

ESTRATEGIA PARA EL DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA FERMENTACION CON *BACILLUS THURINGIENSIS*

STRATEGY TO CULTURE MEDIA DESIGN FOR THE FERMENTATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Beltrán¹ L, Díaz S, Berdugo C, Zamora A, Buitrago G, Moreno N.

RESUMEN

En este trabajo se estudio el medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus thuringiensis* tendiente a la producción del ingrediente activo de un biopesticida que emplea cepas nativas de esta bacteria. Se realizaron fermentaciones en matraz de 1000 mL de volumen total con 100 mL de volumen de fermentación, utilizando 10 mL de inóculo bacteriano, una temperatura de 29 °C y una velocidad de agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). El estudio se realizó empleando un modelo de diseño experimental con glucosa como fuente de carbono evaluando la concentración de las fuentes de minerales en el medio de cultivo para la cepa HD1. También se evaluó la relación óptima entre el nitrógeno orgánico y el nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, para la producción de proteína asociada al cristal para la cepa nativa Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) 28.5.

Palabras Claves: *Bacillus thuringiensis*, biopesticidas, medio de cultivo, fermentación.

SUMMARY

In this work was studied the culture medium for the *Bacillus thuringiensis* fermentation, the purpose was the production of biopesticide using as active ingredient native strains. The culture was developed in flasks of 1000 ml containing 100ml of culture medium, which was inoculated with 10ml of the bacteria, incubated at 29 C and 200 rpm. In this study we used an experimental design model for the strain HD1 of *Bacillus thuringiensis*, with glucose as carbon source, evaluating the concentration of mineral

source in the culture medium. Additionally we evaluated the ratio of organic-inorganic nitrogen source in the culture medium, with the purpose of improving the insecticide crystal protein (ICP) for a native strain.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, biopesticides, growth media, fermentation

INTRODUCCION

El hombre necesita de los procesos bioquímicos para la obtención de productos benéficos y necesarios tales como alcoholes, antibióticos, vitaminas, entre otros muchos; todo esto mediante el empleo de organismos tales como bacterias, hongos y levaduras. Hacia mediados del siglo pasado, Pasteur observó que los procesos de alcoholisis eran producidos específicamente por levaduras; fue así como comenzaron una serie de estudios encaminados a la obtención de productos químicos como el glicerol, ácidos láctico, acético, cítrico, productos farmacéuticos como endorfinas, insulina, vacunas; y más recientemente la producción de polímeros por fermentación denominados biopolímeros; por lo tanto es preciso integrar disciplinas que abarcan variados aspectos convirtiéndose, de esta manera, en un área multidisciplinaria e interactuante con un objetivo en común: obtención de productos benéficos a la humanidad.

En la búsqueda de nuevas alternativas en el control de plagas, se ha generado a nivel mundial gran cantidad de conocimiento sobre el *Bacillus thuringiensis*, bacteria que produce una inclusión cristalina cuando esporula, cuya actividad patogénica sobre diferentes larvas de insectos ha sido ampliamente reportada. Para países como Colombia se constituye en oportunidad el estudio y evaluación de su biodiversidad microbiana, particularmente de *Bacillus thuringiensis*, con el propósito de obtener

¹ Investigadores del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.

insumos de origen biológico con capacidad para controlar insectos plaga.

Las componentes más importantes del medio de cultivo con respecto al crecimiento de *Bacillus thuringiensis* son la concentración de la fuente de carbono y la relación entre el nitrógeno orgánico y el inorgánico (Rossa y Mignone, 1993). De esta manera se ha planteado como objetivo principal del presente trabajo la formulación de un medio de cultivo que favorezca la producción de biomasa y su esporulación con la consecuente liberación del cristal proteico (inclusión paraesporal), empleando la subespecie *kurstaki* de *Bacillus thuringiensis*; estos resultados se aplicaron en fermentaciones a nivel de laboratorio empleando una cepa nativa de Bt procedente del cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN).

Se han dedicado esfuerzos a diseñar medios de cultivo que aporten fuentes de carbono, nitrógeno y elementos nutritivos que favorezcan tanto la formación de spora como de cristal. Se propone el uso de una combinación de fuente de nitrógeno orgánico (debido a que la bacteria requiere de algunos aminoácidos o péptidos esenciales para el crecimiento) e inorgánico. De ellos los más apropiados son el extracto de levadura y el sulfato de amonio respectivamente.

