

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL  
DEL INÓCULO Y MEDIO DE CULTIVO PARA LA  
PRODUCCIÓN DE UN BIOACARICIDA A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* EN UN BIOREACTOR  
DISCONTINUO A ESCALA PILOTO**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

**Ingeniera en Biotecnología**

**ELABORADO POR:**

**ANGÉLICA MARÍA PAUCAR SÁNCHEZ**

SANGOLQUÍ, 21 de Enero de 2011

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

## **ELABORADO POR**

---

Angélica María Paucar Sánchez

## **COORDINADOR DE LA CARRERA**

---

Ing. Rafael Vargas

## **SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Abgda. Laura López

Sangolquí, 21 de Enero de 2011

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita **ANGELICA MARÍA PAUCAR SÁNCHEZ** como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

---

**Fecha**

---

M.Sc. Pablo Araujo.  
**DIRECTOR**

---

Lcda. María Fernanda Loayza.  
**CODIRECTOR**

## **DEDICATORIA**

A ti Señor por darme la vida y poner en mi camino a todas esas personas maravillosas que pusieron su granito de arena para poder culminar esta investigación.

A mi madre que estuvo alentándome con sus consejos para que no desfallezca y siga el camino correcto durante todo el transcurso de mi vida y carrera.

A mis angelitos que los quiero mucho Diana, Fabri, Mateo, Sari, Isabella.

Angélica Paucar

## **AGRADECIMIENTOS**

A la empresa HILSEA INVESTMENTS LTD. Especialmente al Ing. Pablo Viteri por la oportunidad brindada

A mi querida e inolvidable Dra. María Labán quién con sus valiosos conocimientos, observaciones y sugerencias supo dirigir con responsabilidad el presente trabajo de investigación.

A todo el grupo Diagnóstico & Biopropagación por la colaboración recibida.

A mis amados padres: Trinidad y Francisco por su amor y apoyo incondicional.

Gracias por el apoyo de mis queridos hermanos: Edison, Marco, Juan.

A mis estimadas amigas Lore, Majo, Tati, Fer.

Al Ing. Pablo Araujo, Lcda María Fernanda Loayza, Mat. Pedro Romero por colaborar con sus conocimientos para llevar a cabo este trabajo.

Angélica Paucar

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |          |
|---|----------|
| HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....                                    | ii       |
| CERTIFICACIÓN .....   | iii      |
| DEDICATORIA .....   | iv       |
| AGRADECIMIENTOS .....   | iv       |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS .....  | vii      |
| ÍNDICE DE CUADROS .....   | xi       |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | x        |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | xi       |
| ÍNDICE DE ANEXOS .....  | xiii     |
| RESUMEN .....   | xi       |
| ABSTRACT.....   | xiii     |
| <b>CAPITULO I. INTRODUCCION.....</b>                                    | <b>1</b> |
| 1.1 Formulación del problema .....                                      | 1        |
| 1.2. Justificación del problema .....                                   | 1        |
| 1.3. Objetivos de la investigación.....                                 | 3        |
| 1.3.1. Objetivo General.....  | 3        |
| 1.3.2. Objetivos específicos .....                                      | 3        |
| 1.4. Marco Teórico.....   | 3        |
| 1.4.1. Control Biológico .....  | 3        |
| 1.4.2. Historia de la aplicación de <i>Bacillus thuringiensis</i> ..... | 4        |
| 1.4.3. Hábitat.....   | 5        |
| 1.4.4. Morfología .....   | 5        |
| 1.4.5. Metabolismo .....  | 6        |
| 1.4.5.1. Fase de crecimiento exponencial (tropofase).....               | 7        |
| 1.4.5.2. Fase de transición.....  | 7        |
| 1.4.5.3. Fase de esporulación (idiofase).....                           | 7        |
| 1.4.6. Cristales paraesporales proteicos ( $\delta$ -endotoxina) .....  | 8        |
| 1.4.6.1. Mecanismo de acción.....                                       | 9        |
| 1.4.7. Condiciones de crecimiento.....                                  | 10       |
| 1.4.8. Requerimientos Nutricionales.....                                | 11       |
| 1.4.9. Escalamiento de bioprocesos .....                                | 11       |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.4.10. Fermentación Discontinua .....   | 13        |
| 1.5. Hipótesis .....   | 14        |
| <b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1. Participantes.....  | 15        |
| 2.2. Zona de Estudio .....   | 15        |
| 2.3. Período de tiempo de investigación .....  | 15        |
| 2.4. Diseño de las Fases de la Investigación.....  | 15        |
| 2.4.1. Fase de Laboratorio .....   | 15        |
| 2.4.1.1. Reactivación de la cepa.....  | 15        |
| 2.4.1.2. Selección de los medios de cultivo .....  | 16        |
| 2.4.1.3. Preparación de la concentración del inóculo .....   | 16        |
| 2.4.1.4. Optimización de la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo<br>para la producción de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> ..... | 16        |
| 2.4.1.5. Evaluación y conteo de cristales.....   | 18        |
| 2.4.1.6. Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> por fermentación discontinua a<br>escala de 1 litro. ....   | 18        |
| 2.4.2 Fase a nivel de planta piloto .....  | 19        |
| 2.4.2.1 Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> por fermentación discontinua a<br>escala piloto (7 litros). ....                                       | 19        |
| 2.4.2.1.1 Preparación del inóculo .....  | 19        |
| 2.4.2.1.2 Determinación de la cinética de crecimiento .....  | 20        |
| a) Determinación de la concentración de Biomasa .....  | 20        |
| b) Evaluación del consumo de glucosa.....  | 21        |
| c) Evaluación de la variación de pH.....   | 22        |
| d) Determinación del Oxígeno disuelto .....  | 22        |
| e) Método dinámico.....  | 22        |
| <b>CAPÍTULO III. RESULTADOS.....</b>   | <b>24</b> |
| 3.1 Fase de Laboratorio .....  | 24        |
| 3.1.1 Reactivación de la cepa.....   | 24        |
| 3.1.2 Optimización de la concentración inicial del inicial del inóculo y medio de<br>cultivo. ....   | 25        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.3 Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> por fermentación discontinua a escala de 1 litro y 7 litros.....           | 27        |
| 3.1.3.1 Determinación de los parámetros de cultivo.....  | 27        |
| 3.1.3.2 Determinación del pH del proceso productivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> a escala de 1 litro y siete litros..... | 28        |
| 3.1.3.3 Determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrica a escala de 1 litro y 7 litros.....               | 29        |
| <b>CAPITULO IV. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>CAPITULO V. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>CAPITULO VI. RECOMENDACIONES .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>38</b> |

## INDICE DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| CUADRO 1.1 Clasificación taxonómica de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Carrera, 2009) .....   | 6  |
| CUADRO 1.2 Asociaciones entre los principales tipos de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> y su espectro de actividad insecticida (Sauka y Benintende, 2008). ..... | 9  |
| CUADRO 3.1 Condiciones a nivel fermentador de 14 litros para la producción de la delta endotoxina (cristal) .....  | 20 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| TABLA 2.1 Datos del experimento factorial 3×3. ....  | 17 |
| TABLA 3.2 Prueba de Tukey de los cuatro medios de cultivo para la producción de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Quito, Pichincha, 2010.....   | 27 |
| TABLA 3.3 Parámetros de la cinética de la fase exponencial del crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio con melaza a escala de 1 litro y 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010. .... | 28 |
| TABLA 3.4 Parámetros de Oxígeno de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio con melaza a escala de 1 litro y 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010.....   | 29 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1.1 Vista macroscópica de <i>Bacillus thuringiensis</i> después de 24 horas de incubación en Agar Nutriente. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche-Ecuador. Mayo 2010.....                                       | 6  |
| FIGURA 1.2 Vista microscópica a 100X de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fase exponencial a las 9 horas en medio de cultivo a base de melaza. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche Ecuador Julio 2010.....             | 7  |
| FIGURA 1.3 Vista microscópica a 100X de <i>Bacillus thuringiensis</i> en estado estacionario a las 54 horas en medio de cultivo a base de melaza. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche-Ecuador. Julio 2010.....        | 8  |
| FIGURA 1.4 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> en estado de esporangio. C: cristal paraesporal; E: espora. Barra, 0,5 mm (Sauka y Benintende, 2008).....                                    | 8  |
| FIGURA 1.5 Modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Palacios, 2008).....  | 10 |
| FIGURA 1.6 Esquema del escalado a 7L del proceso de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Hilsea Inv: El Quinche –Ecuador. 2010.....  | 12 |
| FIGURA 1.7 Esquema de Fermentador o Bioreactor Discontinuo (Paulín, 2008).....  | 13 |
| FIGURA 2.1 Reacción del Ácido 3,5-dinitrosalicílico con Glucosa (Fajardo y Sarmiento, 2007).....  | 21 |
| FIGURA 2.2 Perfil de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor biológico durante la aplicación del método dinámico (Oller, 2008).....  | 22 |
| FIGURA 3.1 Vista microscópica en tinción Gram de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche Ecuador Mayo 2010.....   | 24 |
| FIGURA 3.2 Vista macroscópica de las colonias de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche Ecuador Mayo 2010.....   | 25 |
| FIGURA 3.3 Interacción de la concentración del inóculo y medio de cultivo (Medio 1= Glucosa; Medio 2 = Sacarosa; Medio3 = Melaza; Medio 4 = Miel de Maíz) para la producción de de cristales (UFC/ml) a escala de 200 ml. Quito, Pichincha, 2010..... | 26 |
| FIGURA 3.4 Curva de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> y consumo de sustrato en el medio de cultivo a base de melaza (M3) a escala de 1 litro y 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010.....   | 53 |
| FIGURA 3.5 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> a escala 1 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010.....   | 54 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 3.6 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> a escala 1 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010 .....   | 54 |
| FIGURA 3.7 Transformación lineal de Lineweaver-Burk a escala de 1 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010 .....  | 55 |
| FIGURA 3.8 Transformación lineal de Lineweaver-Burk a escala de 7 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010 .....  | 55 |
| FIGURA 3.9 Rendimiento celular en base del sustrato a escala de 1 litro. Quito, Pichincha, Ecuador 2010 .....                                    | 56 |
| FIGURA 3.10 Rendimiento celular en base del sustrato a escala de 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010 .....                                  | 56 |
| FIGURA 3.11 Determinación del pH de la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> a escala de 1 litro. Quito, Pichincha, Ecuador 2011 .....     | 57 |
| FIGURA 3.12 Determinación del pH de la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> a escala de 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010 .....    | 57 |
| FIGURA 3.13 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico escala 1 litro. Quito, Pichincha, 2010. .... | 58 |
| FIGURA 3.14 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico escala 7 litros. Quito, Pichincha, 2010..... | 58 |
| FIGURA 3.15 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo del punto AB a escala 1 litro. Quito, Pichincha, 2010.....           | 59 |
| FIGURA 3.16 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo del punto AB a escala 7 litros. Quito, Pichincha, 2010 .....         | 59 |
| FIGURA 3.17 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a escala 1 litros. Quito, Pichincha, 2010.....                 | 60 |
| FIGURA 3.18 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a escala 7 litros. Quito, Pichincha, 2010.....                 | 60 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| ANEXO A Preparación de las concentraciones del inóculo.....   | 45 |
| ANEXO B Tinción Gram y Tinción de esporas (Wirtz-Conklin).....  | 46 |
| ANEXO C Conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser.....   | 47 |
| ANEXO D Curva de calibración para medir la Biomasa.....   | 48 |
| ANEXO E Curva de calibración para la cuantificación de glucosa.....   | 49 |
| ANEXO F Calibración del electrodo poligráfico del medidor de oxígeno.....   | 51 |
| ANEXO G ANOVA de la interacción concentración del inóculo y medios de cultivo sobre la concentración de los cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> a escala de 200ml. Quito, Pichincha, 2010..... | 52 |
| ANEXO H Cinética de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....  | 53 |
| ANEXO I Diagrama del proceso de producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....   | 61 |
| ANEXO J Esquema del Funcionamiento del Fermentador de 14 litros.....  | 62 |
| ANEXO K Fotografías.....  | 63 |

## RESUMEN

Este trabajo se realizó con la finalidad de optimizar la producción de cristales paraesporales con actividad de controlador biológico a partir de cultivos de *Bacillus thuringiensis*. Se optimizó la fuente de carbono en el caldo de cultivo en base de glucosa, melaza, sacarosa y miel de maíz. También se varió las concentraciones de inóculo inicial del microorganismo de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  UFC/mL. Los resultados demostraron que la concentración del inóculo y la interacción entre este parámetro y el tipo de fuente de carbono en el medio de cultivo no tuvieron efecto significativo sobre la producción de cristales paraesporales. Por el contrario el medio de cultivo suplementado con melaza resulto en ser significativamente más efectivo en la producción de cristales paraesporales ( $9,77 \times 10^9$  UFC/mL). Este medio de cultivo fue utilizado para escalar el proceso productivo de 1 a 7 litros, el criterio de escalamiento utilizado fue un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante de  $54 \text{ h}^{-1}$ . Se cuantificó la cinética de crecimiento del microorganismo por espectrofotometría y el consumo de sustrato por la técnica del DNS, resultando los dos parámetros semejantes en los dos niveles de escalamiento. En conclusión, el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* fue aquel suplementado con melaza y el parámetro de mayor influencia en el escalamiento del proceso de fermentación fue el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

## ABSTRACT

This research was performed in order to improve the production of Cry proteins with biological control activity in base of *Bacillus thuringiensis* culture. It was optimized the carbon source in culture medium in base of glucose, syrup, sucrose and corn syrup. Also, the initial microorganism concentration in the inoculums was varied from  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^9$  UFC/mL. The results showed that there was not significant effect on Cry proteins production, when the inoculum concentration or its interaction with the carbon source in culture media was analyzed. On the contrary, the culture medium supplemented with syrup showed a significant more efficient Cry proteins production. ( $9,77 \times 10^9$  UFC/mL). This culture medium was used to scale the production process from 1 to 7liters. Scaling criterion used was a constant volumetric coefficient of oxygen transfer to  $54 \text{ h}^{-1}$ . The bacteria growth kinetics and substrate consumption were evaluated by spectrophotometry and DNS colorimetric technique respectively. Both, bacteria growth kinetics and substrate consumptions were similar in two scale levels. In conclusion, the better culture medium for *Bacillus thuringiensis* growth was that supplemented with syrup and the more influence parameter for scale process was the volumetric coefficient of oxygen transfer.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 Formulación del problema

En el sector agrícola especialmente en la floricultura, uno de los principales factores del deterioro ambiental es el uso de productos químicos para el control de plagas. Estos productos no son biodegradables, ni selectivos e incluso, algunas plagas desarrollan resistencia a su administración por lo que se ha comenzado a limitar su empleo. Los productos desarrollados por la biotecnología como los bioplaguicidas obtenidos a partir de microorganismos son utilizados como agentes biocontroladores de diferentes variedades de fitopatógenos. La biodegradabilidad y especificidad de estos agentes los hacen inofensivos para otros organismos vivos, siendo esta una característica que proporciona ventajas que conllevan al incremento de su utilización en remplazo de los insecticidas químicos.

### 1.2. Justificación del problema

Las pérdidas ocasionadas por ácaros en los diferentes cultivos comerciales, en especial los de rosas, representan del 10 al 30% de la producción (Mercado, 2007). La utilización de agroquímicos es el arma más poderosa contra los ácaros-plaga. La mayoría de estos productos son compuestos orgánicos sintéticos similares a los insecticidas. Entre los acaricidas utilizados en la actualidad se describen: Mavrik (*Tau-fluvalinato*), Mitac (*Amitraz*), Nissorum (*Hexythiazox*), Pentac (*Dienochlor*) (Gallegos, 2006). Según Lara (2008), el 80% de las ventas globales de estos productos se genera en los países desarrollados, el 20% restante corresponde por lo tanto a los países en vías de desarrollo. La utilización de estos compuestos químicos ha originado un alto nivel de contaminación ambiental y laboral, lo que se manifiesta en enfermedades, destrucción de flora, fauna y de los recursos naturales disponibles (Palacios, 2004).

En este contexto, el control biológico refiere a la utilización de entomopatógenos como una alternativa de menor impacto ecológico para el manejo de ácaros de importancia económica en la floricultura (Mercado, 2007). Entre los entomopatógenos más destacados se encuentra el *Bacillus thuringiensis*, caracterizado por la producción de cristales paraesporales compuestos por proteínas con actividad antilepidóptera, anticoleóptera y antidíptera; recientemente se han identificado cepas con efectos controladores sobre fitopatógenos del grupo de los nematodos, ácaros entre otros (Gomero y Tazza, 2002).

