



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A**

**PRODUCCION DE BIOINSECTICIDAS A PARTIR DE
CEPAS NATIVAS DE Bacillus thuringiensis**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUAN DAVID REYES VAZQUEZ

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

El presente trabajo se realizó en la Planta Semipiloto del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección de los señores Profesores M. en C. Eduardo De Urquijo Niembro y M. en C. Leobardo Ordaz Contreras.

Agradezco el apoyo económico de CONACYT para la realización satisfactoria, de este trabajo de investigación.

"...y es que para alcanzar aquello que más quieras,
deberás aprender a vencerte a tí mismo, porque los
obstáculos más difíciles que tendrás en la vida,
son los que creas con tu propia mente"

Di Vad Na-Ujh.

"Unos seres vivientes, unos seres vivientes
microscopicos, son la verdadera causa de las
fermentaciones"

Louis Pasteur.

"En la vida de todos los días, aún en los países
desarrollados, la biología está en el cruce de
todos los caminos, la enseñanza de las ciencias
naturales debe representar, en promedio, la
tercera parte del conjunto de ciencias, si se
quiere formar a los jóvenes de las futuras
generaciones y prepararlos para los grandes
problemas a los cuales se enfrentarán ".

JEAN DAUSSET

Premio Nobel

DEDICATORIAS

CON TODO CARINO A MIS PADRES

A ti papá

DE QUIEN APRENDI LO
QUE ES LA FUERZA Y
LA PERSEVERANCIA

A ti mamá

QUE ME ENSEÑASTE
LA PACIENCIA Y LA
NOBLEZA.

ADEMAS POR SU AMOR, COMPRESION Y SACRIFICIO.

A MIS HERMANOS

Patricia , Carmen y Gabriel

PORQUE ESTEMOS SIEMPRE UNIDOS

A MIS SOBRINOS

Martha Inadre, Ivonne Edith,

Gabriel, Samuel y Ricardo

POR IR SIEMPRE MAS ALLA DE NUESTRAS

PROPIAS LIMITACIONES

A Mizra

POR SER LA LUZ DE MI CORAZON Y LA PIEDRA

CON LA QUE CONSTRUYO EN REALIDAD MIS

ILUSIONES

Agradecimientos.

A todos mis amigos de la planta semipiloto por su ayuda incondicional en la realización de este trabajo

A Eduardo y Leonardo por su apoyo, consejos y dirección.

Y muy especialmente a la Dra. Alicia Espinosa Lara, por sus consejos y apoyo desinteresado en mi carrera profesional.

C O N T E N I D O

CAPITULO	PAGINA
RESUMEN	1
I INTRODUCCION	3
II ANTECEDENTES	8
III OBJETIVOS	31
IV MATERIAL Y METODOS	33
V RESULTADOS Y DISCUSION	52
VI CONCLUSIONES	90
VII RECOMENDACIONES	91
VIII BIBLIOGRAFIA	92
IX NOMENCLATURA	102

Debido a la importancia económica y ecológica alcanzada por la bacteria *Bacillus thuringiensis* al ser utilizada como insecticida biológico para el control de insectos plaga, se ha planteado la búsqueda de nuevas cepas, el mejoramiento genético de algunas cepas de colección actuales y además el diseño de nuevas técnicas para la producción del bioinsecticida.

A partir de 11 cepas de *B. thuringiensis*, aisladas por la Universidad Autónoma de Nuevo León, se efectuaron ensayos de fermentación a nivel de matraz y en reactor de 14 L; los ensayos a nivel de matraz, fueron realizados en dos medios de cultivo: MHS y M-25. En estos experimentos se observó que las cepas, cultivadas en el medio M-25, tuvieron un mejor crecimiento y actividad insecticida; sobresaliendo las cepas GM-9 y GM-10 con el máximo crecimiento poblacional y actividad biológica. Por lo tanto estas 2 cepas y el medio M-25 fueron seleccionados para los ensayos de Cultivo por Lote, en el reactor de 14 L.

Bajo este sistema de cultivo, las dos cepas mostraron comportamientos cinéticos adecuados de crecimiento, consumo de fuente de carbono, y actividades insecticidas; destacando la cepa GM-10 al alcanzar el 100% de actividad insecticida.