Del trabajo de Sakharova y colaboradores (1989), quienes estudiaron la subespecie *galleriae*, se concluye que el exceso de glucosa en el medio genera una reducción en el número de células y en la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial, afectando la formación de esporas; adicionalmente establecieron que a niveles mayores de 15 g/L de extracto de levadura se inhibe la esporulación. Avignone (1989) realizó investigaciones con el objeto de estudiar la influencia de las combinaciones de nitrógeno orgánico (extracto de levadura) e inorgánico (sulfato de amonio) y la relación C:N sobre el crecimiento y producción de proteína de *Bacillus thuringiensis*, subespecie *israelensis*. El extracto de levadura por sí solo no garantiza una adecuada producción de toxina, por lo que se debe emplear sulfato de amonio. Así, mostraron que tiene mayor influencia sobre la producción de proteína la combinación de fuentes de nitrógeno que la relación C:N.

Navarro y Acosta (1994) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, realizaron un estudio de tres fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y glicerol) para determinar cual permitía mayor producción, al tiempo que evaluaron el efecto del extracto de levadura y el sulfato de amonio sobre la producción de la toxina. Concluyeron que la mejor fuente de carbono es la glucosa y propusieron el medio cuya composición en g/L es: glucosa 6, sulfato de amonio 2 y extracto de levadura 2, emplearon como variable respuesta en el análisis, el conteo de esporas, como medida indirecta

de la cantidad de cristales producidos durante la fermentación.

MATERIALES Y METODOS

La cepa de interés proveniente de placas de mantenimiento se reactivó en placas con medio Luria Bertani (LB) sólido (Cerón, 1991) cuya composición y pH son: bacto-triptona 1.0%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0%, agar 1.5%, pH 7.3. El preinóculo se preparó en 10 mL de medio LB líquido (sin agar), sembrando una asada de la bacteria proveniente de la placa y en estado de esporulación, se incubó por 12 horas para posteriormente sembrar 90 mL del medio de acuerdo con el diseño experimental (Berdugo y Zamora, 1995).

Con el propósito de establecer condiciones de experimentación sin limitación de oxígeno se realizaron ensayos en erlenmeyers de 250 mL con niveles de volumen vacío en relación 1:5 a 1:10 con tapones de algodón, encontrando que, para la primera relación se estancaba la esporulación, en tanto que para la segunda esta aumentaba substancialmente la formación de spora con lo cual se seleccionó para el presente trabajo la segunda condición. Esto garantiza un suministro de oxígeno tal que su concentración en el medio no sea condición limitante para el microorganismo.

Medio de cultivo.

El medio para el crecimiento debe contener una fuente de materia y energía; en este trabajo se estudio la glucosa como fuente de carbono. Como fuente de nitrógeno inorgánico se empleó sulfato de amonio, que se consume en la fase exponencial del crecimiento (Abarca et al, 1992) y como fuente orgánica de nitrógeno el extracto de levadura que suministra adicionalmente aminoácidos (Nickerson y Bulla, 1974) que también son fuente de energía (Anderson, 1990). Dentro de los minerales informados como importantes en la literatura se evaluaron los siguientes por las razones que a continuación se exponen:

Ca⁺ : es importante en la esporulación puesto que forma la pared de la spora, obra como compuesto estabilizador, especialmente para el calor y los rayos ultravioleta. La limitación del crecimiento por Ca produce esporas menos resistentes al calor (Ertola, 1985).

K⁺ : es fundamental para el crecimiento, esporulación y producción de la endotoxina (Wakisaka et al, 1982).

Mn²⁺: es esencial para la formación de endoesporas en las distintas especies de *Bacillus* (Harwood, 1989).

Mg²⁺ : junto con el fósforo intervienen en las reacciones que involucran adenosín difosfato en la transferencia de energía.

Se incluyen también Zn²⁺ , Cu²⁺ y Fe²⁺ , minerales que aunque en menor grado son importantes, su ausencia podría ser limitante de crecimiento.

Determinación de la cinética de crecimiento.

Las unidades experimentales se mantuvieron a las condiciones apropiadas para el crecimiento de *Bt*, (29 °C, 200 rpm), se determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm con intervalos de tiempo de 1.5 horas; los datos fueron tratados para obtener la cinética de crecimiento, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d).

Condiciones de cultivo.