La introducción reciente de productos biológicos para el control de plagas en países industrializados en el área de floricultura, ha generado un incremento en el rendimiento de la producción de flores, mejorando la calidad con un menor impacto ambiental (Capote y Torres, 2004).

Muchos reportes de investigación han cubierto diferentes aspectos relacionados a *Bacillus thuringiensis*, tales como genética, metabolismo y producción de toxinas; sin embargo muy poco se ha enfocado a los procesos de fermentación y desarrollo de tecnología para su producción.

En vista que las investigaciones de procesos biotecnológicos de fermentación y producción de *Bacillus thuringiensis* en cantidades industriales se han realizado en países como: España, México, Argentina entre otros, el uso a escala comercial de esta bacteria en el mercado ecuatoriano ha sido limitado, siendo así un factor restrictivo para que este producto no se encuentre a disposición de los floricultores.

La alta demanda de esta bacteria entomopatógena por parte de la empresa HILSEA INVESTMENT LIMITED como una alternativa para el control plagas, en especial ácaros en sus cultivos; pone en consideración la necesidad de establecer investigaciones apoyadas en la biotecnología industrial, para determinar experimentalmente las condiciones óptimas de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en Bioreactores a escala piloto logrando así masificar la producción y cubrir toda la demanda del biocontrolador (Vélez y Aguirre, 2000).

Adicionalmente esta investigación plantea una alternativa de reducción de costos de producción al tiempo que implementa herramientas de protección ambiental, precautelando la salud de los trabajadores de las áreas de riesgo.

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Optimizar la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo para la producción de un bioacaricida a partir de *Bacillus thuringiensis* en un Bioreactor Discontinuo a escala piloto.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Establecer el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* a nivel de laboratorio.
- Determinar la concentración del inóculo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*.
- Realizar un escalamiento del proceso productivo del bioacaricida de uno a siete litros.
- Determinar la cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis*.

### **1.4. Marco Teórico**

#### **1.4.1. Control Biológico**

El control biológico se define como el uso de microorganismos capaces de combatir efectos no deseados de plagas en los cultivos agrícolas (Martínez, 2005). Se considera entonces como una aplicación natural, cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre; y es artificial o aplicado cuando, de alguna manera, es afectado o manipulado por el hombre (Carrera, 2009).

Los agentes microbianos utilizados para el control biológico son organismos que se encuentran en la naturaleza como: virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos (Llagostera, 2009).

Actualmente se han descrito alrededor de 300 bacterias entomopatógenas, la más importante desde el punto de vista comercial pertenece al género *Bacillus*. Cuatro especies de este género han sido estudiadas como insecticidas microbianos: *Bacillus popilliae*, *Bacillus moritai*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* (Bt); esta última representa el entomopatógeno de mayor producción en el mundo, debido a su rápida acción y a la posibilidad de producirlo *in vitro* en forma industrial. Las células esporuladas y cristales de Bt pueden producirse con métodos convencionales haciéndolas competitivas en costo con relación a los insecticidas químicos (Gallegos, 2003).

#### **1.4.2. Historia de la aplicación de *Bacillus thuringiensis***

El primer aislamiento de Bt se lo obtuvo de orugas enfermas del gusano de seda (*Bombix mori*), en el año de 1901 por el japonés Ishiwata. Posteriormente en 1915 el alemán Berliner, aisló de la misma manera esta bacteria a partir de las larvas de la palomilla de harina del mediterráneo (*Anagasta kuehnila*), a la cual denominó *Bacillus thuringiensis* por Thuringia región Alemana (Ponce, 1995).

El primer producto comercial llamado Sporeine apareció en 1938 y fue de origen Francés, se lo comercializó por primera vez en Estados Unidos en el año de 1957 con el nombre de Thuricide. Desde entonces se ha desarrollado la producción de forma masiva en varios países (Llagostera, 2007).

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

En 1977, dos entomólogos israelíes aislaron Bt serovar *israeliensis* a partir de larvas del mosquito *Culex sp*, esto fue de gran importancia para la salud pública porque controlaba los vectores de enfermedades tropicales como el dengue (Gutiérrez, 1993).

En los años 80 se descubrieron cepas activas contra coleópteros como: Bt serovar *morrison*, *tenebrosis* y, *san diego*. Sin embargo las serovariedades de importancia industrial han sido *morrison*, *kustaki* e *israeliensis*. Hasta el momento se ha descrito 83 serovariedades distintas según su antígeno flagelar, en el intento de encontrar nuevas toxinas con nuevas actividades biológica (Ponce, 1995).

#### **1.4.3. Hábitat**

Muchas subespecies de Bt han sido aisladas de insectos muertos o moribundos, pertenecientes a los órdenes Coleóptera, Lepidóptera y Díptera; pero también del suelo, superficies foliares y otros hábitats. Las esporas de esta bacteria pueden permanecer latentes por años, si estas encuentran un ambiente propicio como un medio de cultivo, la espora generará células vegetativas (Palacios, 1993).

#### **1.4.4. Morfología**

Bt es un bacteria Gram-positiva, aeróbica, esporogénica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho, frecuentemente se encuentra en cadenas y presenta flagelación peritrica (Soberón y Bravo, 2008). Poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, maltosa, ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno (Sauka y Benintende, 2008).

En medios de cultivo convencionales las colonias se observan en forma circular con bordes irregulares, perfil plano, color marfil claro, con aspecto harinoso y ceroso. El diámetro que alcanza en la placa depende de la densidad de colonias que posee (Figura 1.1) (Llagostera, 2007).



Figura 1.1 Vista macroscópica de *Bacillus thuringiensis* después de 24 horas de incubación en Agar Nutriente. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche-Ecuador. Mayo 2010

La principal característica de la bacteria es que está constituida por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxina también conocidas como proteínas Cry (del inglés Crystal) que se forman durante el proceso de esporulación. La clasificación taxonómica de Bt según Bergey's Manual of Determinative Bacteriology se observa en la tabla 1.1

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de *Bacillus thuringiensis* (Carrera, 2009)

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| <b>Reino</b>   | <b>Eubacteria</b>    |
| <b>Phylum</b>  | Firmicutes           |
| <b>Clase</b>   | Bacilli              |
| <b>Orden</b>   | Bacillales           |
| <b>Familia</b> | Bacillaceae          |
| <b>Género</b>  | <i>Bacillus</i>      |
| <b>Especie</b> | <i>thuringiensis</i> |

#### 1.4.5. Metabolismo

Es una bacteria quimioheterótrofa, oxida aeróbicamente los carbohidratos convirtiéndolos en ácidos orgánicos. Esta especie bacteriana, durante su ciclo de vida, presenta tres fases: la fase de crecimiento exponencial (vegetativo), fase de transición y fase de esporulación (Lara, 2008).

#### 1.4.5.1. Fase de crecimiento exponencial (tropofase)

En esta fase las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 minutos dependiendo del medio de cultivo (Figura 1.2); utilizan para catabolizar sus carbohidratos una ruta glucolítica llamada Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), la cual representa el principal sistema de conversión de glucosa en metabolitos intermediarios como: piruvato, acetato, polihidroxibutirato (PHB) (Gutiérrez, 1993).

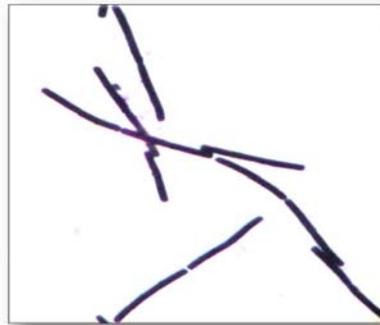


Figura 1.2 Vista microscópica a 100X de *Bacillus thuringiensis* en fase exponencial a las 9 horas en medio de cultivo a base de melaza. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche Ecuador Julio 2010

#### 1.4.5.2. Fase de transición

Esta fase ocurre a la mitad de la fase exponencial o logarítmica; cuando la mitad de los azúcares han sido consumidos. Los metabolitos intermedios (piruvato, acetato, PHB) producidos en la fase exponencial son catabolizados vía el ciclo tricarbóxico o ciclo de Krebs modificado para producir energía y  $\text{CO}_2$  (Ponce, 1995).

#### 1.4.5.3. Fase de esporulación (idiofase)

En la fase estacionaria ante el estrés de la bacteria por la falta de nutrientes en el medio se da lugar a la fase de esporulación que es un programa de diferenciación de bacteria a espóra, además en esta fase comienza la formación del cristal paraesporal, (Soberón M. y Bravo A, 2008).

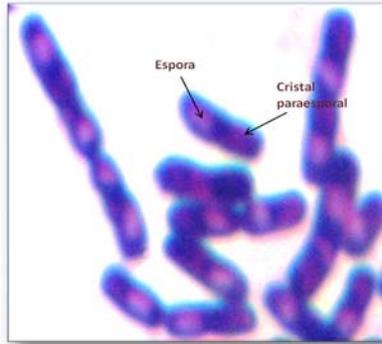


Figura 1.3 Vista microscópica a 100X de *Bacillus thuringiensis* en estado estacionario a las 54 horas en medio de cultivo a base de melaza. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche-Ecuador. Julio 2010

#### 1.4.6. Cristales paraesporales proteicos ( $\delta$ -endotoxina)

Es una toxina sintetizada en forma de protoxina durante el proceso de esporulación y es considerada de mucha importancia en microbiología industrial; ya que la actividad plaguicida de Bt se basa en esta toxina. La protoxina aparece como una inclusión cristalina dentro del esporangio a la cual se la conoce también como: Cuerpo paraesporal, Cristal de proteína o solamente cristal (Cry) (Figura 1.2) (Sauka y Benintende, 2008).



Figura 1.4 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en estado de esporangio. C: cristal paraesporal; E: espóra. Barra, 0,5  $\mu$ m (Sauka y Benintende, 2008).

El cristal paraesporal puede presentar varias morfologías: bipyramidal, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes. Existe una

correlación bastante alta entre la forma del cristal y la actividad tóxica (Cuadro 1.1) (Márquez *et al*, 1999).

Cuadro 1.2 Asociaciones entre los principales tipos de cristales de *Bacillus thuringiensis* y su espectro de actividad insecticida (Sauka y Benintende, 2008).

| Tipo de cristal          | Grupo                   | Toxicidad              |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Bipiramidal</b>       | Cry1                    | Lepidópteros           |
| <b>Cúbico</b>            | Cry2                    | Lepidópteros, Dípteros |
| <b>Cuadrado aplanado</b> | Cry3                    | Coleópteros            |
| <b>Esférico</b>          | Cry4A,Cry4B,Cry10,Cry11 | Dípteros               |

También los cristales son tóxicos para ácaros y otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Palacios, 1993).

Los cristales pueden ser degradados por acción de los microorganismos del suelo y al igual que las esporas pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta, además son termolábiles y solubles en soluciones alcalinas a pH de 10 a 11 (Llagostera, 2007).

#### 1.4.6.1. Mecanismo de acción

La protoxina debe ser ingerida por el insecto susceptible, cuyo intestino posee un pH alcalino superior a 9,5 lo cual es esencial para la disolución de las protoxinas de *Bacillus thuringiensis*, su activación se da gracias a la proteólisis causada por las enzimas digestivas del insecto (Fernández y Larrea, 2002).

La especificidad de la  $\delta$ -endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores celulares específicos, la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales creando poros o lesiones que conduce a una variación en la permeabilidad celular, alterando el transporte de iones potasio destruyéndola, causando así la disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto en 24 a 48 horas posteriores a la ingesta (Figura 1.3) (Palacios, 2008).

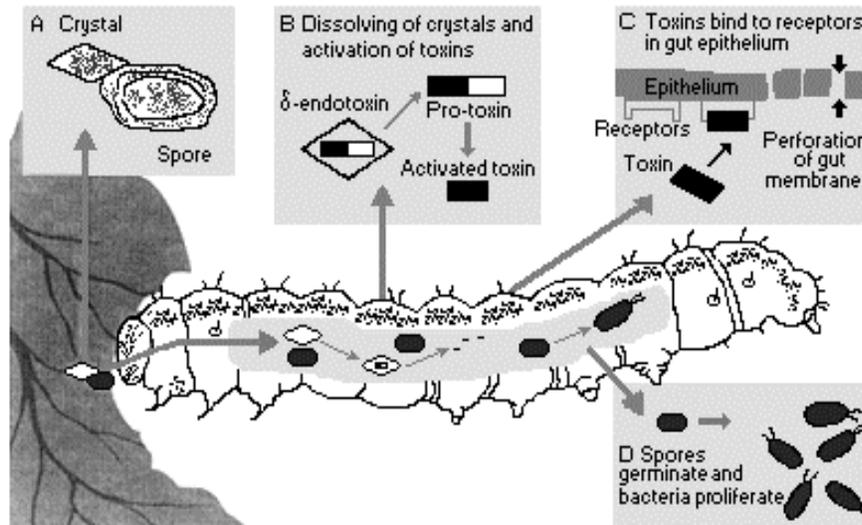


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt

Figura 1.5 Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* (Palacios, 2008).

#### 1.4.7. Condiciones de crecimiento

El crecimiento de Bt se lleva a cabo normalmente a un rango de temperatura entre 27°C y 33°C; sin embargo la producción óptima de endotoxina ocurre a los 30°C; a más de 45°C se produce una disminución en la producción de los cristales, y por ende en una baja actividad insecticida. A menos de 20°C se produce una disminución en la velocidad de crecimiento de la bacteria (Abarca *et al.*, 1992).

El pH es un parámetro importante y es necesario ajustar los medios de cultivo para mantener este parámetro en un valor mayor a 5.0. El crecimiento se favorece en un pH entre 5.6 y 8.5 (Gutiérrez, 2005). El pH inicial debe estar entre 6.8 y 7.2, durante las primeras 8 a 12 horas. Posteriormente el pH decrece a 5.8; dada la liberación acetato consecuencia del metabolismo de Bt. Cuando el acetato es consumido el pH se incrementa lentamente. Al final del proceso en el medio de cultivo el pH oscila 7,5 y 8.0 (Fernández y Larrea, 2002).

#### **1.4.8. Requerimientos Nutricionales**

Es necesario formular un medio de cultivo apto para el crecimiento, esporulación y formación de los cristales de Bt, pues de ello depende la calidad tóxica del cristal (Mercado, 2006). El medio de cultivo empleado debe contener: una fuente de carbono que suministra la energía para los procesos anabólicos, una fuente de nitrógeno de origen orgánico e inorgánico, y sales minerales para el crecimiento, esporulación y síntesis de las endotoxinas (Escobar *et al.*, 2004).

Como fuentes de carbono se emplean: glucosa, fructosa, almidones y melazas; la ausencia de carbohidratos metabolizables causa una defectuosa esporulación y formación de la protoxina. En el caso de fuentes de nitrógeno se ha reportado que este microorganismo requiere de aminoácidos esenciales y otras formas orgánicas de nitrógeno las cuales pueden ser: harina de maíz, trigo, pescado y soya, extracto de levadura y caseína. (Gutiérrez, 1993).

Los microelementos que deben utilizarse son: calcio, potasio, manganeso, hierro y magnesio (Palacios, 1993).

En un proceso aeróbico como en el caso de Bt el oxígeno es el sustrato clave y debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas, la transferencia continua de oxígeno de la fase gas a líquido para mantener el metabolismo oxidativo de las células es decisiva (Amicarelli, et al, 2008).

#### **1.4.9. Escalamiento de bioprocesos**

Es el proceso de conversión de un proceso productivo de pequeña escala a escala industrial (Figura 1.4). Las condiciones de producción a pequeña escala no son, por lo general, extrapolables, debido a que la fluidodinámica del sistema, los procesos de transporte y el comportamiento celular son diferentes (Fox y MacDonald, 2000). Por lo tanto, el escalado depende de resultados experimentales de estudios de planta piloto y laboratorio.

