referencias

1. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 2014;6(12):3296–325.
2. Khan AR, Mustafa A, Hyder S, Valipour M, Rizvi ZF, Gondal AS, et al. Bacillus spp. as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. *Biology (Basel)*. 2022;11(12):1763.
3. López Pazos SA, Cerón J. Proteínas Cry de Bacillus thuringiensis y su interacción con coleópteros. *Nova*. 2010;8(14):183.
4. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications: A century of Bacillus thuringiensis. *Plant Biotechnol J*. 2011;9(3):283–300.
5. Ragasruthi M, Balakrishnan N, Murugan M, Swarnakumari N, Harish S, Sharmila DJS. Bacillus thuringiensis (Bt)-based biopesticide: Navigating success, challenges, and future horizons in sustainable pest control. *Sci Total Environ*. 2024;954(176594):176594.
6. Portela-Dussán DD, Chaparro-Giraldo A, López-Pazos SA. Bacillus thuringiensis: en el manejo del agente de la pudrición blanda de la papa Erwinia carotovora. *Nova*. 2013;11(20):39.

7. Cabrera LMM. Consumo e impactos de los agrotóxicos en Colombia: comunidades envenenadas. *Saúde em Debate*. 2022;46(spe2):75–88.
8. Castillo BB, Mejía Dueñas CA. Exposición a plaguicidas en Latinoamérica: Revisión Bibliográfica. *Revista de ciencias forenses de Honduras*. 2023;9(1):14–25.
9. Ortiz OLO, Arango SMR, Devia J. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova* [Internet]. 2019;17(31):129–63. Available from: <https://revistas.universidadmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/950>
10. Warner GR, Mourikes VE, Neff AM, Brehm E, Flaws JA. Mechanisms of action of agrochemicals acting as endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;502(110680):110680.
11. Guégan JF, de Thoisy B, Gomez-Gallego M, Jactel H. World forests, global change, and emerging pests and pathogens. *Curr Opin Environ Sustain*. 2023;61(101266):101266.
12. Castiello F. Exposición a pesticidas no persistentes y otros disruptores endocrinos, desarrollo puberal y susceptibilidad genética en niños y niñas de la cohorte infancia y medio ambiente (INMA). Universidad de Granada [Internet]. 2023; Available from: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/82018>
13. El-Bendary MA, Moharam ME, Foda MS. Efficient mosquitocidal toxin production by *Bacillus sphaericus* using cheese whey permeate under both submerged and solid state fermentations. *J Invertebr Pathol*. 2008;98(1):46–53.
14. Maggi C, Chreil R. Toxicidad de pesticidas para insectos polinizadores. *Researchgate*, [Internet]. 2023;5:33–42. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Roli-Chreil/publication/371683983\\_Toxicidad\\_de\\_pesticidas\\_para\\_insectos\\_polinizadores/links/648fbb4a95bbbe0c6ed16595/Toxicidad-de-pesticidas-para-insectos-polinizadores.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Roli-Chreil/publication/371683983_Toxicidad_de_pesticidas_para_insectos_polinizadores/links/648fbb4a95bbbe0c6ed16595/Toxicidad-de-pesticidas-para-insectos-polinizadores.pdf)
15. Cuatlayotl-Cottier R, Huerta-de la Peña A, Peña-Chora G, Salazar-Magallón JA. Insecticidal activity of industrial by-products fermented by *Bacillus thuringiensis* strain GP139 against Mites (Prostigmata: Tetranychidae) and Aphids (Hemiptera: Aphidoidea). *Biocontrol Sci Technol*. 2022;32(1):103–9.
16. El-Gayar K, Essa A, Abada E. Whey fermentation for protease production using *Bacillus thuringiensis* isolated from mangrove rhizosphere soil in Jazan, Saudi Arabia. *Pol J Environ Stud*. 2020;29(3):2167–76.
17. Lormendez CC, Fernandez-Ruvalcaba M, Adames-Mancebo M, Hernandez-Velazquez VM, Zuñiga-Navarrete F, Flores-Ramirez G, et al. Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep*. 2019;9(1):17586.
18. Zandona E, Blažić M, Režek Jambrak A. Whey utilization: Sustainable uses and environmental approach. *Food Technol Biotechnol*. 2021;59(2):147–61.
19. Asas C, Llanos C, Matavaca J, Verdezoto D. Whey: environmental impact, uses and applications via biotechnology mechanisms. *Agroindustrial science*. 2021;11(1):105–16.
20. Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegán). Contexto ganadero. 2018 [cited 2025 Jul 16]. Queso de contrabando cuesta 66,6 % menos que el formal en el Cesar. Available from: <https://www.fedegan.org.co/noticias/queso-de-contrabando-cuesta-666-menosque-el-formal-en-el-cesar>
21. Kilara A, Vaghela MN. Whey proteins. In: *Proteins in Food Processing*. Elsevier; 2018. p. 93–126.
22. Vanegas Padilla DL, Frago Castilla PJ, Vanegas Padilla AP. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Bacillus thuringiensis* aislados de cultivos de *Capsicum* sp., sobre *Fusarium oxysporum*. *Revista Nova publicación científica en ciencias biomédicas*. 2025 Jul 1;23(45):115–37.
23. Caycedo Lozano L, Corrales Ramírez LC, Trujillo Suárez DM. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*. 2021 Sep 20;19(36):49–94.
24. Olivieri Salas GF, Frago Castilla PJ. MEDIOS DE CULTIVO NO CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis*. 1st ed. Escuela Internacional de Negocios y Desarrollo Empresarial de Colombia, editor. Vol. 1. Editorial EIDEC; 2024. 1–75 p.
25. Zegeye ED, Aspholm M. Efficient Electroporation of *Bacillus thuringiensis* for Gene Manipulation and Expression. *Curr Protoc*. 2022;2(11):e588.