Los experimentos se realizaron en matraz de 1000 mL de volumen total con 100 mL de volumen de trabajo en relación 1/10 para permitir suficiente aireación, incrementada por la agitación que se proporcionó en agitadores orbitales a 200 rpm. El pH se ajustó a 7,2 y se esterilizaron los recipientes a 121 °C por 15 min. Las unidades experimentales se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada a 29 °C, temperatura óptima para el crecimiento de *Bt*. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo para las determinaciones analíticas.

Se realizaron estudios con dos cepas de *Bacillus thuringiensis*: HD1 e IBUN28.5, ésta última aislada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Con la cepa *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* ó HD1, se evaluaron las concentraciones de la fuente de carbono seleccionada (glucosa) y de las fuentes de minerales, y para la evaluación de la relación nitrógeno orgánico-nitrógeno inorgánico se empleó la IBUN28.5. El criterio empleado en estos estudios para la selección de una concentración se asocia a maximizar el rendimiento o la productividad en proteína.

Técnicas analíticas.

El crecimiento se evaluó por densidad óptica medida a 600 nm calculando el peso seco con la curva patrón, cuya correlación fue ajustada mediante la ecuación:

$$Y = 0.0046 + 1.3898X \quad r^2 = 0.9993 \quad (1)$$
 donde Y es la absorbancia, X peso seco en g/L.

La proteína total se calculó con el método de Lowry y el conteo de esporas se realizó con cámara de Neubauer. Se realizó observación al microscopio con tinciones Gram, cristal violeta y verde de malaquita.

Diseño del medio de cultivo

Como medio de cultivo de referencia se empleó el medio líquido HCO (Cerón, 1991) cuya composición es: bacto-peptona 7.0 g/L, KH_2PO_4 0.05 M, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.8×10^{-4} M, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.3×10^{-5} M, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.8×10^{-5} M, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.1×10^{-5} M, CaCl_2 anhidro 7.1×10^{-5} M, pH 7.2 y glucosa 1.66×10^{-2} M. Para el presente trabajo la fuente de carbono es la glucosa y se debe trabajar con una relación C:N > 1 (Rossa y Mignone; 1993). Se calcularon los niveles estequiométricos de acuerdo con

los requerimientos nutricionales (Duarte, 1994), y se eligieron los niveles comparando los calculados con los informados en la literatura.

Para evaluar las concentraciones de glucosa y de sales minerales en el medio se estudiaron 8 factores a saber: fuente de carbono (glucosa), extracto de levadura, sulfato de amonio, CaCl_2 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MnSO_4 y MgSO_4 ; dos niveles para cada uno, los cuales se presentan en la Tabla No. 1.

Tabla 1. Niveles a evaluar de cada uno de los factores seleccionados en los medios estudiados.

Denominación	Nutriente	Nivel bajo (g/L)	Nivel alto (g/L)
A	Glucosa	20	30
B	Extracto de levadura	1.73	3.46
C	Sulfato de amonio	2	5.88
D	CaCl_2	0.08	0.16
E	K_2HPO_4	0.32	1.029
F	KH_2PO_4	0.8	1.6
G	MnSO_4	0.0017	0.0034
H	MgSO_4	0.2815	0.563

Una vez seleccionados los 8 factores y sus correspondientes niveles evaluados, se ejecuta un diseño experimental factorial fraccionado 2^{8-4} , el cual arroja la matriz experimental presentada en la tabla 2.

Para la evaluación de la influencia de la relación nitrógeno orgánico/nitrógeno inorgánico (No/Ni) en la producción de proteína con la cepa IBUN28.5, se evaluaron los valores discretos No/Ni = 1, 2, 3, 4 y 5 de acuerdo con lo recomendado en la literatura (Avignone et al., 1990); en esta fase de la investigación se tomó como constante la relación C/N e igual a 4.44, tomada del estudio de Navarro y Acosta (1994), así como los demás componentes del medio cuya composición se muestra en la tabla No.3. En la tabla No. 4 se presentan las concentraciones de extracto de levadura y sulfato de amonio que se emplearon en los medios, cabe mencionar que el extracto de levadura y el sulfato de amonio tienen un contenido de 0.074% y 0.21% de nitrógeno respectivamente. Lo cual quiere decir que el único factor estudiado fue la relación No/Ni, fijando como variable respuesta la proteína.