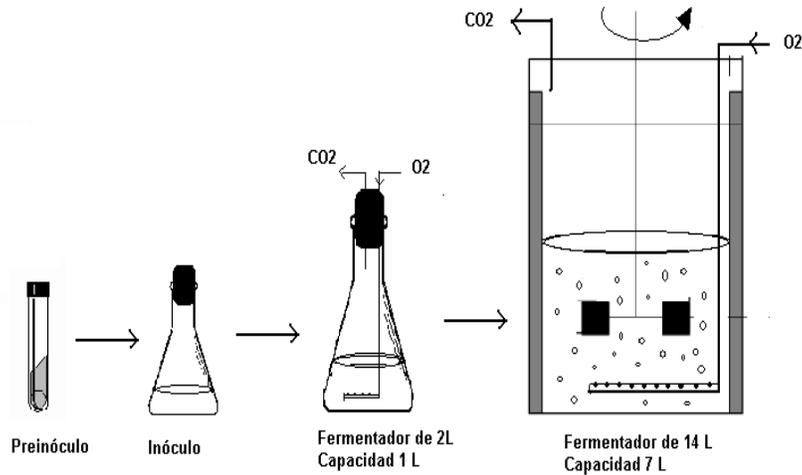


Figura 1.6 Esquema del escalado a 7L del proceso de producción de *Bacillus thuringiensis*. Hilsea Inv: El Quinche –Ecuador. 2010

Por lo general, en el laboratorio se operan matraces aproximadamente de 500 mL o bioreactores pequeños, el objetivo de esta fase es estudiar mecanismos de control y de mejorar las cepas de producción. En la planta piloto (5-500L) se estudian efectos de aireación, temperatura y control de pH (Armas, 2006).

Dado que usualmente en los procesos aeróbicos desarrollados a gran escala, el mayor problema es el suministro de oxígeno debido a su baja solubilidad en el agua (8,26 mg/L a 25°C a 1 atm), uno de los criterios de escalamiento para bioprocesos industriales es mantener constante el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_LA$ ) que es transferido de las burbujas de gas a los microorganismos (Perry, 2001). Este parámetro sirve para conocer la rapidez con la que se transfiere el oxígeno del aire al líquido contenido en un bioreactor. Entre mayor sea el  $K_LA$  mejor es la transferencia de oxígeno al medio líquido (Oller, 2008).

#### 1.4.10. Fermentación Discontinua

Llamado también procesos en batch o lote, han sido empleados desde el siglo pasado. La gran mayoría de fermentaciones a nivel industrial se llevan a cabo por esta técnica

Es un sistema cerrado que, consiste en agregar al fermentador la solución esterilizada de nutrientes para ser inoculada con el microorganismo que se desarrollará y producirá el metabolito de interés, bajo sus condiciones óptimas. A lo largo del proceso de fermentación las sustancias añadidas son: el oxígeno (en el aire filtrado), antiespumantes y ácidos o bases para controlar el pH (Figura 1.5). Una vez terminado el proceso se cosecha la totalidad del volumen del fermento para recuperar el producto. La determinación de los parámetros cinéticos de un cultivo por lote tiene la finalidad de conocer, predecir y controlar la fermentación; además este cultivo en lote tiene la particularidad de que todos los parámetros cinéticos varían con el tiempo (Fajardo y Sarmiento, 2007).

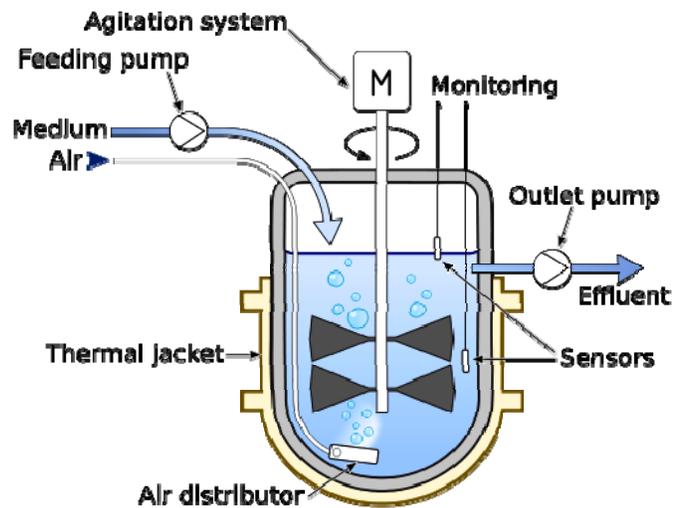


Figura 1.7 Esquema de Fermentador o Bioreactor Discontinuo (Paulín, 2008)

## **1.5. Hipótesis**

La concentración inicial del inóculo y medio de cultivo óptimos permiten la producción del bioacaricida a partir de *Bacillus thuringiensis* en un Bioreactor Discontinuo a escala piloto

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Participantes

La parte experimental de la investigación se llevo acabo en la Empresa florícola HILSEA INVESTMENT LIMITED en la unidad de negocio Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación, bajo la responsabilidad científica de la Doctora María Labán.

#### 2.2. Zona de Estudio

La unida de negocio Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación se encuentra en la finca el Chivan la misma que está ubicada en el sector de San Miguel de Atalpamba, Parroquia el Quinche, Provincia de Pichincha a 00°06'00'' Sur, 76°16'00'' Oeste, 2416 msnm.

#### 2.3. Período de tiempo de investigación

Fecha de inicio: 2 de Noviembre del 2009

Fecha de finalización: 3 de Septiembre del 2010

#### 2.4. Diseño de las Fases de la Investigación

##### 2.4.1. Fase de Laboratorio

##### 2.4.1.1. Reactivación de la cepa

Para realizar esta investigación se utilizó una cepa *Bacillus thuringiensis* de origen Ruso cuyo nombre comercial es Bitoxibacillin (BN3).

Para su purificación y activación se peso 0,1g de BN3 y se diluyó en 9,9 ml de agua destilada estéril. Luego se hicieron 3 diluciones las mismas que fueron sembradas

por la técnica de difusión en placa en agar nutriente (AN), incubándose a 30° por 24-72 horas. Se observó la morfología de las colonias y se realizó una tinción Gram para comprobar la presencia de esporas y cristales de Bt. Aquellas colonias puras cristalíferas se seleccionaron y se sembraron en tubos de agar nutritivo inclinado incubándose bajo las mismas condiciones para su crecimiento. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente, al momento de utilizarse se sembraron por estriado en cajas petri con AN.

#### **2.4.1.2. Selección de los medios de cultivo**

La selección del medio de cultivo para la producción de cristales y esporas de Bt se basó en la revisión bibliográfica y se optó por el medio descrito por Dulmage (1970) al cual se lo denominó medio 1 (medio control) compuesto de glucosa, extracto de levadura, harina de soya y sales minerales. En base a este medio se formuló tres medios de cultivo sustituyendo solamente la fuente de carbono por sacarosa (medio 2), melaza (medio 3), miel de maíz (medio 4).

#### **2.4.1.3. Preparación de la concentración del inóculo**

A partir de un cultivo de Bt puro en placa, se disolvió al microorganismo con 9mL de agua destilada estéril, obteniéndose así una solución madre de la cual se derivarán las tres concentraciones de inóculo:  $1 \times 10^7$  UFC/mL;  $1 \times 10^8$  UFC/mL;  $1 \times 10^9$  UFC/mL, ver Anexo A.

#### **2.4.1.4. Optimización de la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo para la producción de cristales de *Bacillus thuringiensis***

Se tomó el 1% (V/V) de las tres concentraciones de inóculo para sembrarlos en los 4 medios de cultivo para producir esporas y cristales, estos medios estaban contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad con 250 mL de medio, se mantuvieron una agitación de 250 rpm a 30°C durante 96 horas (Palacios, 1993)

Se aplicó un DF (Diseño factorial), compuesto de dos factores:

Factor A: Medios de Cultivo

Medio de Cultivo 1 (M1): Glucosa

Medio de Cultivo 2 (M2): Sacarosa

Medio de Cultivo 3 (M3): Melaza

Medio de Cultivo 4 (M4): Miel de Maíz

Factor B: Concentración del inóculo

Concentración del inóculo 1 (C1):  $1 \times 10^7$  UFC/ml

Concentración del inóculo 2 (C2):  $1 \times 10^8$  UFC/ml

Concentración del inóculo 3 (C3):  $1 \times 10^9$  UFC/ml

Proporcionando de este modo un modelo de 4x3 niveles, el cual constará de doce (12) tratamientos y (5) repeticiones (Tabla 3.1) (Com. pers. Romero, 2009).

Tabla 2.1 Datos del experimento factorial 3x3.

|                                |    | B: Concentración del inóculo (g bacteria/L de sustrato) |                          |                          |
|--------------------------------|----|---|--------------------------|--------------------------|
|                                |    | C1  | C2                       | C3                       |
| A:<br><br>Medios de<br>Cultivo | M1 | M1C1<br>(5 repeticiones)                                | M1C2<br>(5 repeticiones) | M1C3<br>(5 repeticiones) |
|                                | M2 | M2C1<br>(5 repeticiones)                                | M2C2<br>(5 repeticiones) | M2C3<br>(5 repeticiones) |
|                                | M3 | M3C1<br>(5 repeticiones)                                | M3C2<br>(5 repeticiones) | M3C3<br>(5 repeticiones) |
|                                | M4 | M4C1<br>(5 repeticiones)                                | M4C2<br>(5 repeticiones) | M4C3<br>(5 repeticiones) |

En un diseño factorial con dos factores, el comportamiento de la respuesta  $Y$  puede escribirse mediante el modelo de efectos dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto del nivel  $i$ -ésimo del factor A

$\beta_j$  = efecto del nivel  $j$  del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$  = efecto de interacción en la combinación  $ij$

$\varepsilon_{ijk}$  = error aleatorio

(Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Para identificar diferencias estadísticas entre la concentración del inóculo y medio de cultivo, se utilizó el paquete SPSS versión 15.0 (SPSS, 2006). Mediante este software estadístico se pudo realizar las pruebas LSD, Tukey al 95% de confianza (Com. Pers. Romero, 2009).

#### **2.4.1.5. Evaluación y conteo de cristales**

Al culminar las 96 horas del proceso de fermentación se realizó un frotis sobre un porta objetos para realizar la tinción Gram (Anexo B).

Para evaluar el medio y la concentración del inóculo más efectiva para producir el ingrediente activo (cristales), se realizó el conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser (Anexo C).

#### **2.4.1.6. Producción de *Bacillus thuringiensis* por fermentación discontinua a escala de 1 litro.**

Una vez caracterizados los parámetros óptimos de crecimiento de Bt, se inoculó una asada del microorganismo en el medio a base de melaza (medio 3) por 24 horas a una temperatura de 30°C, siguiendo lo descrito por Palacios (1993), obteniéndose un inóculo de concentración  $5 \times 10^9$  UFC/ml. Luego se vertió 10mL del inóculo que corresponde al 1% del volumen total a fermentar en 990mL del medio a base de melaza (medio 3) (Ponce, 1995). Para llevar a cabo este experimento el fermentador constó de matraces de 2 litros tapados con algodón, a los cuales se les añadió oxígeno en forma de aire a través de bombas homocinéticas (Power 500) con capacidad de 2 L/min la misma que proporcionó 1vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). Los

matraces fueron colocados en planchas de calentamiento a 30 °C (Palacios, 1993). Se realizó tres repeticiones para evaluar las variables de crecimiento bacteriano (concentración de biomasa, consumo de azúcares reductores, pH, coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno) las cuales serán explicadas a detalle en la fase de planta piloto.

## **2.4.2 Fase a nivel de planta piloto**

### **2.4.2.1 Producción de *Bacillus thuringiensis* por fermentación discontinua a escala piloto (7 litros).**

El fermentador o bioreactor constó de una olla de acero inoxidable (marca Tramontina) cuyo espesor fue de 0,7mm, con 26cm de diámetro y 26cm de altura (relación altura diámetro 1:1), con capacidad de 14 litros. Para mantener la temperatura óptima de producción, se utilizó un termostato y para evitar pérdidas de calor, el fermentador se recubrió con lana de vidrio. Se utilizó un compresor para suministrar la aireación requerida en el proceso. El aire tuvo que pasar por una unidad de mantenimiento y filtro bacteriológico para su esterilización, ver en Anexo J.

#### **2.4.2.1.1 Preparación del inóculo**

Se tomaron varias asadas de Bt y se inocularon en matraces de 500ml de capacidad los cuales contenían 200mL de medio 3 a pH=7,4 estos se mantuvieron a 250rpm durante 24 horas a 30°C. En el fermentador se colocó 7 litros del medio de cultivo a base de melaza con un inóculo inicial de 70mL de Bt a una concentración de  $3.5 \times 10^{10}$  UFC/mL.

En el Cuadro 3.1 se muestran las condiciones en las que se llevo a cabo la fermentación y se eligieron en base a los estudios realizados por Palacios, 1991 y Galán, 1993.

Cuadro 3.1 Condiciones a nivel fermentador de 14 litros para la producción de la delta endotoxina (cristal) de *Bacillus thuringiensis*

| Parámetros  | Valores   |
|-------------|-----------|
| Aireación   | 1 VVM     |
| pH          | 7.0 – 8.0 |
| Temperatura | 30°C      |

VVM: Volumen de aire por volumen de medio por minuto

°C: grados centígrados

Para saber cual es el flujo de aire que se debe suministrar al fermentador de 14 litros se uso la siguiente ecuación (Acevedo *et al*, 2002):

$$vvm = \frac{F_{\text{aire}}}{V}$$

En el Cuadro 3.1 según la bibliografía, el fermentador debe operar a 1vvm por lo cual se empleo un flujo de aire de 14 L/min, por lo que se usó un compresor de 0.08HP con flujo de aire regulable.

#### 2.4.2.1.2 Determinación de la cinética de crecimiento

Se realizó tres repeticiones y durante el transcurso de la fermentación se tomaron 10mL de muestra en condiciones estériles cada 3 horas durante 72 horas para determinar: concentración de biomasa, consumo de glucosa, variación de pH y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

##### a) Determinación de la concentración de Biomasa

La biomasa se evaluó a través del espectofotómetro posterior a la obtención de una curva de calibración (Anexo D), así se relacionó medidas directas de peso seco celular con las medidas indirectas de densidad óptica (Absorbancia a 650nm) (Fajardo y Sarmiento, 2007).

## b) Evaluación del consumo de glucosa

Para determinar el consumo de glucosa se utilizó el método del Ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) que se basa en el uso del ácido 3,5-Dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares, al mismo tiempo su propia reducción.

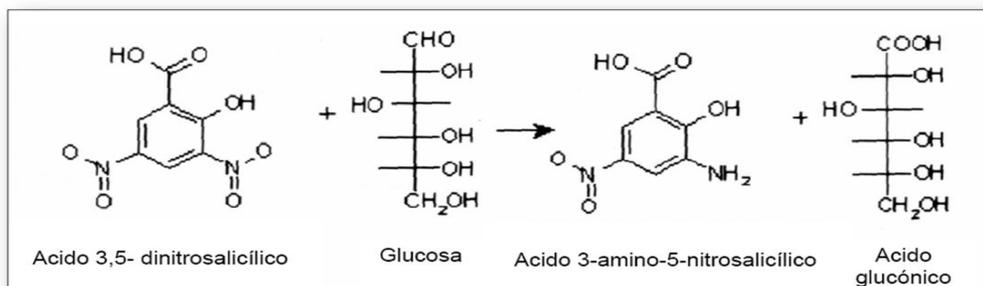


Figura 2.1 Reacción del Ácido 3,5-dinitrosalicílico con Glucosa (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5 dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Esta reacción además puede ser leída en el espectrofotómetro ya que da lugar a una reacción colorimétrica, el ácido 3,5 dinitrosalicílico de color amarillo cambia al ácido 3-amino,5-nitrosalicílico de color pardo oscuro marrón, cuya densidad es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores (Martínez, 2005).

### Procedimiento para determinar el consumo de Glucosa:

Se filtró 5mL de cada muestra con filtros (Whatman con poro 1  $\mu$ m) con técnica al vacío. Se mezcló 1mL de la muestra filtrada con un volumen igual de reactivo 3,5 DNS en tubos de ensayos previamente forrados con papel aluminio. Cada muestra se sometió a ebullición por 5 minutos y se detuvo la reacción enfriando los tubos con hielo. Finalmente se agregaron a cada tubo 9mL de agua destilada y se realizó una lectura de densidad óptica a 546 nm posterior a la obtención de una curva de calibración (Anexo E) (Fajardo y Sarmiento, 2007). El blanco utilizado constó de 1mL de agua destilada con un volumen igual de reactivo 3,5 DNS.

### c) Evaluación de la variación de pH.

Las medidas se realizaron mediante un pH metro marca (HACH), el cual fue calibrado previamente con tampón pH 4 y pH 7.

### d) Determinación del Oxígeno disuelto

Se determinó el oxígeno disuelto vs tiempo con un medidor de oxígeno disuelto marca Accument Excel, XL 40, (Fisher Scientific) previamente calibrado (Anexo F), con el propósito de determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno por el método dinámico propuesto por Taguchi y Humphrey (1966).