26. Ha M, Jo HJ, Choi EK, Kim Y, Kim J, Cho HJ. Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29(6):887–96.
27. Rodríguez-Tolosaa R, Cifuentes-Vega R, Hernández-Fernández J. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como método para predecir la susceptibilidad sobre insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros plaga de la agricultura. *Revista Mutis*. 2023;13(1):1–34.
28. Logan NA, Vos P De. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 1–163.
29. Fatima N, Bibi Z, Rehman A, Bukhari DA. Biototoxicity comparison of *Bacillus thuringiensis* to control vector borne diseases against mosquito fauna. *Saudi J Biol Sci*. 2023;30(4):103610.
30. Hill AR, Irvine DM, Bullock DH. Precipitation and recovery of whey proteins: A review. *Canadian Institute of Food Science and Technology journal*. 1982;15(3):155–60.
31. Kristensen HT, Møller AH, Christensen M, Hansen MS, Hammershøj M, Dalsgaard TK. Co-precipitation of whey and pea protein – indication of interactions. *Int J Food Sci Technol*. 2020;55(8):2920–30.
32. Saberi F, Marzban R, Ardjmand M, Pajoum Shariati F, Tavakoli O. Optimization of culture media to enhance the ability of local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2020;
33. Ramya E K, Sharmila S, Mownika S, Abdul K, Suji H A. Isolation and Molecular Identification of Cellulase producing bacteria from soil and litter in Veerakkal forest area, The Western Ghats, India. *Res J Biotechnol*. 2023;18(7):91–104.
34. Alves LFA, Alves SB, Pereira RM, Capalbo DMF. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* Grown in Alternative Media. *Biocontrol Sci Technol*. 1997;7(3):377–84.
35. Barssoum R, Al Kassis G, Nassereddine R, Saad J, El Ghoul M, Abboud J, et al. Biochemical limitations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides production in a wheat bran culture medium. *Res Microbiol*. 2023;174(6):104043.
36. Devidas PC, Pandit BH, Vitthalrao PS. Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*. *The Scientific World Journal* [Internet]. 2014;2014:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/273030/>
37. Burgos Montañez LJ. Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de pinya con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar investigación específica*. 2020;7(1):57–66.
38. Paddock KJ, Pereira AE, Finke DL, Ericsson AC, Hibbard BE, Shelby KS. Host resistance to *Bacillus thuringiensis* is linked to altered bacterial community within a specialist insect herbivore. *Mol Ecol*. 2021;30(21):5438–53.
39. Lablaine A, Chamot S, Serrano M, Billaudeau C, Bornard I, Carballido-Lopez R, et al. A new fluorescence-based approach for direct visualization of coat formation during sporulation in *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*. 2023 May 12;1:1–31.
40. Yasmin A, Butt MS, Sameen A, Shahid M. Physicochemical and amino acid profiling of cheese whey. *Pak J Nutr*. 2013;12(5):455–9.
41. López-Barreto RE, Becerra-Jiménez ML, Borrás-Sandoval LM. Caracterización físico-química y microbiológica del lactosuero del queso Paipa. *Ciencia y agricultura* [Internet]. 2018;15(2):99–106. Available from: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3176651?show=full>
42. Naik B, Kohli D, Walter N, Gupta AK, Mishra S, Khan JM, et al. Whey-carrot based functional beverage: Development and storage study. *J King Saud Univ Sci*. 2023;35(6):102775.
43. Dos Santos HMM, de S. Varize C, Valença CAS, Dossi FCA, de Aragão Batista M V, Fernandes RPM, et al. Use of agro-industrial bio-waste for the growth and production of a previously isolated *Bacillus thuringiensis* strain. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2024 Jan 4;13(1):5.
44. Li S, He H, Zhang Y, Ning X, Ding Z, Zhang L, et al. Identification of a Novel Lactose-Specific PTS Operon in *Bacillus licheniformis* and Development of Derivative Artificial Operon Modules. *J Agric Food Chem*. 2023 Nov 5;