RESULTADOS

En la tabla No. 5 se observan los resultados para el estudio de los niveles de sales en el medio de cultivo. De los resultados se observa que la mayor producción de biomasa fue de 2.18 g/L que se obtuvo con los medios 2,11,14 y 15. Las mayores concentraciones de proteína se lograron con los medios 3,12,16. Se corrobora que bajo estas condiciones la producción de biomasa no guarda una relación directa con la producción de esporas y proteína, los medios 3,9,11 y 12 se consideran promisorios por cuanto se logra con ellos una alta producción de esporas.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo evaluados (g/L).

Ensayo	Factor	A	B	C	D	E	F	G	H
1		20	1.73	2	0.08	0.32	0.8	0.0017	0.2815
2		20	1.73	2	0.16	0.32	1.6	0.0034	0.563
3		20	1.73	5.88	0.08	1.029	0.8	0.0034	0.563
4		20	1.73	5.88	0.16	1.029	1.6	0.0017	0.2815
5		20	3.46	2	0.08	1.029	1.6	0.0017	0.563
6		20	3.46	2	0.16	1.029	0.8	0.0034	0.2815
7		20	3.46	5.88	0.08	0.32	1.6	0.0034	0.2816
8		20	3.46	5.88	0.16	0.32	0.8	0.0017	0.563
9		30	1.73	2	0.08	1.029	1.6	0.0034	0.2815
10		30	1.73	2	0.16	1.029	0.8	0.0017	0.563
11		30	1.73	5.88	0.08	0.32	1.6	0.0017	0.563
12		30	1.73	5.88	0.16	0.32	0.8	0.0034	0.2815
13		30	3.46	2	0.08	0.32	0.8	0.0034	0.563
14		30	3.46	2	0.16	0.32	1.6	0.0017	0.2815
15		30	3.46	5.88	0.08	1.029	0.8	0.0017	0.2815
16		30	3.46	5.88	0.16	1.029	1.6	0.0034	0.563

Tabla 3. Minerales constituyentes empleados en el medio.

Reactivo	Concentración mg/ml
KH ₂ PO ₄	6.8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0278
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.014
MnSO ₄	0.0022
CaCl ₂	0.109

Tabla 4. Concentración de fuentes de nitrógeno para cada relación No/Ni

No/Ni	Extracto de levadura (g/L)	Sulfato de amonio (g/L)
1	4.47	1.46
2	5.92	1.02
3	6.7	0.72
4	7.18	0.58
5	7.47	0.48

Tabla 5. Resultados obtenidos para los experimentos de la tabla No. 2

MEDIO	BIOMASA (mg/mL)	ESPORAS (esporas/mL)	PROTEINA (mg/mL)
1	1.79	3.4x10 ⁷	0.51
2	2.18	1.10x10 ⁷	0.508
3	1.96	2.5x10 ⁸	0.64
4	1.96	1.2x10 ⁶	0.35
5	1.79	1.4x10 ⁶	0.44
6	1.98	1.7x10 ⁶	0.418
7	1.88	0	0.46
8	2.11	1.2x10 ⁷	0.46
9	1.91	3.5x10 ⁸	0.47
10	1.80	3.4x10 ⁷	0.46
11	2.18	2.3x10 ⁸	0.53
12	2.06	1.2x10 ⁸	0.59
13	1.58	3.4x10 ⁷	0.41
14	2.18	2.5x10 ⁷	0.52
15	2.18	2.3x10 ⁷	0.54
16	1.93	3.4x10 ⁷	0.58

Aquí se observa la mayor producción de proteína con el medio número 3, mientras que la mayor cantidad de esporas se obtiene con el medio número 9. Se destaca la importancia del CaCl₂, MgSO₄ y el extracto de levadura en la producción de esporas, así como el MnSO₄, MgSO₄ y el sulfato de amonio en la producción de proteína.

Para el análisis de interacción entre factores se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS. Los resultados que arroja el paquete se aprecian en las tablas Nos. 6, 7 y 8. Se evalúan interacciones hasta de segundo orden. Las interacciones de ordenes 3 y 4 están enmascaradas y permiten calcular el error. Resultan relevantes las interacciones cuyo nivel de significancia sea menor de 0.10. Los coeficientes de regresión positivos indican que la respuesta se favorece incrementando los niveles de los factores involucrados. Si los coeficientes son negativos, se favorece la respuesta al disminuir los niveles de los factores (Lui y Liao, 1994).