### e) Método dinámico

El método dinámico para la determinación del  $K_LA$  y el consumo de oxígeno en un biorreactor fue propuesto por Taguchi y Humphrey (1966). Este método consta de dos etapas: 1) se obtiene el valor del consumo de oxígeno debido al microorganismo, mediante la anulación del aporte de oxígeno al cultivo; 2) se reanuda la aireación, aquí se observa un aumento de la concentración de oxígeno con el tiempo. Es importante que la concentración de oxígeno permanezca siempre por encima de  $C_{crit}$  (5-10% del oxígeno disuelto en el medio de cultivo). En la figura 1.6 se observa el perfil de oxígeno disuelto durante un ensayo, obtenido a partir de una sonda de oxígeno (Taguchi y Humphrey, 1966).

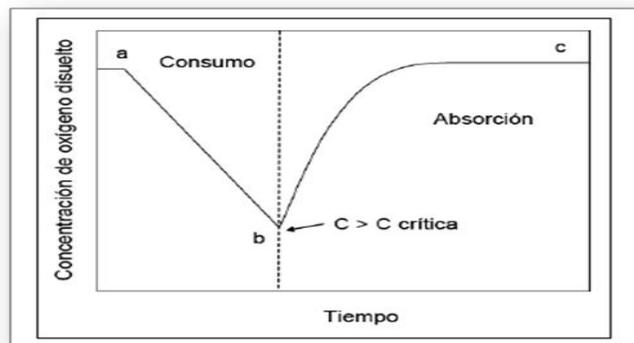


Figura 2.2 Perfil de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor biológico durante la aplicación del método dinámico (Oller, 2008).

En un sistema gas-líquido, el balance de oxígeno durante la transferencia desde una burbuja de aire hacia el medio de cultivo y el consumo por célula, se expresa según la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L A (C^* - C_L) - x q_{O_2}$$

Donde:

$$\frac{dC_L}{dt}$$

Acumulación de oxígeno en la fase líquida

$$K_L A (C^* - C_L)$$

Velocidad de transferencia de oxígeno del gas al líquido

$$q_{O_2}$$

Consumo específico de oxígeno

La formulación clásica del método dinámico para la determinación del  $K_L A$  se basa en un ciclo compuesto de dos etapas: en la primera, la aireación se detiene con lo que la velocidad de transferencia de oxígeno pasa a ser cero ( $K_L A (C^* - C_L) = 0$ )

$$\frac{dC_L}{dt} = 0 - x q_{O_2}$$

$$C_L = (-x q_{O_2}) t$$

La ecuación anterior indica que  $-x q_{O_2}$  puede obtenerse como la pendiente de la gráfica  $C_L$  frente al tiempo.

En la segunda etapa la aireación se reanuda y el oxígeno se absorbe en la fase líquida. La velocidad de transferencia de oxígeno esta dada por:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L A (C^* - C_L)$$

Al integrar la ecuación anterior obtenemos:

$$\ln(C^* - C_L) = -K_L A t$$

De esta manera  $K_L A$  puede ser obtenido de la pendiente de la gráfica de  $\ln(C^* - C_L)$  frente al tiempo

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Fase de Laboratorio

##### 3.1.1 Reactivación de la cepa

En la observación microscópica la cepa de *Bacillus thuringiensis* presentó células de forma bacilar, Gram positivas, cristal en forma Bipiramidal y espora ovalada en posición terminal (Figura 1.1).

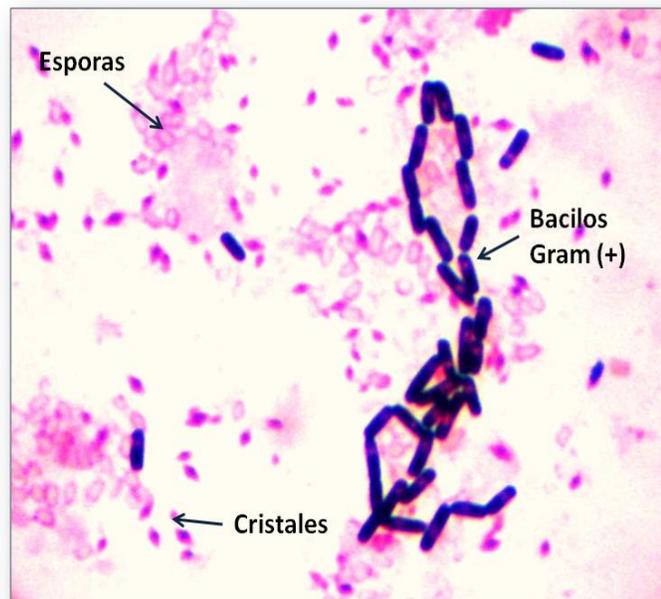


Figura 3.1 Vista microscópica en tinción Gram de *Bacillus thuringiensis*. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche Ecuador Mayo 2010

En su morfología macroscópica se observó colonias de forma irregular, elevación plana con borde lobulado con filamentos, color crema y aspecto harinoso (Figura 1.2).

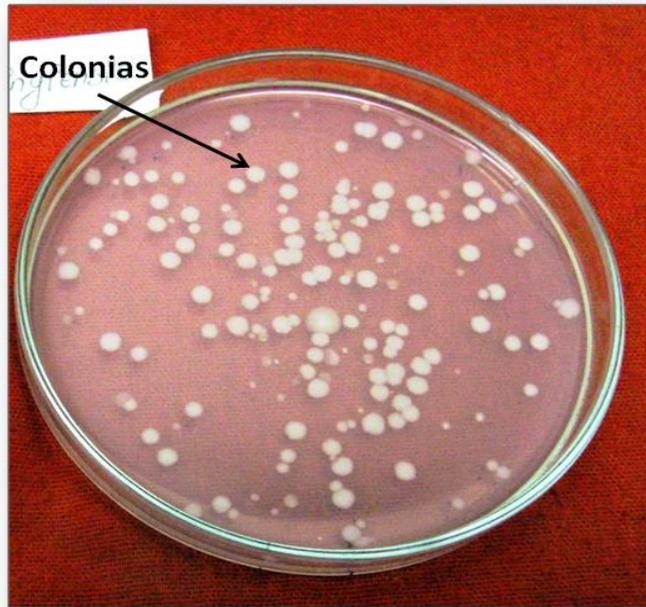


Figura 3.2 Vista macroscópica de las colonias de *Bacillus thuringiensis*. Laboratorio de Diagnóstico & Biopropagación. Hilsea Inv: El Quinche Ecuador Mayo 2010

### 3.1.2 Optimización de la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo.

La concentración del inóculo resultó ser no significativa ( $p > 0,05$ ); es decir que está no influyó en la concentración promedio de cristales de *Bacillus thuringiensis*.

En la Figura 3.3 se observa que la interacción de la concentración del inóculo y los medios de cultivo (M1 = Glucosa; M2 = Sacarosa; M4 = Miel de maíz) no son significativos ( $p > 0,05$ ); es decir esta interacción no influyó en la concentración promedio de cristales de *Bacillus thuringiensis*. Sin embargo el medio de cultivo a base de melaza (M 3) tuvo un ligero incremento en la concentración de cristales en cuanto a la interacción con el inóculo inicial de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

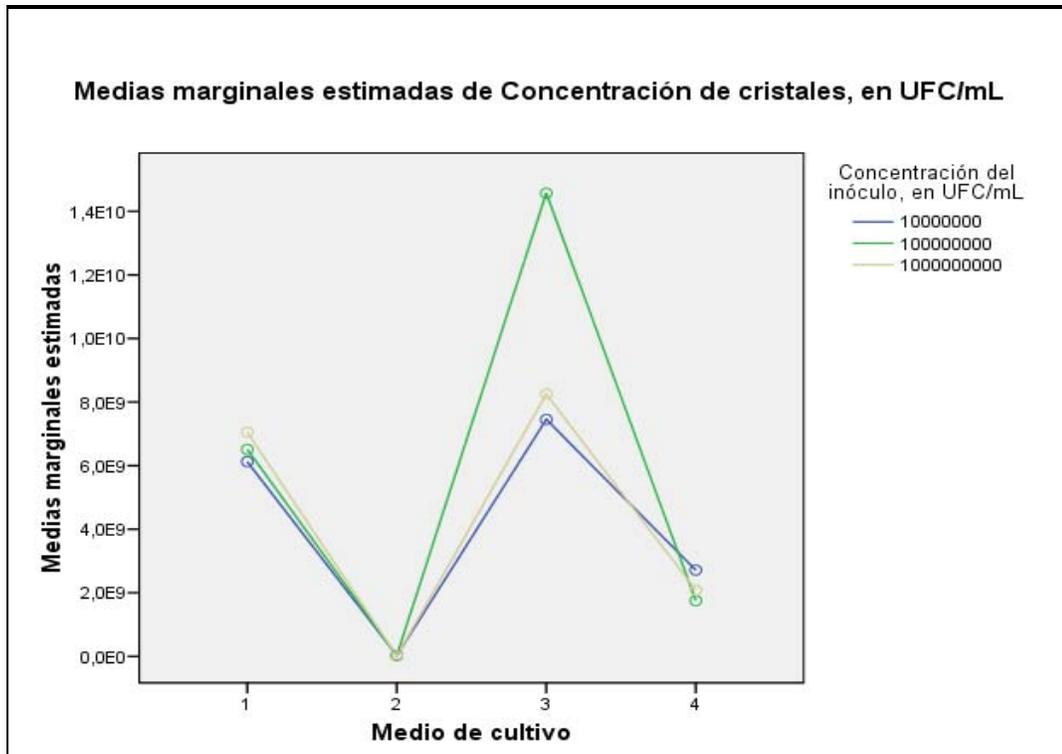


Figura 3.3 Interacción de la concentración del inóculo y medio de cultivo (Medio 1= Glucosa; Medio 2 = Sacarosa; Medio3 = Melaza; Medio 4 = Miel de Maíz) para la producción de de cristales (UFC/ml) a escala de 200 ml. Quito, Pichincha, 2010.

Por otro lado, cuando se analizaron las diferencias de la concentración de cristales producidos en base a las diferencias del medio de cultivo utilizado, estas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) concluyendo que al menos un medio de cultivo influye en la concentración de los cristales de *Bacillus thuringiensis* obtenidos al final del proceso (Anexo G).

Para saber cual de los medios cultivos produce mayor concentración de cristales se comparó los promedios obtenidos de la concentración de cristales con cada medio de cultivo mediante la prueba de Tuckey (Tabla 3.2) observándose que la mejor fuente de carbono es la mezcla con melaza que genera una mayor concentración de cristales y que la fuente que genera menor concentración de cristales es el medio a base de sacarosa.

Tabla 3.2 Prueba de Tukey de los cuatro medios de cultivo para la producción de cristales de *Bacillus thuringiensis*. Quito, Pichincha, 2010.

| Medios de Cultivo | Concentración de cristales (UFC/ml)  |
|-------------------|--------------------------------------|
| Glucosa           | $6,56 \times 10^9$                   |
| <b>Sacarosa</b>   | <b><math>2,12 \times 10^7</math></b> |
| <b>Melaza</b>     | <b><math>9,77 \times 10^9</math></b> |
| Miel de maíz      | $2,18 \times 10^9$                   |

### 3.1.3 Producción de *Bacillus thuringiensis* por fermentación discontinua a escala de 1 litro y 7 litros.

#### 3.1.3.1 Determinación de los parámetros de cultivo

Durante el tiempo de operación de las fermentaciones en lote, se monitoreó la concentración de biomasa vs tiempo Anexo H (Figura 3.4 y Figura 3.5).

El tiempo de fermentación de *Bacillus thuringiensis* es de 72 horas y presenta una fase de latencia de 0 a 6 horas en escala de 1 litro y 0 a 3 horas a escala de 7 litros.

Los datos de la fase exponencial permitieron determinar los parámetros cinéticos a partir de las Figuras (3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11) indicadas en el Anexo H. Con lo cual se obtuvo un resumen comparativo de todos los parámetros cinéticos de *Bacillus thuringiensis* a escala de 1 litro y 7 litros ver Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Parámetros de la cinética de la fase exponencial del crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en medio con melaza a escala de 1 litro y 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010.

| Parámetros         | Descripción                               | Escala 1 litro               | Escala 7 litros              |
|--------------------|---|------------------------------|------------------------------|
| $\mu$              | Velocidad específica de crecimiento       | 0.132 h <sup>-1</sup>        | 0.175 h <sup>-1</sup>        |
| Td                 | Tiempo de duplicación                     | 5.25 h                       | 4 h                          |
| T                  | Tiempo de duración de la fase exponencial | 15 h                         | 15 h                         |
| N                  | Número de generaciones                    | 3                            | 3.75                         |
| $\mu_{\text{máx}}$ | Velocidad crecimiento máximo              | 0.177 h <sup>-1</sup>        | 0.228 h <sup>-1</sup>        |
| $K_s$              | Constante de Saturación                   | 0.63 g/L                     | 0.59 g/L                     |
| Yxs                | Rendimiento celular en base del sustrato  | 0.028 g células / g sustrato | 0.051 g células / g sustrato |

### 3.1.3.2 Determinación del pH del proceso productivo de *Bacillus thuringiensis* a escala de 1 litro y siete litros.

En la Figura 3.12 (Anexo H) se observa que se inicia con un pH de 7,45 y a las 15 horas de fermentación se obtuvo el mayor crecimiento, el medio se acidificó hasta llegar a un pH de 5,04; a partir de las 18 horas de fermentación se empezó a alcalinizar el medio hasta llegar a un pH de 7,74 culminando el proceso de producción.

En la Figura 3.13 (Anexo H) se observa que se inicia con un pH de 7,45 y a las 12 horas de fermentación se obtuvo el mayor crecimiento, el medio se acidificó hasta llegar a un pH de 5,5; a partir de las 15 horas de fermentación se empezó a alcalinizar el medio hasta llegar a un pH de 8.4 con lo que se finalizó el proceso de producción

### 3.1.3.3 Determinación del coeficiente de transferencia de masa volumétrica a escala de 1 litro y 7 litros.

Mediante la relación concentración de oxígeno disuelto y tiempo, se realizó el método dinámico que permitió obtener el valor de  $K_{LA}$  ver Anexo H (Figura 3.14 y Figura 3.15).

La pendiente de la línea AB nos proporcionó la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen de caldo ( $Q_o$ ) como lo indica la Figura 3.16 y Figura 3.17 (Anexo H) y el aumento de la concentración de oxígeno disuelto en el período BC nos permitió obtener el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{LA}$ ) ver Anexo H (Figura 3.18 y Figura 3.19).

A partir de las Figuras anteriormente mencionadas se realizó una tabla comparativa de velocidad de consumo de oxígeno, velocidad específica de consumo de oxígeno y coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, ver Tabla 3.4

Tabla 3.4 Parámetros de Oxígeno de *Bacillus thuringiensis* en medio con melaza a escala de 1 litro y 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010.

| Parámetros | Descripción  | Escala 1 litro  | Escala 7 litros   |
|------------|--|---|---|
| $Q_o$      | Velocidad de consumo de oxígeno                    | 0,054 g de $O_2 L^{-1} h^{-1}$                              | 0,054 g de $O_2 L^{-1} h^{-1}$                              |
| $q_o$      | Velocidad específica de consumo de oxígeno         | 0.022 g de $O_2$ g de células <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> | 0.019 g de $O_2$ g de células <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> |
| $K_{LA}$   | Coficiente volumétrico de transferencia de oxígeno | 54 h <sup>-1</sup>  | 54 h <sup>-1</sup>  |

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más relevantes para la producción de *Bacillus thuringiensis* es la conservación de cepas que es una herramienta esencial en biotecnología industrial, ya que de estas depende el éxito del proceso y del producto final (Paulín, 2008); las cepas se conservaron en agar nutriente, se evitó subcultivos continuos porque se puede perder la virulencia y podrían aparecer poblaciones acristalíferas, como lo señala Fernández y Larrea (2002). La cepa utilizada para obtener los inóculos para la fermentación a escala de laboratorio y planta piloto, debe ser pura, presentar alta cantidad de cristales y esporas tal como se observó en la Figura 3.1.