45. Rajendran D, Venkatachalam P, Ramakrishnan J. Response surface methodology: optimisation of antifungal bioemulsifier from novel *Bacillus thuringiensis*. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:423289.
46. Gómez Soto JA, Sánchez Toro ÓJ. Producción de galactooligosacáridos: alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*. 2022;37(01):129–58.
47. Zapata ACC, Múnera JFH, Rave NAG, Roldán BDL, Uribe MAG. Aprovechamiento de lactosuero para la producción de ácido láctico y posibles aplicaciones. *Revista Gipama*. 2019;1(1):169–78.
48. Mazmira MM, Ramlah SAA, Rosfarizan M, Ling TC, Ariff AB. Effect of saccharides on growth, sporulation rate and  $\delta$ -endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *Afr J Biotechnol*. 2012;11(40).
49. Ma X, Hu J, Ding C, Portieles R, Xu H, Gao J, et al. New native *Bacillus thuringiensis* strains induce high insecticidal action against *Culex pipiens pallens* larvae and adults. *BMC Microbiol*. 2023;23(1):100.
50. Portela-Dussán DD, Chaparro-Giraldo A, López-Pazos SA. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*. 2013 Dec 15;11(20):87–96.
51. Rojas Rojas MM, Valencia Sandoval K, Brambila Paz J de J. Bioeconomía circular, una oportunidad de agregar valor y aumentar la competitividad de la cadena de valor leche-queso en México. *Nova Scientia*. 2025 Jan 31;16(33):1–12.

© 2025 – Gino Francesco Olivieri, Pedro José Fragoso, Dinary Eloisa Durán Sequeda.



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). Use, distribution, or reproduction in other forums is permitted, provided that the original author and copyright owner are credited and the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution, or reproduction is permitted that does not comply with these terms.