Tabla 6. Interacciones relevantes en la producción de biomasa

Factores independientes e interactuantes	Coefficiente de regresión	Estadígrafo t	Nivel de significancia
CONSTANTE	1.933125	111.1243	0.0000
A	0.035625	2.0479	0.0798
C	0.034375	1.9760	0.0887
E	-0.049375	-2.8383	0.0251
A*C	0.066875	3.8443	0.0063
A*E	0.043125	2.4790	0.0423
A*F	0.043125	4.2035	0.0040
A*G	-0.106875	-6.1436	0.0005
A*H	-0.100625	-5.7844	0.0007

R cuadrado: 0.887

A: Glucosa; B: Extracto de levadura; C: Sulfato de amonio
D: CaCl₂; E: K₂HPO₄; F: KH₂PO₄; G: MnSO₄; H: MgSO₄

En cuanto a la producción de biomasa se observa relevancia en las interacciones (A) glucosa con (C) sulfato de amonio, (E) K₂HPO₄, (F) KH₂PO₄, (G) MnSO₄, (H) MgSO₄ donde se verifica la importancia de estos sustratos en el crecimiento.

En la producción de esporas se destacan las interacciones: glucosa (A) - CaCl₂ (D)
glucosa (A) - MgSO₄ (H)
glucosa (A) - Ext. de levadura (B)

En la producción de proteína, las interacciones más importantes son:

K₂HPO₄ (E) - MnSO₄ (G)
K₂HPO₄ (E) - MgSO₄ (H)
KH₂PO₄ (F) - (NH₄)₂SO₄ (C)
KH₂PO₄ (F) - MgSO₄ (H)

Tabla 7. Interacciones relevantes en la producción de esporas.

Factores independientes e interactuantes	Coefficiente de regresión	Estadístico t	Nivel de significancia
CONSTANTE	8.64125E+7	7.7777	0.0001
A	4.55875E+7	4.1032	0.0046
B	-5.73625E+7	-5.1630	0.0013
E	-2.85875E+7	-2.5731	0.0368
F	2.47875E+7	2.2310	0.0609
G	3.99625E+7	3.5969	0.0088
A*D	-3.92375E+7	-3.5316	0.0096
A*H	-2.90125E+7	-2.6113	0.0348
A*B	-2.41375E+7	-2.1725	0.0664

R cuadrado: 0.849

A: Glucosa; B: Extracto de levadura; C: Sulfato de amonio
D: CaCl₂; E: K₂HPO₄; F: KH₂PO₄; G: MnSO₄; H: MgSO₄

Por último se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la relación No/Ni. El objetivo de realizar ensayos correspondientes a dos niveles de glucosa en el medio obedeció a determinar cual de los niveles reportados en la bibliografía es el mejor en cuanto a la producción de biomasa utilizando una cepa nativa de *Bt* (Scherrer y colaboradores, 1973). Este se establece en 6 g/L por producirse a este nivel mayor concentración de biomasa (5.8 mg/mL) respecto al de 8 g/L con el cual se obtuvo una concentración de biomasa de 3.7 mg/mL.

Tabla 8 Interacciones relevantes en la producción de

Factores independientes e interactuantes	Coefficiente de regresión	Estadístico t	Nivel de significancia
CONSTANTE	0.492813	41.0414	0.0000
A	0.019688	1.6396	0.1355
E*G	0.023188	1.9311	0.0855
C	0.025938	2.1601	0.0591
E*H	0.032188	2.6806	0.0252
F*C	-0.028062	-2.3370	0.0442
F*H	0.021563	1.7957	0.1061

proteína

R cuadrado: 0.5828

A: Glucosa; B: Extracto de levadura; C: Sulfato de amonio
D: CaCl₂; E: K₂HPO₄; F: KH₂PO₄; G: MnSO₄; H: MgSO₄

Para las diferentes relaciones de nitrógeno se presentan los resultados en la tabla No. 9. Los altos valores de nitrógeno encontrados en el medio de cultivo pueden deberse a la presencia de restos procedentes de la lisis celular, la cual no es posible controlar; esto podría estar enmascarando el verdadero consumo de nitrógeno.