La composición del medio de cultivo es muy importante para la producción de cristales y esporas de Bt; en base a un medio propuesto por Dulmage (1970); se reemplazo únicamente la glucosa por otras fuentes de carbono: sacarosa, melaza y miel de maíz, que son materias primas de bajo costo; como fuente de nitrógeno: extracto de levadura y harina de soya que contiene alrededor del 40 % de proteína como lo indicó Galán (1993); y sales minerales que son necesarias en el medio de fermentación para la producción del cristal paraesporal. Los resultados demuestran que la melaza resulta ser un sustrato con el cual se genera una mayor producción de cristales paraesporales ( $9.7 \times 10^9$  UFC/ml), según Ponce (1995) Bt tiene una marcada preferencia por las hexosas (melaza), que a más de ser una fuente de carbono también posee aminoácidos y vitaminas; que sirven como fuente de energía para la maduración de la espora y cristal. El medio con sacarosa (azúcar) obtuvo la menor concentración de cristales ( $2.13 \times 10^7$  UFC/ml), debido a que la sacarosa es menos asimilable que las hexosas por ser un disacárido; de esta manera se corroboró con Palacios (1993) quien afirma que la ausencia de una fuente adecuada de carbono para Bt, causa una disminución en la producción de esporas y cristales. En la Figura 3.3 se puede apreciar que el medio con melaza a las concentraciones de inóculo ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ) supera la concentración de cristales del medio con glucosa, sacarosa y miel de maíz.

Al inocular los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de inóculo ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  UFC/ml) se pudo visualizar que no existe diferencia significativa (Tabla 3.1).

Por los resultados obtenidos se escogió el medio compuesto por melaza para el escalamiento del proceso de producción de cristales paraesporales de Bt; los parámetros de producción para este microorganismo fueron tomados de estudios realizados por (Pescorán y Robles, 2004), quienes proponen que la temperatura y pH óptima es de 30 °C y 7.4; la aireación fue de 1vvm para la producción del ingrediente activo (cristales) (Palacios, 1993); por lo tanto a escala de un litro se inyectó un flujo de aire de 2 L/min y a planta piloto se inyectó un flujo de 14 L/min.

Con las condiciones de fermentación propuestas anteriormente y con los datos experimentales obtenidos se graficó la cinética de crecimiento a escala de 1 litro y a escala de 7 litros, ver Anexo H (Figura 3.4 y Figura 3.5); se puede observar que en las dos escalas el tiempo de duración de la fermentación fue de 72 horas tal como lo demostró en sus investigaciones Márquez, Fernández y Almaguel (1999). En la Figura 3.4 se observó que existe una fase de latencia de 0 a 6 horas tiempo en el cual los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio; la fase exponencial o logarítmica de 9 a 24 horas período de mayor actividad de las células ya que estas empiezan a dividirse, por esta razón existe el mayor consumo de sustrato; en la fase estacionaria de 27 a 72 horas se da lugar a la esporulación debido al estrés de la bacteria ante la falta de nutrientes (Soberón M. y Bravo A, 2008). En la curva de crecimiento a escala de 7 litros (Figura 3.5) la fase de latencia fue de 0 a 3 horas; la fase exponencial o logarítmica de 6 a 21 horas y la fase estacionaria de 24 a 72 horas. Con los resultados de este apartado fue posible comparar la cinética de crecimiento celular en las dos escalas, demostrándose una variación mínima, debido a que en las dos escalas se dio las mismas condiciones de crecimiento (temperatura y pH) y extrapolación adecuada del flujo de aire.

La velocidad específica de crecimiento celular (número de células por unidad de tiempo) en la escala de siete litros fue de  $0.175 \text{ h}^{-1}$  presentó un ligero incremento con respecto a la escala de 1 litro  $0.135 \text{ h}^{-1}$ , estudios de Fernández y Núñez (2003) indican que la velocidad específica de crecimiento a más de depender del tipo de sustrato, también depende de las condiciones de crecimiento como: aireación, temperatura; este ligero incremento posiblemente se deba a que en el fermentador de 14 litros las condiciones de crecimiento se encuentran mejor controladas que en el fermentador de 2 litros; resultados similares lo reportó Palacios (1993).

Otro de los parámetros que se determinó a en las dos escalas fue el tiempo de duplicación celular o tiempo requerido para duplicar una población de células y el número de generaciones, mediante la Tabla 3.3 se visualizó que sus valores variaron muy poco, lo cual indica que siguen una cinética de crecimiento semejante; esto es de esperarse ya que se realizó un escalamiento apropiado (Ponce, 1995).

En cuanto velocidad específica máxima de crecimiento y la constante de saturación (Tabla 3.3); se observó que la velocidad específica de crecimiento y el valor de velocidad específica máxima de crecimiento son parecidos, Dorán (1998) explica que estos resultados ocurren en la mayoría de cultivos discontinuos siempre que el sustrato inicial se mayor a la constante de saturación.

El valor obtenido a nivel de planta piloto del rendimiento celular en base del sustrato ( $Y_{XS}$ ) fue de 0.051 gramos de biomasa/ gramos de sustrato (Tabla 3.3), comparando con el valor a escala de 1 litro se observó un ligero incremento, esto se atribuye a que al tener mejor control de las condiciones de proceso puede mejorar el rendimiento. Estos datos coincidieron con los reportados con Ponce (1995).

El pH en el proceso productivo de Bt en las dos escalas, ver Anexo H (Figura 3.12 y 3.13) se acidificó durante las primeras 15 horas y a partir de las 18 horas el medio de fermentación empezó a alcalinizarse. Pescorán y Robles (2004), manifiestan

que la disminución del pH durante la fermentación es debido a que Bt en la fase exponencial produce ácidos como: ácido láctico, acetato y piruvato al catabolizar la glucosa; el incremento del pH se da por que a la mitad de la fase exponencial cuando la mitad de los azúcares son consumidos, los ácidos producidos son catabolizados vía el ciclo tricarboxílico para producir energía y CO<sub>2</sub>.

Pescorán y Robles (2004) reportaron que la temperatura óptima de crecimiento de Bt es 30 °C, por lo que en el proceso productivo esta se mantuvo constante comprobando su valor con un termómetro, para mantener esta temperatura en el fermentador se utilizó un termostato que controlaba la temperatura y lana de vidrio como recubrimiento térmico para evitar la pérdida de calor.

El requerimiento de oxígeno para el crecimiento de Bt fue de 0,054 g de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Tabla 3.4). Este resultado es similar al observado con los estudios de Ponce (1995) que obtuvo 0.044 g de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Sin embargo Palacios (1993), explica que los valores reportados de requerimiento de oxígeno son relativamente bajos considerando que se trata de un proceso de fermentación aerobia. Probablemente esto se deba a que Bt es una bacteria que requiere baja demanda de oxígeno para su desarrollo. La velocidad específica de la utilización de oxígeno fue de 0.022 gramos de Oxígeno por gramos de células por hora; es de esperarse que si la bacteria requiere poco oxígeno para desarrollarse el consumo de este también deba ser bajo; resultados similares obtuvo Torres y Quintero (2008).

Para lograr una producción similar de cristales de Bt a nivel de laboratorio y planta piloto se realizó un escalamiento manteniendo constante la velocidad volumétrica de transferencia de oxígeno (K<sub>L</sub>A), tal como se lo demuestra en la Tabla 3.4; según lo manifestado por Oller (2008), este criterio de cambio de escala es necesario debido a que la transferencia de oxígeno en un bioreactor es frecuentemente un factor limitante del crecimiento dada la baja solubilidad de oxígeno en el medio de fermentación, la correcta determinación del K<sub>L</sub>A es un paso crucial para prevenir posibles problemas de

limitación del crecimiento. El valor de  $K_LA$  evaluado en este estudio fue muy parecido al reportado por Ponce (1995).

Por lo explicado en este apartado resulta ser que *Bacillus thuringiensis* es un microorganismo dependiente de las condiciones de operación (temperatura, pH, aireación) y de la formulación del medio de cultivo para elaborar un producto con cierto nivel de toxicidad.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- Se aisló y purificó la cepa de *B. thuringiensis* comprobando microscópicamente su morfología (bacilos Gram (+)) capaces de formar cristales paraesporales durante su proceso de esporulación.
- El medio de cultivo que proporcionó la mayor cantidad de cristales de *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio es el medio a base de melaza ( $9.7 \times 10^9$  UFC/ml)
- El medio de cultivo que aportó la menor cantidad de cristales de *B. thuringiensis* a nivel de laboratorio es el medio a base de sacarosa ( $2.13 \times 10^7$  UFC/ml)
- Se comprobó que las concentraciones de inóculo no intervienen en la concentración de cristales.
- La interacción concentración de inóculo y medios de cultivo no influyó en la concentración de cristales.
- El valor de  $K_LA$  se mantuvo constante en la escala de laboratorio (1 litro) y escala piloto (7 litros).
- El comportamiento de la bacteria en cuanto a las cinéticas de crecimiento a escala de 1 litro y 7 litros fueron muy similares y se ajustaron a lo descrito en la literatura.

- La velocidad específica de crecimiento y la velocidad máxima de crecimiento en las dos escalas fueron semejantes en los dos niveles de escalamiento.
- La afinidad del microorganismo por el sustrato en este caso la melaza fue de 0,63 g/L a 1 litro de producción y 0.59 g/L a 7 litros de producción.
- El rendimiento celular en base del sustrato ( $Y_{XS}$ ) fue de 0.051 g de biomasa/g de sustrato a escala de 7 litros, comparando con el valor a escala de 1 litro se observó un ligero incremento.
- El pH durante las primeras horas de fermentación se acidificó y luego empezó a alcalinizarse hasta culminar la fermentación, esto es un buen indicativo para comprobar que *B. thuringiensis* se desarrolla de una manera apropiada.
- *B. thuringiensis* mostró una demanda de oxígeno de 0,054 g de  $O_2 L^{-1} h^{-1}$  y una velocidad específica de consumo de oxígeno de 0,022 gramos de  $O_2$  por gramos de células por hora, las cuales son bajas y atractivas, desde el punto de vista industrial.
- La concentración final de cristales paraesporales obtenida fue de  $5.789 \times 10^{11}$  UFC/ml (2,43 g/L), a escala de 1 litro después de 72 horas de fermentación a 30 °C.
- La concentración final de cristales paraesporales obtenida fue de  $7,1 \times 10^{11}$  UFC/ml (3,01 g/L), en un bioreactor de 14 litros después de 72 horas de fermentación a 30 °C.

## CAPITULO VI

### RECOMENDACIONES

- Es conveniente que el medio de cultivo para la producción de *B. thuringiensis* sea de bajo costo sobre todo cuando se va a realizar una producción a nivel industrial.
- Debido a que la concentración del inóculo no interfiere en la concentración cristales y esporas de *B. thuringiensis*, es recomendable usar la concentración más baja para el proceso de producción.
- La aireación suministrada al Bioreactor debe ser estéril para lo cual se recomienda que pase por una unidad de mantenimiento para retener el agua del aire y luego por un filtro de tal manera que retenga las impurezas que esta puede tener.
- Para usar un buen material para el escalamiento se debe tomar en cuenta que este no perjudique el crecimiento de los microorganismos.
- Hasta la fecha es muy poco lo que se ha publicado sobre el tratamiento del fermento de *Bacillus thuringiensis*, por lo que es necesario ahondar en la investigación con relación al traspaso del caldo de fermento después de finalizar el proceso productivo.
- Sin embargo los datos obtenidos en esta investigación serían útiles para el diseño de un Bioreactor o para la operación del mismo en el caso de que ya se disponga de uno.

## CAPITULO VII

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca *et al.* (1992). Optimización del proceso de Fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawai. Extraído el 20 de Agosto, 2009 del sitio web: [pbr322.ibt.unam.mx/~alfredo/OptimizacionBthuringiensis.pdf](http://pbr322.ibt.unam.mx/~alfredo/OptimizacionBthuringiensis.pdf)

Amicarelli *et al.* (2006). Estrategias de Control de Oxígeno Disuelto Aplicadas a la Fermentación Batch de Bt. Argentina. Extraído el 14 de Agosto, 2009 del sitio web:

[www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UV/AVAILABLE/.../SOL-QUIMIO.PDF](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UV/AVAILABLE/.../SOL-QUIMIO.PDF)

Andrade, G., Bermeo, M. (2006). Tesis: Determinación de los Parámetros de Proceso, necesarios para el Diseño de un Fermentador Continuo, para obtener Levaduras de Panificación. [Revisión Tesis]. Guayaquil. pp 11. Extraído el 02 de Diciembre, 2009 del sitio web: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020091320.pdf>

Armas, G (2006). Tesis: Determinación de los parámetros de proceso, necesarios para el Diseño de un Fermentador Continuo, para obtener levaduras de Panificación. [Revisión Tesis]. Extraído el 10 de Junio, 2010 del sitio web:

Avignone, C., Arcas, J. (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and endotoxin production in oxygen limited and non limited cultures. World Journal Microbiology Biotechnology. Extraído el 2 de Septiembre, 2009 del sitio web: [www.springerlink.com/index/N872Q2967P1VU943.pdf\\_-](http://www.springerlink.com/index/N872Q2967P1VU943.pdf_-)

Baker, F., Breach, M. (1990). Manual de Técnicas de Microbiología Médica. (pp .18). Madrid: Garsi D.L.

Boyd, R., Hoerl, B. (1998). Microbiología Médica. (pp. 29).Argentina: Brown

Capote, T., Torres, D. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global. Colombia. Extraído el 20 de Enero, 2010 del sito web: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1196547>

Carrera, M. (2009). Tesis: Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. [Revisión Tesis]. Extraído el 10 de Junio, 2010 del sitio web: [dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf](https://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf) TESIS ESPOCH

Coiné, M. (2000). Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio (pp. 336-337). Madrid- España. Editorial Paraninfo

Dorán, P. (1998). Principios de Ingeniería de los Bioprocesados. (pp. 38-39) Zaragoza-España, Editorial Acribia.

Doreste, E. (2000). Acarología (pp.383-384). San José-Costa Rica, Editorial IICA

Echeverría, M. (2007). Tesis: Producción de Biofertilizante a partir de cepas autoctona de *Azotobacter* spp. Mediante fermentación discontinua en caldo pikovskaya modificado y caldo alternativo escala 10L. [Revisión Tesis]. Quito.pp (40, 41, 59,64)

Escobar H., *et al.* (2004). Análisis exploratorio para la optimización de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus thuringiensis*. Colombia. Extraído el 19 de Agosto, 2009 del sitio web:

[www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/rt/.../0](http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/rt/.../0)

Fajardo, E., Sarmiento, S. (2007). Tesis: Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. [Revisión Tesis]. Quito. pp 17. \_\_Extraído el 19 de Mayo, 2010 del sitio web: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020091320.pdf>

Fernández, O., Larrea, V. (2002). Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Costa Rica. Extraído el 14 de Septiembre, 2009 del sitio web: [web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev64/fitosanitarios.pdf](http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev64/fitosanitarios.pdf)

Fernández, E., Fernández, O., Nuñez, R. (2003). Influencia de los nutrientes sobre la velocidad de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* LBT-25. La Habana. Extraído el 23 de Noviembre, 2009 del sitio web: [http://www.fao.cu/docrep/fitosanidad/2004/7\(2\)03.pdf#page=39](http://www.fao.cu/docrep/fitosanidad/2004/7(2)03.pdf#page=39)

Fox, R., McDonald, A. (1989). Introducción a la Mecánica de Fluidos. (pp 305,306). Segunda Edición, Editorial. McGRAW-HILL.

Gallegos, G. (2003). Tesis: Producción y toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivo para control de insectos plaga

lepidópteros. [Revisión tesis]. Monterrey. pp.89. Extraída el 20 de Diciembre, 2009 del sitio web:

[cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080074524.pdf](http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080074524.pdf) –

Gallegos, P. (2003). Manual técnico fitosanitario en floricultura. (pp. 56-58). Quito-Ecuador. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas.

Gomero, L., Tazza, M. (2002). Innovación de Tecnologías Ecológicas para el Agro en América Latina (pp.65-131). Lima-Perú, Editorial Sttefany S.R.Lda.

González, A., Restrepo, A. (2000). Escalamiento para la producción a partir de la producción de *B. thuringiensis* subsp. Israelensis en biorreactores de 20 y 200 litros. Colombia. Extraído el 21 de Enero, 2010 del sitio web:

<http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/viewArticle/823>

Gutiérrez, H., De la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de Experimentos (pp.50-52). México, DF: Mc Gra.w-Hill. Interamericana.

Gutiérrez, G. (2003). Tesis: Selección y evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Heliothis zea* (Boddie) y *Spodoptera exigua* (Hübner).

[Revisión Tesis]. Quito. pp 17. Extraído el 02 de Diciembre, 2009 del sitio web:

<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020091320.pdf>

Lara, I. (2008). Cultivo de *Bacillus thuringiensis* y su uso como bioinsecticida.

México. Extraído el 20 de Enero, 2010 del sitio web:

<http://www.scribd.com/doc/8961317/Cultivo-de-Bacillus-thuringiensis-y-su->

[uso-como-bioinsecticida](http://www.scribd.com/doc/8961317/Cultivo-de-Bacillus-thuringiensis-y-su-)

Levenspiel, O. (2004). Ingeniería de las Reacciones Químicas.(633) Universiad

del Estado de Oregon, Tercera Edición, Editorial Limusa Wiley.

Llagostera, M. (2007). Estudio de la ecología de *Bacillus thuringiensis* en la

hoja. Barcelona. Extraído 07 de Julio, 2010 del sitio web:

Márquez, E., Fernández, O., Almaguel, L. (1999). Producción y Evaluación de

Cultivos de *Bacillus thuringiensis* (Berl) con efecto Acaricida sobre

*Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acarina:Tarsonemidae) (pp. 53). Instituto

de Investigación de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana. Vol 3.

Martínez, M. (2005). Búsqueda y producción de microorganismos benéficos

para la agricultura. México. Extraído el 6 de Diciembre, 2009 del sitio web:

<http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P668.65CDL791/anexos.pdf>

Mercado, M. *Et al* (2007). Frutos de la investigación Corpoica Cinco Años.

(pp.93-94). Santa Fe de Bogotá –Colombia. Editorial Estudio 3 Gráficas LTDA.

Oller, I. (2008). Tesis: Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de Fotocatálisis Solar y Oxidación Biológica. [Revisión de tesis]. Extraída el 01 de Octubre, 2009 del sitio web:

Palacios, L. (2001). Tesis: Aspectos de la Fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawaiaa* nivel de planta piloto. [Revisión de tesis]. Extraída el 01 de Octubre, 2009 del sitio web:

Paulín, R (2008). Tesis: Producción de biomasa de *Salmonella thypi* para la obtención de porinas. [Revisión Tesis]. Extraído el 10 de Junio, 2010 del sitio web:

Pescorán, V., Robles, H. (2004). Efecto del pH y la temperatura sobre la producción de bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis* en un medio de producción suplementado con “Saguanza”. Perú. Extraído el 2 de Julio de ,2010 del sitio web <http://www.linros-interinsumos.com/Tempo/revista2/articulo02.htm>

Ponce, E. (2005). Tesis: Recuperación de cepas HD de *Bacillus thuringiensis*, su propagación en 14 medios de producción y la evaluación de la actividad tóxica contra *Trichoplusia ni* (Hüber) y *Heliothis virescens* (Fabricius) [Revisión de tesis]. Extraída el 01 de Octubre, 2009 del sitio web: [cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080072493.pdf](http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080072493.pdf)

Sauka, D., Benintende, G. (2008). Bacillus thuringiensis: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Argentina. Extraído el 1 de Septiembre, 2009 del sitio web:

[www.infodoctor.org:8080/uid=18705497](http://www.infodoctor.org:8080/uid=18705497)

Scragg, A. (2000). Biología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos. (pp. 78-79). Editorial-Limusa.

Soberón, M., Bravo, A. (2008). Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas.

Departamento de Microbiología Molecular/ Instituto de Biotecnología/

Universidad Nacional Autónoma de México. (pp.11). Extraído el 20 de

Septiembre, 2009 del sitio web:

[www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO.../Capitulo16.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO.../Capitulo16.pdf)

Velez, J., Aguirre, J. (2000). Contribución a la optimización de biorreactores semidiscontinuos. Aplicación a la producción de Bacillus thuringiensis.

Colombia. Extraído el 20 de Agosto, 2009 del sitio web:

[www.minas.unalmed.edu.co/index2.php?option=com\\_docman](http://www.minas.unalmed.edu.co/index2.php?option=com_docman).

## Anexo A

### Preparación de las concentraciones del inóculo.

A partir de la solución madre cuya concentración fue  $4,3 \times 10^9$  UFC/ml se usó la siguiente fórmula para establecer las concentraciones del inóculo:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{(1 \times 10^7 \text{ UFC/ml})(25 \text{ ml})}{4,3 \times 10^9 \text{ UFC/ml}}$$

$$V_1 = 0,00581 \text{ ml}$$

De la solución madre se extrajo 0,00581 ml y se vació en un tubo con agua destilada estéril que contenía 2,4942 ml, para de esta manera tener una solución.  $1 \times 10^7$  UFC/ml

Las concentraciones de inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC/ml,  $1 \times 10^9$  UFC/ml se procedieron a obtener de la forma anteriormente expuesta.

## **Anexo B**

### **Tinción Gram**

1. Preparar una extensión de bacteria y fijar suavemente al calor
2. Aplicar unas gotas de violeta de genciana y bicarbonato de calcio por 25 segundos.
3. Dejar caer la solución anterior para colocar lugol por 25 segundos.
4. Lavar con agua destilada y decolorar con alcohol cetona dejar por 25 segundos.
5. Lavar con agua destilada y aplicar una solución contraste en este caso la Safranina durante 25 segundos.
6. Aclarar con agua destilada y secar cuidadosamente con papel y luego suavemente con calor. (Baker y Breach, 1990)

### **Tinción de esporas (Wirtz-Conklin)**

1. Preparar los frotis bacterianos indicados.
2. Teñir con verde malaquita. Con unas pinzas de madera colocar la muestra encima de la llama del mechero de forma que el colorante humee durante 5 minutos.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Teñir con safranina 1 minutos
5. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
6. Secar la preparación.
7. Observar la preparación al microscopio.

## Anexo C

### Conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser.

En este método la suspensión de la muestra se coloca en la cavidad cuadrículada de dimensiones conocidas de la cámara, y se tapa con el cubre objetos:

Para obtener el número de bacterias por mililitro de suspensión, todo lo que se requiere es contar el número de microorganismos en las cuadrículas. Como mínimo se cuenta 10 campos es decir 10 cuadrículas; las cuales deben estar en un rango de 8 a 80 células por cuadro.

Fórmula:

$$\# \text{ Células /ml} = (\text{Dilución}) \times (\text{células por cuadro}) \times (\text{factor del cuadro})$$

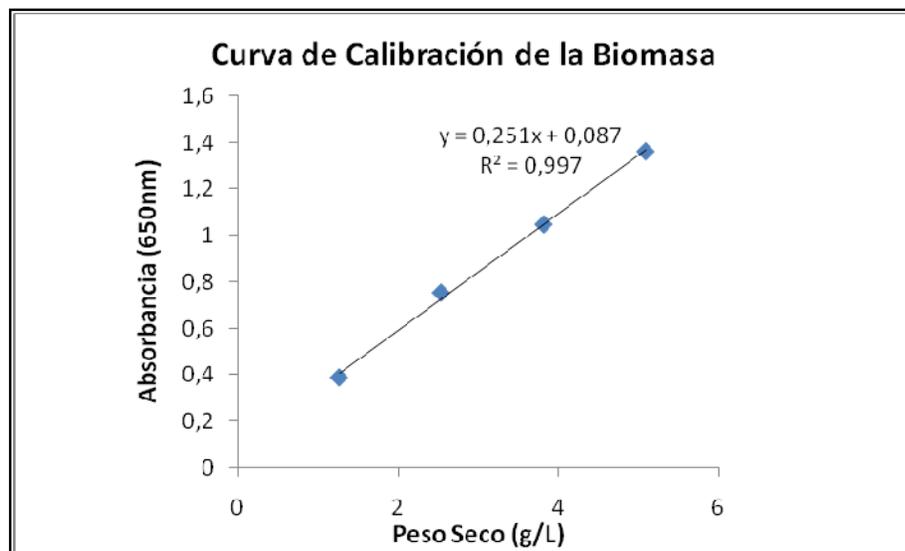
## Anexo D

### Curva de calibración para medir la Biomasa

La cepa se cultivo en un matraz en el medio tres durante 72 horas, luego se tomo 1ml de extracto y se diluyo en 9ml de agua destilada estéril, se hicieron 9 diluciones y el recuento se llevo a cabo por la técnica de difusión en placa incubándose a 28 °C por 24 horas. De esta manera se pudo hacer una relación de las UFC/ml con el peso seco celular

Se hizo una relación de las UFC/ml con el Peso Seco (g/L) y se obtuvo el siguiente cuadro.

| Peso Seco (g/L) | Absorbancia (650nm) |
|-----------------|---------------------|
| 1,27            | 0,390               |
| 2,54            | 0,754               |
| 3,82            | 1,048               |
| 5,09            | 1.361               |



## Anexo E

### Curva de calibración para la cuantificación de glucosa

#### Preparación del reactivo

| Reactivos                   | Cantidad |
|-----------------------------|----------|
| Ácido 3,4 Dinitrosalicílico | 1 g      |
| Tartrato de sodio y potasio | 43,8 g   |
| Hidróxido de sodio          | 1,6 g    |
| Agua destilada              | 100 ml   |

En un matraz de 250 ml con 10ml de agua destilada disolver el Hidróxido de sodio, luego adicionar lentamente el tartrato de sodio y potasio hasta que se disuelva por completo. Recubrir el matraz con papel aluminio y agregar lentamente el DNS. Completar con agua destilada hasta 100 ml (Echeverría, 2007).

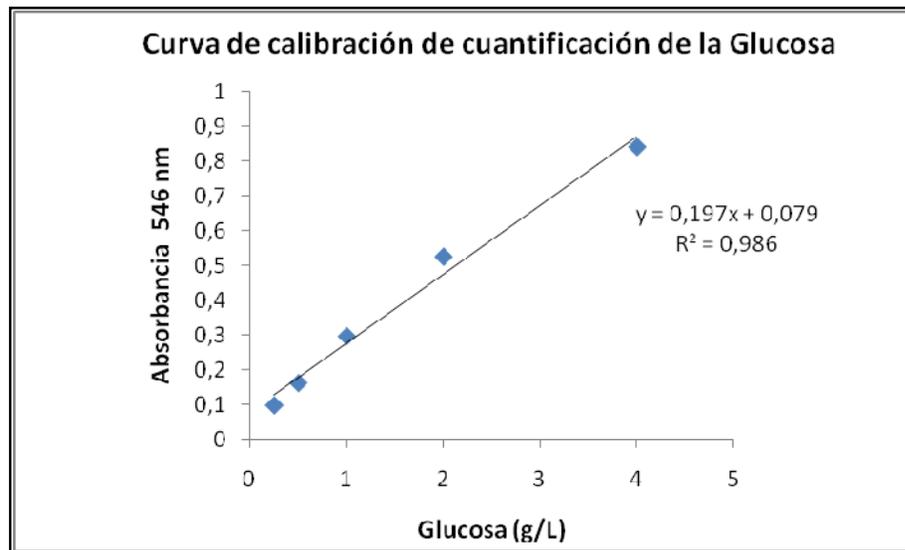
#### Preparación de la solución stock de Glucosa

Pesar 4 g de D-Glucosa y disolver en 500ml utilizando un balón volumétrico de 1000ml. Homogenizar y aforar hasta 1000ml. De esta manera se obtiene una solución madre de 4g/L (0,4%). A partir de esta solución se obtiene concentraciones conocidas (0,25; 0,5; 1; 2; 4 g/L)

#### Elaboración de la curva de calibración

Verter 1ml de cada solución de glucosa en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio y colocar 1ml de DNS. Llevar a ebullición por 5 minutos y posteriormente frenar la reacción con hielo. Agregar 9ml de agua destilada y leer a absorbancia de 546 nm. Se usará como blanco 10ml de agua destilada.

| Glucosa (g/L) | Absorbancia (546nm) |
|---------------|---------------------|
| 0,25          | 0,099               |
| 0,5           | 0,163               |
| 1             | 0,298               |
| 2             | 0,527               |
| 4             | 0,843               |



## Anexo F

### Calibración del electrodo poligráfico del medidor de oxígeno

Se tomo un punto automático de estandarización en unidades de mg/L, el Oxígeno disuelto a nivel de saturación es (8,26 mg/L a 25 °C y 760 mm Hg). Para su calibración se insertó la sonda de Oxígeno Disuelto (OD) en una botella de DBO la cual contenía una pulgada de agua provista de 100% de Humedad relativa. Se dejó por 30 minutos. Luego se procedió a realizar las respectivas lecturas.



## Anexo G

ANOVA de la interacción concentración del inóculo y medios de cultivo sobre la concentración de los cristales de *Bacillus thuringiensis* a escala de 200ml. Quito, Pichincha, 2010.

| FV                                       | SC                    | GL | CM                    | F     | Valor-p |
|--|-----------------------|----|-----------------------|-------|---------|
| Concentración inóculo                    | $2,95 \times 10^{19}$ | 2  | $1,48 \times 10^{19}$ | 1,479 | 0,238   |
| Medio Cultivo                            | $8,77 \times 10^{20}$ | 3  | $2,92 \times 10^{20}$ | 29,3  | 0       |
| Concentración inóculo<br>× Medio Cultivo | $1,12 \times 10^{20}$ | 6  | $1,87 \times 10^{19}$ | 1,876 | 0,105   |
| Error                                    | $4,69 \times 10^{20}$ | 47 | $9,98 \times 10^{18}$ |       |         |
| Total                                    | $1,49 \times 10^{21}$ | 59 |                       |       |         |

## Anexo H

### Cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis*

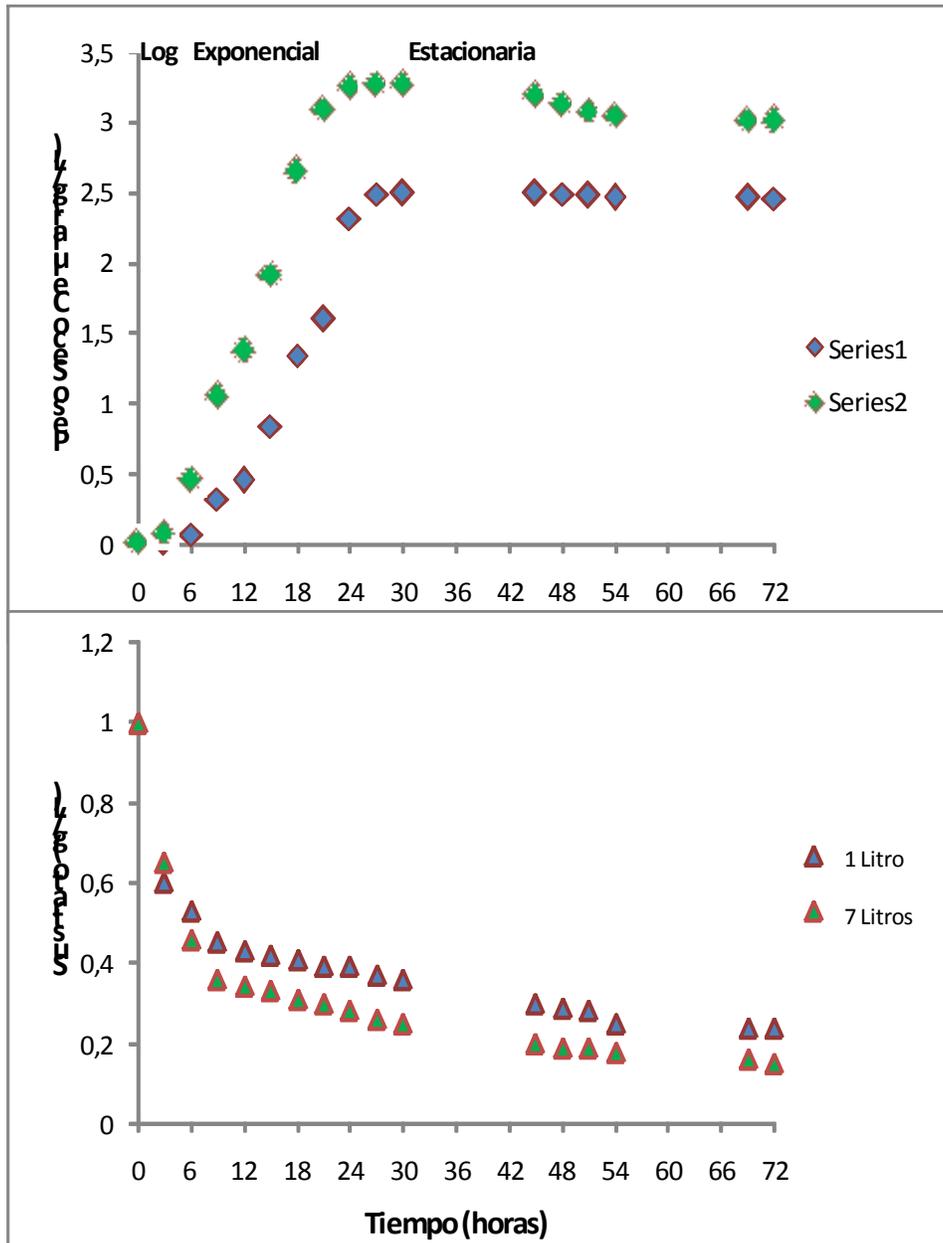


Figura 3.4 Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y consumo de sustrato en el medio de cultivo a base de melaza (M3) a escala de 1 litro y 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