De acuerdo con lo observado, se tiene que para la primera relación su tiempo de duplicación es de dos horas y media, mientras que para las demás es cerca de hora y media, esto permite concluir que a medida que se aumentan las relaciones, se reproduce más rápido el

microorganismo, ventaja económica si se piensa en la producción de la proteína a nivel industrial. El valor reportado corresponde al promedio entre la fermentación y su duplicado. La desviación estándar de los ensayos no supera el 5 %, valor estadístico máximo válido para ensayos en suspensiones (Scragg, 1996). A pesar de que la máxima producción de biomasa se obtuvo con la relación No/Ni = 1, su contenido de proteína asociada al cristal fue uno de los más bajos de las relaciones estudiadas, mientras que para No/Ni=5 se produjo la más baja cantidad de biomasa pero su contenido proteico fue de los más altos.

Tabla 9. Resultados del estudio de la relación No/Ni en el medio de cultivo

(No/Ni)	Biomasa (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	%N Consumido	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Esporas/mL (*10 ⁻⁶)
0	2.35	0.43	-	ND	ND	3.1
1	5.88	0.64	16	0.285	2.43	3.3
2	5.34	0.62	17.43	0.468	1.48	3.9
3	5.76	0.79	23.1	0.484	1.43	3.3
4	5.69	0.88	25	0.432	1.60	3.5
5	5.04	0.82	19.3	0.519	1.33	3.7

ND No fue evaluado.

El estudio estadístico se realizó con el fin de obtener una correlación matemática que reproduzca el sistema con el objeto de determinar el punto de máxima producción de proteína asociada al cristal en función de la relación No/Ni. Después de analizados los resultados entre la relación No/Ni y la cantidad de proteína asociada al cristal se obtuvo como modelo matemático:

$$P = -0,02945 * R^3 + 0,2525 * R^2 - 0,5580 * R + 0,9749 \quad (2)$$

donde P es la proteína asociada al cristal y R la relación No/Ni

$$\begin{aligned} \text{Para } R = 1,49 \quad \frac{d^2P}{dR^2} &= 0,25 > 0 \quad \text{Mínimo} \\ \text{Para } R = 4,22 \quad \frac{d^2P}{dR^2} &= -0,22 < 0 \quad \text{Máximo} \end{aligned}$$

Desarrollando matemáticamente la ecuación anterior en su primera derivada se obtienen las raíces: R₁ = 1,49; R₂ = 4,22. Reemplazandolas en la segunda derivada de la ecuación (1) se tiene: Reemplazando el valor de máxima producción en el modelo se tiene que la cantidad de proteína esperada en la fermentación para R = 4,22 es P = 0,904 mg/mL. Con el fin de comprobar la validez de la correlación matemática propuesta, se realizó una fermentación por duplicado utilizando el nivel de máxima producción, con las cepas IBUN28.5 y HD1. Las concentraciones de las

fuentes de nitrógeno corresponden a 7.2 g/L y 0.57 g/L para el extracto de levadura y el sulfato de amonio respectivamente. Los resultados obtenidos en estas fermentaciones se presentan en la tabla No. 10.

Tabla No 10. **Validación experimental del modelo matemático.**

Relación (No/Ni = 4,22)	Biomasa (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Esporas/mL ($\times 10^{-8}$)
IBUN28.5	4,83	0,93	0,46	3,3
HD1	1,96	0,64	0,20	2,5

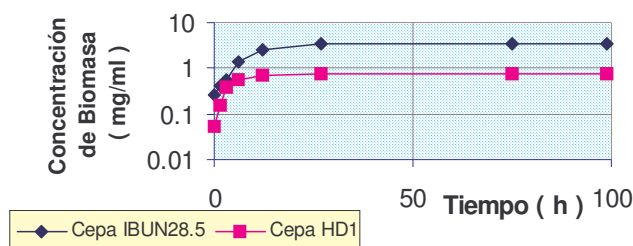
Las concentraciones de proteína obtenidas de este ensayo son muy similares a las que reporta el modelo desarrollado, lo cual nos permite concluir que el modelo tiene una calidad de predicción aceptable dentro de los límites propuestos.

Cinética de formación de biomasa para la cepa nativa (IBUN28.5) y la cepa patrón (HD1) en el medio formulado

En la figura 1 se observan los resultados de formación de biomasa típicos encontrados durante las fermentaciones realizadas para este trabajo, se presenta una comparación entre la cepa nativa IBUN28.5 y la cepa patrón HD1. Se observa que aunque los inóculos fueron generados mediante un proceso idéntico, los parámetros cinéticos son diferentes, este resultado concuerda con el obtenido en un trabajo paralelo realizado por el grupo (Ríos, 1996) en el que se evaluaron tres cepas nativas y en todos los casos los parámetros cinéticos fueron diferentes. El manejo de los inóculos evitó la presencia de fase lag durante el proceso fermentativo en todos los casos.