### Regresión Lineal en la Fase Exponencial

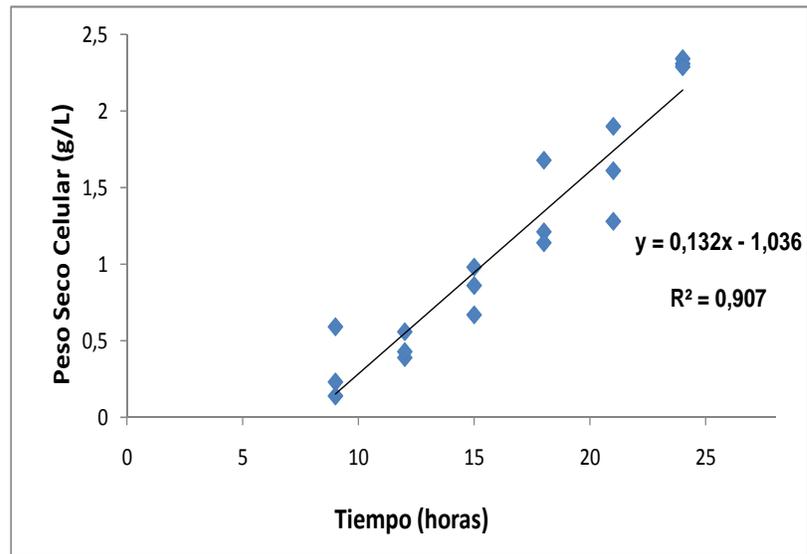


Figura 3.5 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de *Bacillus thuringiensis* a escala 1 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

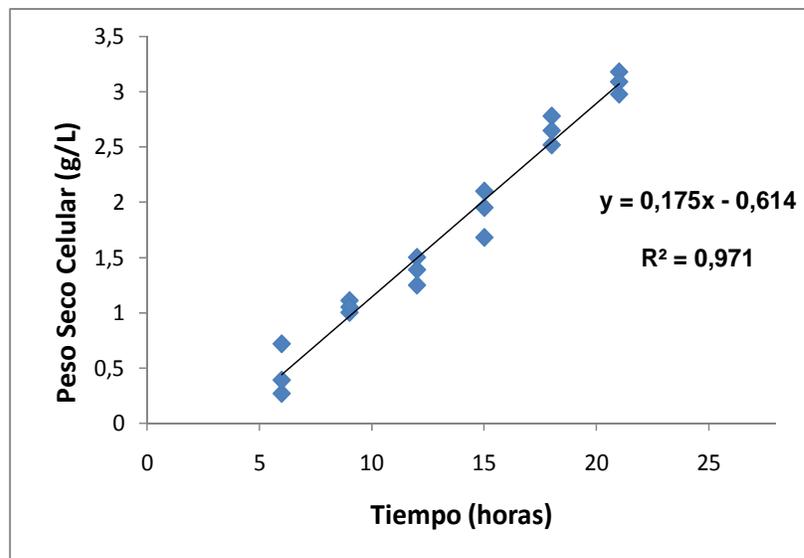


Figura 3.6 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de *Bacillus thuringiensis* a escala 1 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

### Transformación lineal de Lineweaver-Burk

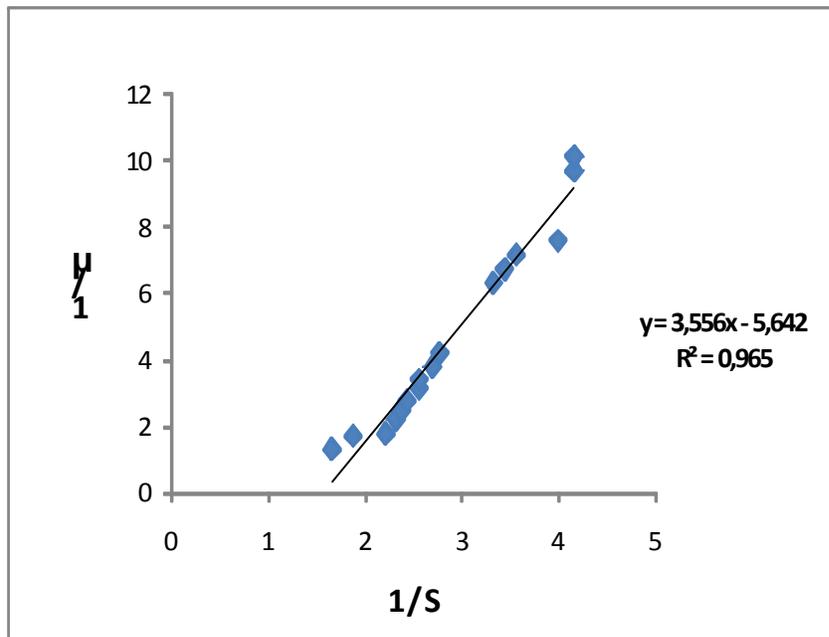


Figura 3.7 Transformación lineal de Lineweaver-Burk a escala de 1 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

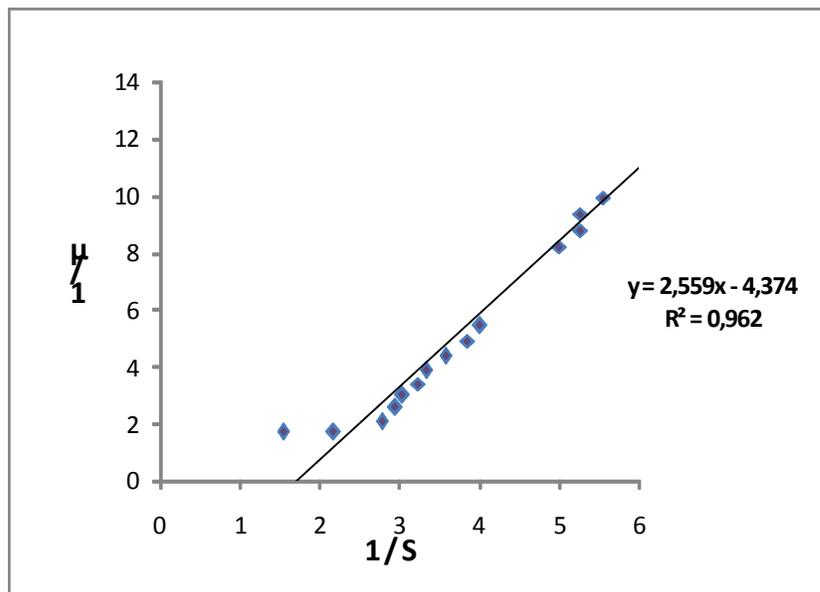


Figura 3.8 Transformación lineal de Lineweaver-Burk a escala de 7 L. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

### Rendimiento celular en base del sustrato

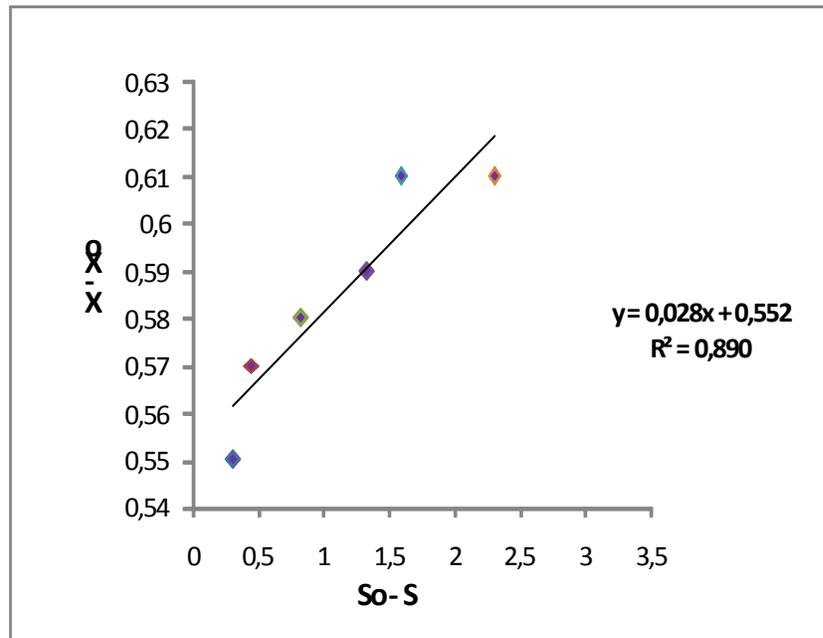


Figura 3.9 Rendimiento celular en base del sustrato a escala de 1 litro. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

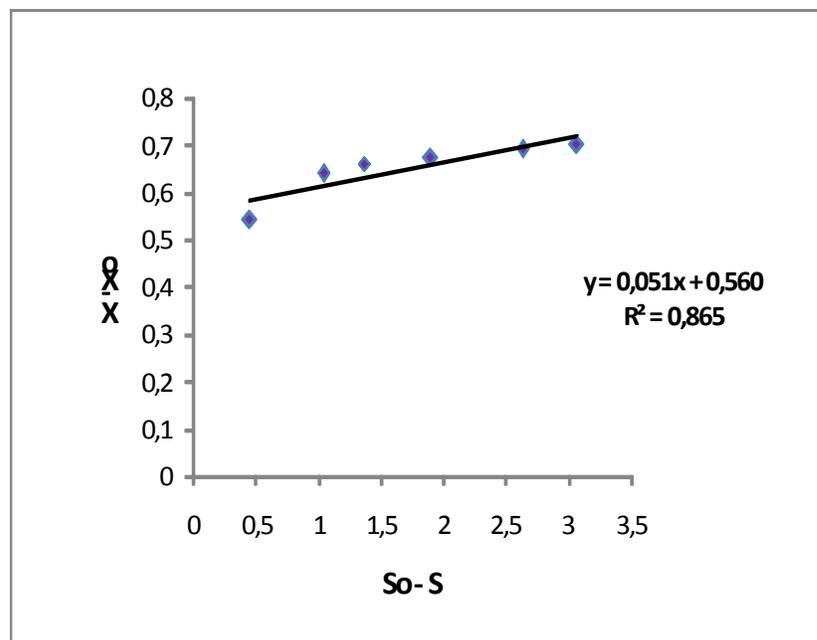


Figura 3.10 Rendimiento celular en base del sustrato a escala de 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

### Determinación del pH

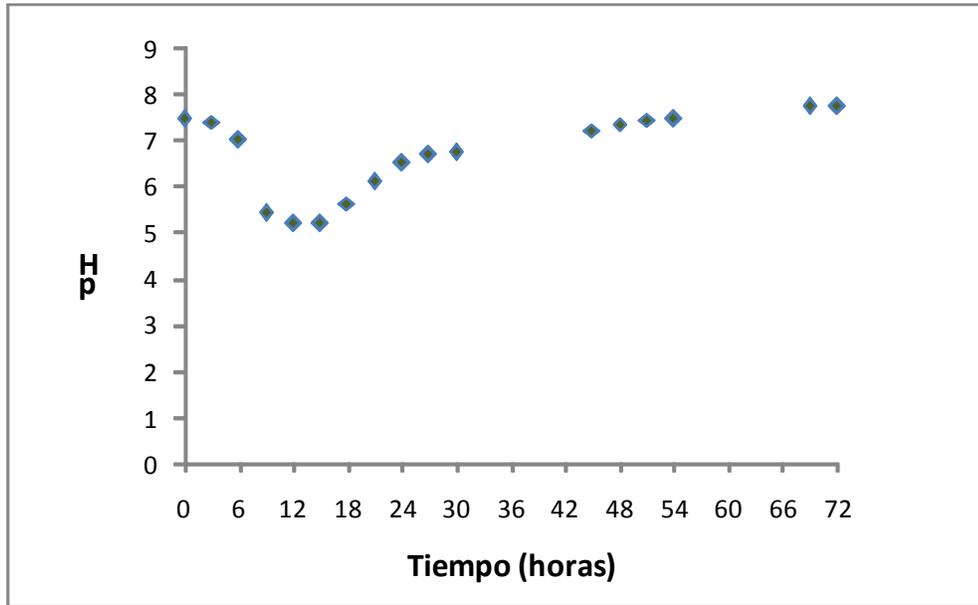


Figura 3.11 Determinación del pH de la producción de *Bacillus thuringiensis* a escala de 1 litro. Quito, Pichincha, Ecuador 2011

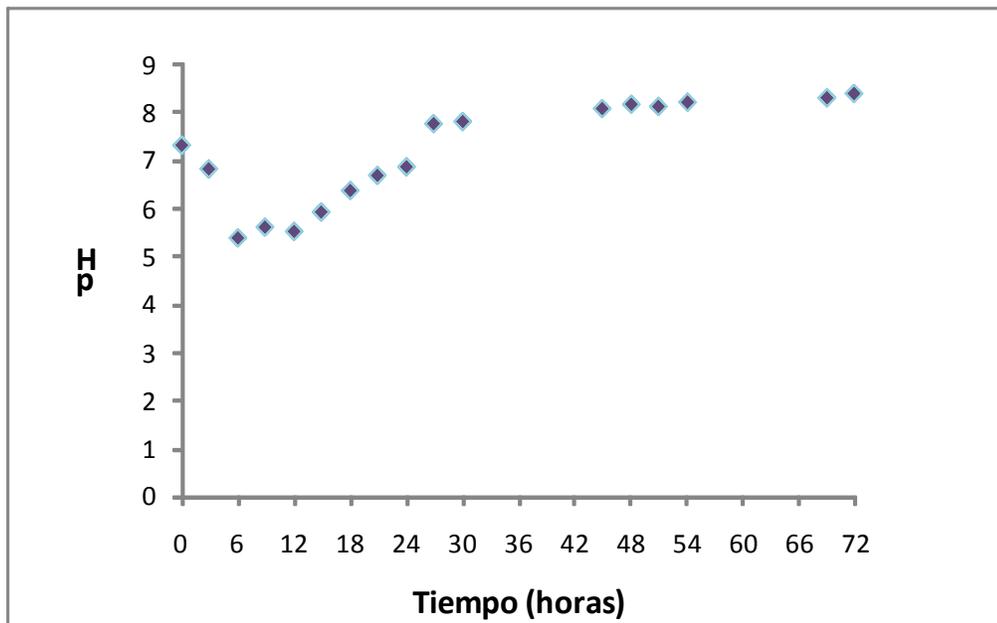


Figura 3.12 Determinación del pH de la producción de *Bacillus thuringiensis* a escala de 7 litros. Quito, Pichincha, Ecuador 2010

## Método Dinámico

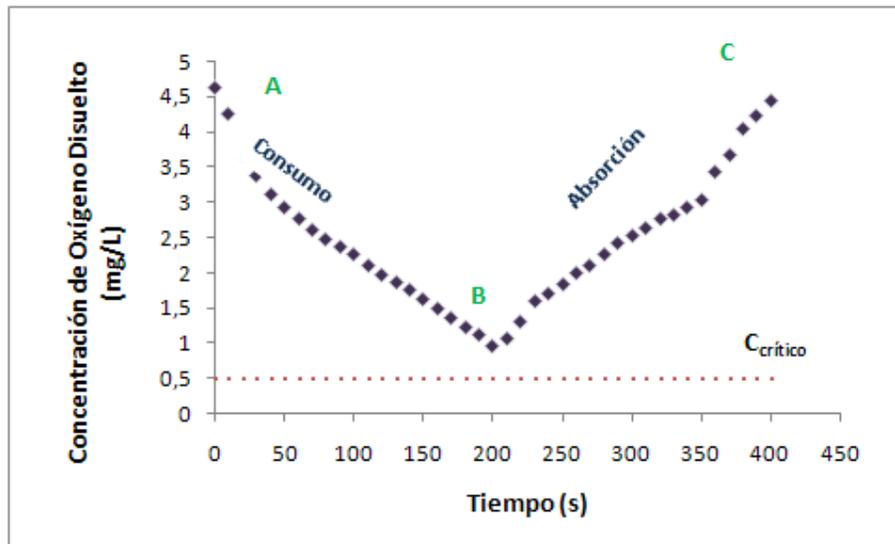


Figura 3.13 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico escala 1 litro. Quito, Pichincha, 2010.