La formación de biomasa es sustancialmente menor para la cepa patrón (1,96 g/L) que para la cepa nativa (4.83 g/L), esto representa una fortaleza en el proceso de producción si se logra obtener a partir de esta biomasa la consecuente formación de cristal y espóra.

Fig. No. 1 Cinética típica de formación de Biomasa en Bt Cepa IBUN28.5 y Cepa Patrón HD1



CONCLUSIONES

La importancia que presenta el investigar variedades nativas, radica en que son propias del ecosistema colombiano, cosa que no sucede al emplear cepas internacionales, para el control de insectos plaga, pues estas responden a otras condiciones existentes en el medio ambiente del cual fueron aisladas. Es de esperarse que por la gran biodiversidad de Colombia se obtengan cepas nativas con cualidades destacadas desde el punto de vista de los biopesticidas.

La producción de biomasa no guarda una relación directa con la producción de esporas y proteína, al parecer no se produce un cristal por cada espóra que se produce.

La influencia de glucosa como fuente de carbono fue significativa sobre todas las variables de respuesta evaluadas. Como factor independiente así como factor interactuante, mostró relevancia sobre la producción de biomasa y de esporulación.

En cuanto a las técnicas analíticas empleadas, arrojan resultados confiables y reproducibles, manteniendo el error experimental en un nivel inferior al 5%, lo que se demuestra en todos los ensayos realizados que fueron realizados al menos por duplicado. Sin embargo para cuantificación de proteína asociada al cristal se recomienda usar otras técnicas como conteo de esporas por unidades formadoras de colonias (UFC), y separación por gradientes de sacarosa y/o densitometría, ya que la proteína asociada al cristal es la que ha demostrado presentar mayor actividad biocida y no la proteína total, por lo cual es necesario mejorar la producción del cristal tóxico, sin embargo su actividad es evaluada mediante bioensayos no reportados en este trabajo.

La importancia del estudio de complementar la fuente de nitrógeno orgánico con la de inorgánico se ve reflejado en el aumento de la producción de proteína asociada al cristal (tabla No. 9), con un valor máximo de 43,7% de proteína en relación con la utilización de extracto de levadura como única fuente. Se sugiere estudiar diferentes relaciones C/N a fin de observar este efecto sobre el proceso.

El diseño experimental utilizado es muy útil para evaluar los factores relevantes y sirve de orientación para diseños de profundización.

Respecto de las composiciones de los medios promisorios para la cepa HD1, que se presentan en la tabla No. 2, aun cuando se presenta coincidencia en algunos factores no puede concluirse que sea el nivel óptimo, por cuanto a éstos niveles no se observan los mismos resultados en todos los medios; es la interacción de los factores en sus niveles lo que optimiza los resultados. El medio de cultivo promisorio para la cepa HD1 corresponde al denominado 12, de la tabla No. 2.

El medio de cultivo propuesto para la cepa nativa IBUN28.5 tiene una composición de 6 g/L de glucosa, 7.3 g/L de extracto de levadura, 0.57 g/L de sulfato de amonio y los minerales presentados en la tabla No. 3.

El modelo propuesto para la proteína en función de la relación No/Ni fue determinado y corroborado para los límites propuestos; sin embargo al ser extrapolado para relaciones por debajo de la unidad, la proteína producida es mayor a la encontrada en No/Ni =1, esto va en contra de lo reportado en la literatura para la

utilización de las fuentes de nitrógeno por parte del microorganismo, (Avignone, 1990; Arcas et al., 1984), pero sobre todo en contra vía de los resultados encontrados en este trabajo, al nivel No=0, por lo tanto el modelo propuesto no debe ser extrapolado. Se recomienda estudiar niveles por debajo de la unidad por presentarse en este punto un mínimo de valor similar al de No/Ni=0, lo cual lleva a pensar que el microorganismo tiene un comportamiento diferente al presentado por el modelo en esta zona.