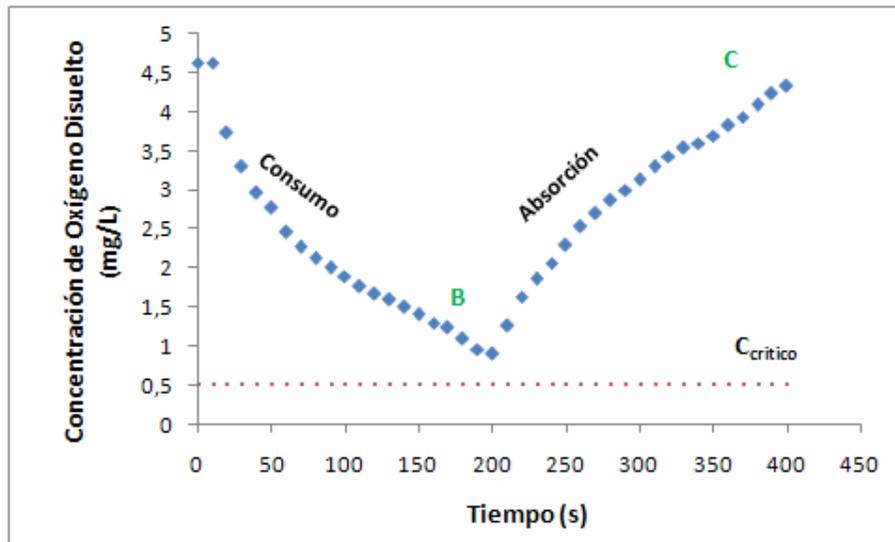


Figura 3.14 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico escala 7 litros. Quito, Pichincha, 2010.

### Velocidad de Consumo de Oxígeno

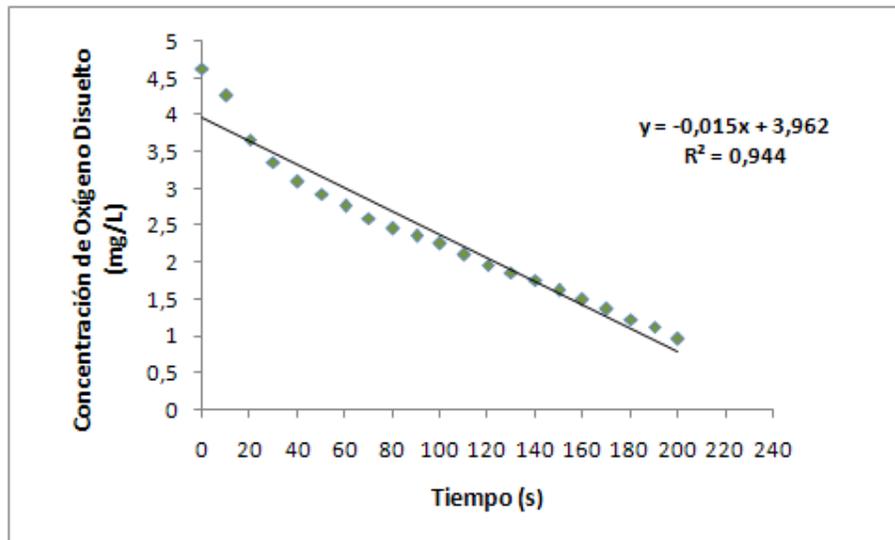


Figura 3.15 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo del punto AB a escala 1 litro. Quito, Pichincha, 2010.

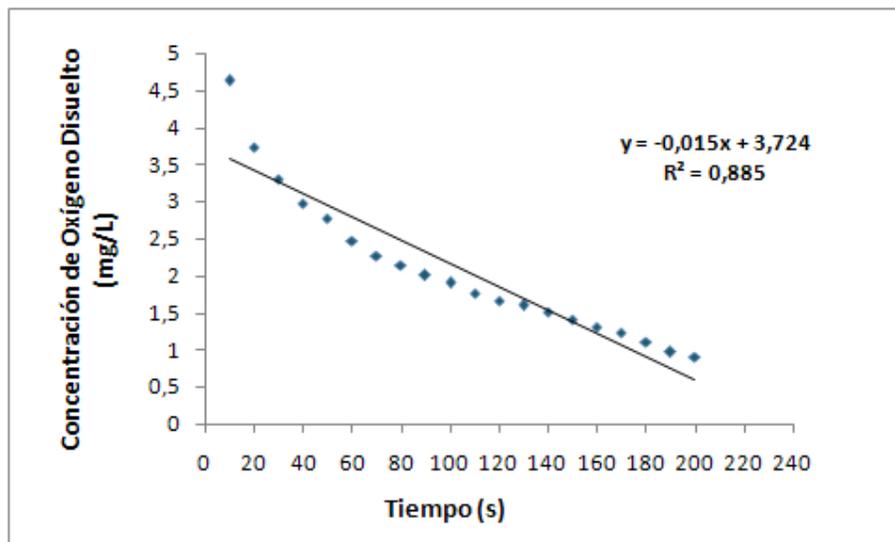


Figura 3.16 Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo del punto AB a escala 7 litros. Quito, Pichincha, 2010

### Coefficiente Volumétrico de Transferencia de Oxígeno

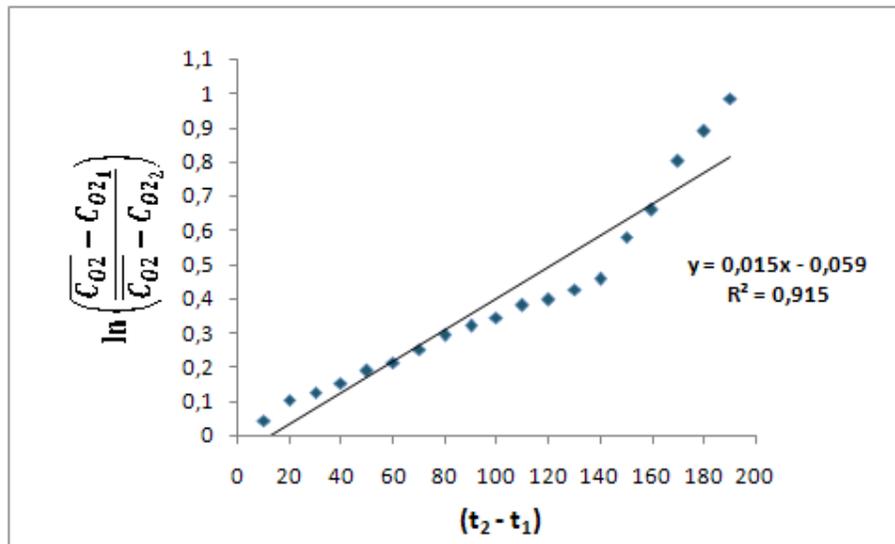


Figura 3.17 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a escala 1 litros.  
Quito, Pichincha, 2010

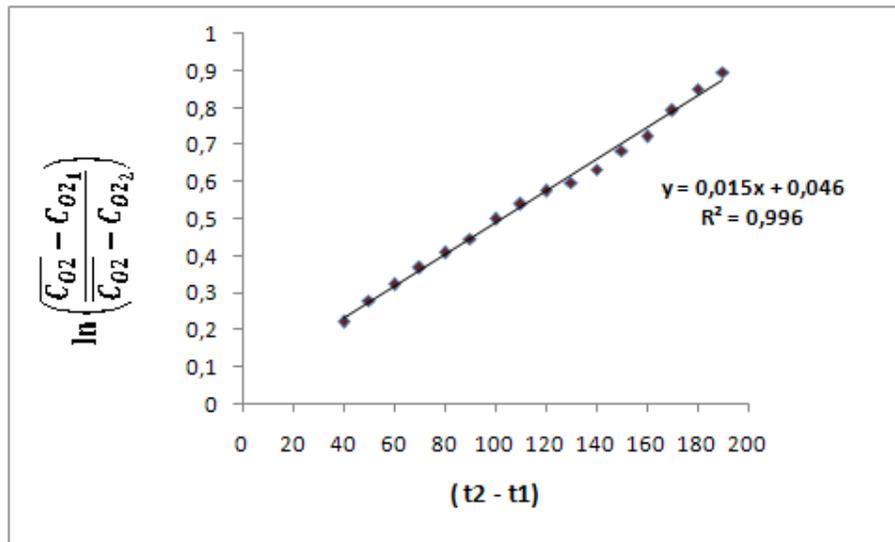
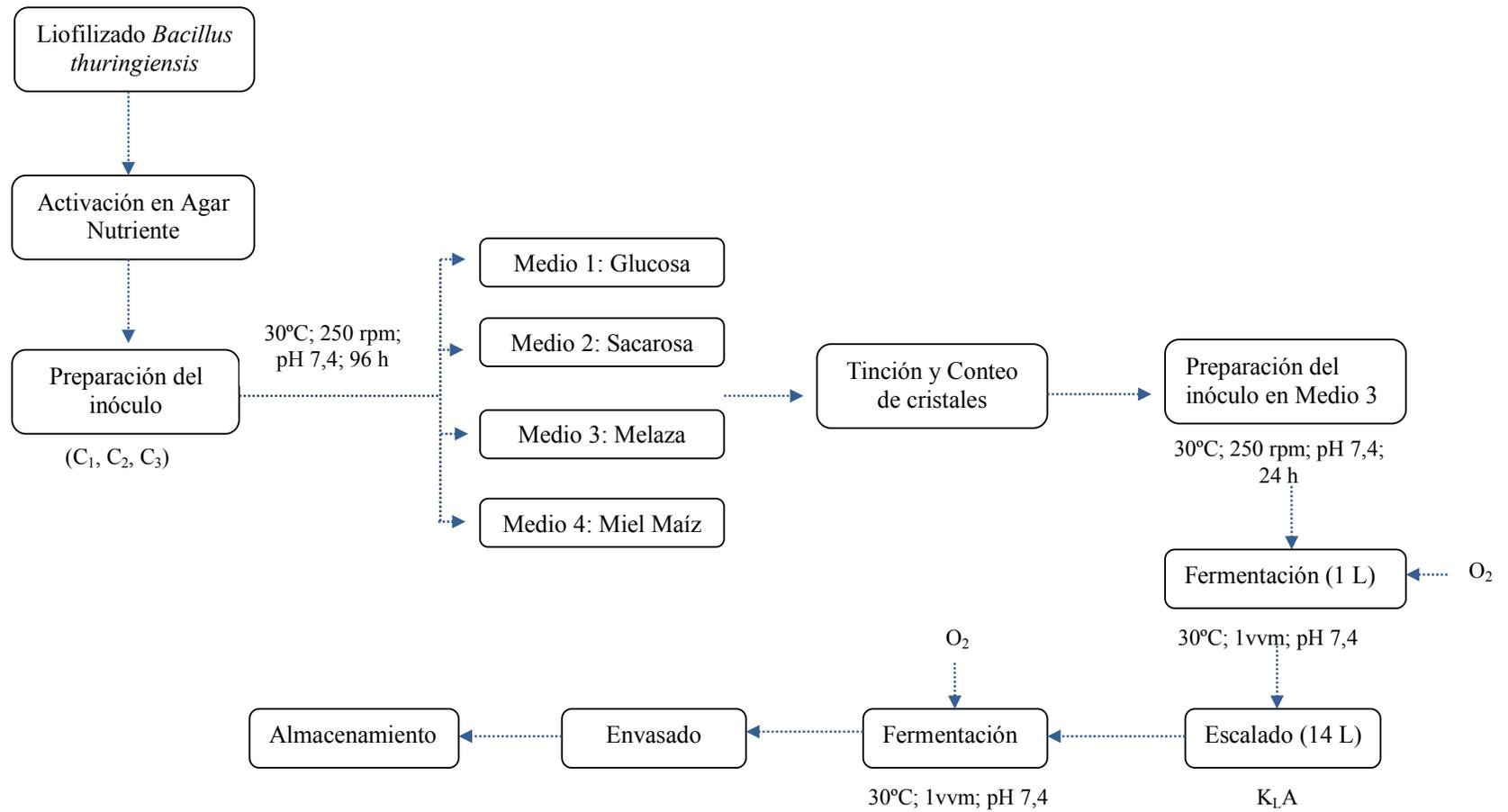


Figura 3.18 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno a escala 7 litros.  
Quito, Pichincha, 2010

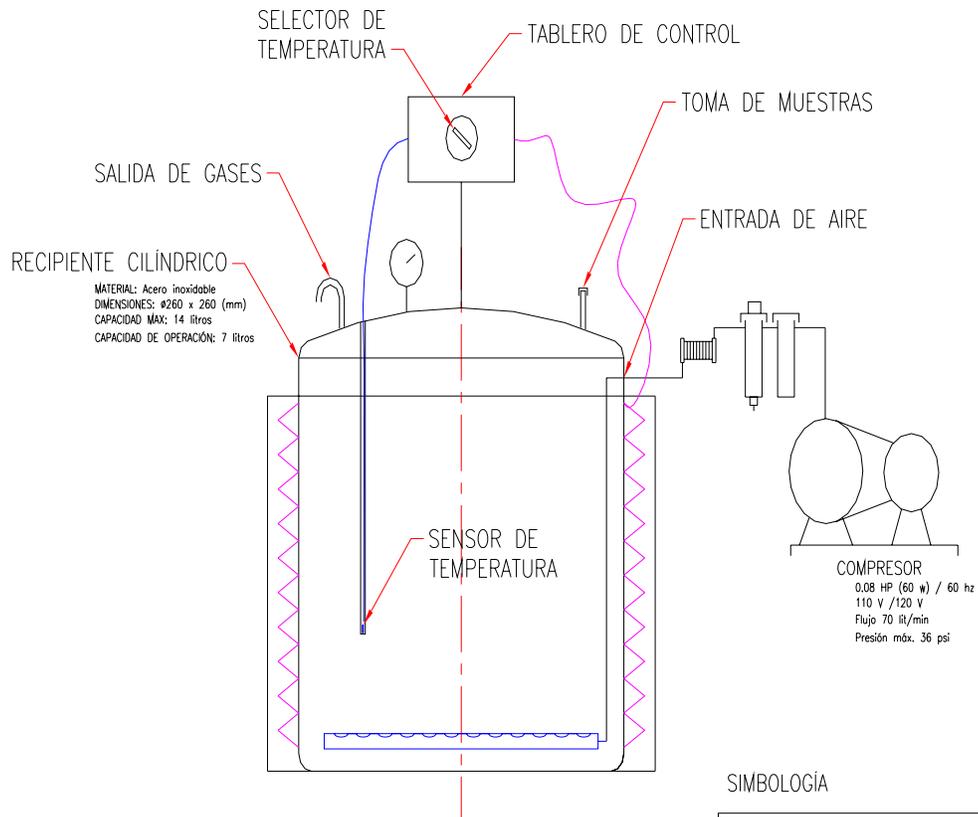
## Anexo I

### Diagrama del proceso de producción de *Bacillus thuringiensis*



## Anexo J

### Esquema del Funcionamiento del Fermentador de 14 litros



#### SIMBOLOGÍA

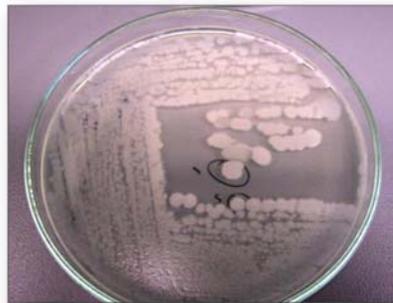


## Anexo K

### Fotografías



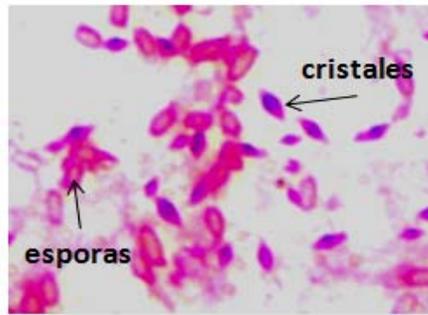
Fotografía H.1 *Bacillus thuringiensis* liofilizada Bitoxibacillin (BN3). Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.2 Cepa activa de *Bacillus thuringiensis*. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.3 Fermentaciones de los cuatro medios de cultivo (M1, M2, M3, M4) con las diferentes concentraciones de inóculo ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  UFC/ ml). Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.4 Tinción Gram del caldo de fermento del Medio 3. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.5 Bioacaricida producido a escala 1 L. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.6 Toma de muestra del Bioacaricida producido a escala 1 L. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.7 Tinción de esporas Wirtz-Conklin, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.8 Bioreactor de 14 litros para la producción del bioacaricida. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010



Fotografía H.9 Toma de muestras del bioacaricida en el Bioreactor de 14 litros. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010.



Fotografía H.10 Producto final de *Bacillus thuringiensis*. Hilsea, Quito, Pichincha, 2010.