BIBLIOGRAFIA

- Abarca, C.; Ceron, J.** 1990. Qué son los bioinsecticidas?. En: Universidad: Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México
- Abarca, C.; Martinez, A.; Quintero, R.** 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. Aisawi. En: Universidad, Ciencia y Tecnología. 2 (3) 51-56.
- Anderson, T.B.** 1990. Effects of the carbon:nitrogen ratio and the oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticides crystal protein. London. Ontario. Canada. M.E. Sc. 193p.
- Arcas, J.; Yantorno, O.; Arraras, E.; Ertola, R.;** 1984. A new medium for growth and d-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *Biotechnology Letters*. 6. 495-500.
- Avignone, R.C.A.; Yantorno, O.; M. Arcas, J.; Ertola, R.** 1990. Organic and inorganic nitrogen sources ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. israelensis d-endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6: 27-31.
- Cerón, J.** 1991. Establecimiento de estrategias para la caracterización y manipulación de cepas de B.t. Tesis. Maestría en Bioinsecticidas. Cuernavaca. México.
- Chisten, P.; Raimbault, M.** 1991. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratostyxis fimbriata*. *Biotechnology Letters*. 13 (7) 521-526.
- Duarte T, A.** 1994. Conferencias de Ingeniería Bioquímica. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. 1-21.
- Dulmage, H.** 1970. Production of the spore - d endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology*. 16. 385-389.
- Ertola, R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides.** 1985. Centro de Investigación y Desarrollo de fermentaciones industriales. Facultad de ciencias exactas. Universidad Nacional La Plata Argentina. 187-198.
- Faloci, M.; Yantano, O.; Marino, H.; Arcas, J.; Ertola, R.** 1990. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis d-endotoxin. *World Journal of Microbio*.
- Goldberg I.; Bottat, B.; Klein, D.** 1980. Optimization of medium for a high yield production of spore crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *spodoptera littoralis* Boisid. *Biotechnol. Lett.* 2. 419-426.
- Hofte, H.; Whiteley, H.R.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53. 2. 242-255.
- Holmberg, A.; Sievanen, R.; Carlberg, G.** 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.* 22. 1707-1724.
- Khovreychev, M. P.; Slobodkin, A. N.; Sakharova Z.V.; Blockhina T.P.** 1991. Growth and development of *Bacillus thuringiensis* in multiple stage continuous cultivation. *Biotechnology Letters*. 695-697.
- Knowles, B.; Dow, J.** 1993. The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their model of action on the insect gut. *BioEssays*. 15 (7) 469-476.
- Krieg, A.; Milterburger.** 1984. Insecticides I: *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Biotechnological Processes*. 3. 273-290.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, L.; Randall, R.** 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biochemical Advances*. 260-275.
- Lui Chi-Hsien.; Liao Chii-Cherng.** 1994. Medium optimization for L-phenylalanine production by triptophan auxotroph of coryne bacterium *Gutamicum*. *Biotechnology Letters*. 16 (8) 801-806.
- Montgomery, D.** 1984. Design and analysis of experiments. John Willey and sons. 2 ed. p. 50-175.
- Navarro C.; Acosta P.** 1995. Estudio de la fuente de carbono mas apropiada en la producción de *Bacillus thuringiensis*. Proyecto de grado Facultad de Ingeniería. Depto de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
- Nickerson, K. W.; Bulla, L.; A. St. Julian, G.** 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. Radiospirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 28. 129-132.
- Quintero, R.** 1981. Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones. p. 39-78, 223-236. Editorial Alhambra. Mexicana. México.
- Ramírez, D.; Quintero, R.** 1990. Producción de d-endotoxina por fermentación batch de *Bacillus thuringiensis*. Centro de Investigación sobre genética y biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rowe, G.; Margaritis, A.** 1987 Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 6 (1) 87-127.
- Rossa, C. A.; Mignone. C.** 1993. d-endotoxin activity and spore production in batch and fedbatch culture of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 15. 3. 295-300.
- Sakharova, Z.V.; Robotnova, I.L.; Khovrychev. M. P.** 1989. Growth and spore-forming in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. *Biotechnology Letters*. 794-798.
- Sarra, M.; Redin, I.; Ochin, F.; Godia, F.** 1993. Application of factorial designs to the optimization of medium composition in batch cultures of *streptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. *Biotech. Lett.* 15 (6) 559-564.
- Sikdar, D.P.; Majumdar M.K.; Majumdar S.K.** 1991. Effect of minerals on the production of the d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Biotechnology Letters*. 13 (7) 511-514.
- Smith, R.A.** 1982. Effect of Strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Can. J. Microbiol.* 28. 1089-1092.