Se probó también un sistema de Cultivo por Lote Alimentado (CLA), de tipo de adición constante; efectuándose una prueba preliminar con la cepa GM-9, en la cual el medio de adición (medio M-25 incrementado en 3 veces su concentración original y sin micronutrientes) no contó con la presencia de sales inorgánicas en su composición. La cinética obtenida, demostró que era necesario incorporar las sales excluidas, para efectuar los siguientes CLA.

Con esta técnica de cultivo se obtuvieron crecimientos del orden de 1×10^8 ; sin embargo, las actividades biológicas de los productos tuvieron un decremento en su porcentaje de mortalidad. Debido probablemente a presencia de enzimas proteolíticas en el mosto, inestabilidad genética y problemas de disolución del producto al momento de efectuar los bioensayos.

I I N T R O D U C C I O N .

En la actualidad el hombre ha tomado conciencia de los daños que ocasiona con el uso excesivo de insecticidas químicos, los cuales afectan no sólo a las plagas sino también a la flora y la fauna silvestres. Estos insecticidas permanecen en el ambiente y lo deterioran permanentemente; por otra parte, algunos insectos han desarrollado resistencia a estos productos y en consecuencia ha sido necesario incrementar la dosis de los insecticidas o crear nuevos productos, la mayor de las veces, más tóxicos.

Una alternativa a los problemas generados por el abuso en la aplicación de insecticidas químicos, es el Control Biológico de Plagas. Este consiste en el manejo de la densidad poblacional de organismos que se han convertido en plagas o son plagas potenciales, mediante la acción de patógenos o depredadores de aquellos. La utilización de este Control afecta exclusivamente a las plagas y como es un método biológico, no deteriora el ambiente (14).

Los avances de la microbiología han permitido la utilización de microorganismos (hongos, bacterias y virus) para el control biológico de insectos plaga, como se puede observar en la Tabla 1; de entre éstos, las bacterias entomopatógenas sobresalen por su efectividad (28) y entre ellas *Bacillus thuringiensis*, la cual es el principal agente de acción microbiológica para el control de lepidópteros y dípteros, que son plagas de importancia agrícola y sanitaria respectivamente (22).

La toxicidad de *B. thuringiensis* radica en una proteína cristalina delta-endotoxina (δ -endotoxina) la cual se forma durante el proceso de esporulación del microorganismo, por lo que también ha recibido el nombre de cuerpo paraesporal (12)

**TABLA 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO INSECTICIDAS
CONTRA DIFERENTES ORDENES DE INSECTOS.**

GRUPO	ORGANISMO	ORDEN DE INSECTO ATACADO
BACTERIA		
	<i>Bacillus popilliae</i>	COLEOPTERA
	<i>Bacillus sphaericus</i>	DIPTERA
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	LEPIDOPTERA DIPTERA
VIRUS		
	BACULOVIRUS	LEPIDOPTERA HYMENOPTERA DIPTERA
	REOVIRUS	LEPIDOPTERA
	ENTOMOPOXVIRUS	ORTHOPTERA COLEOPTERA
HONGOS		
DEUTEROMYCETES		
	<i>Hymenostible longispora</i>	HYMENOPTERA
	<i>Nomurea rileyi</i>	LEPIDOPTERA
ENTOMOPHTORALES		
	<i>Entomophthora planchoniana</i>	HYMENOPTERA
	<i>Entomophthora virulenta</i>	ORTHOPTERA
	<i>Entomophthora muscae</i>	DIPTERA

Fuente: Dulmage y Rogoff (28,62)

La acción patogénica de esta bacteria es selectiva, ya que la actividad de una variedad o cepa de *B. thuringiensis* es limitada, en el mayor de los casos, a un sólo orden de insectos como puede verse en la Tabla 2; así mismo hasta el momento no hay reportes en campo del desarrollo de alguna resistencia por parte de los hospederos, ni tampoco de que la δ -endotoxina tenga efectos nocivos sobre otros organismos, incluyendo al hombre (71).

TABLA 2. EJEMPLOS DE VARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis*
Y DE ESPECIES DE INSECTOS A LOS QUE AFECTAN.

VARIEDAD	INSECTO	ORDEN
<i>thuringiensis</i>	<i>Ephastia kuehniella</i>	LEPIDOPTERA
<i>finitimus</i>	<i>Malacosoma diestria</i>	LEPIDOPTERA
<i>kurstaki</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	LEPIDOPTERA
<i>sotto</i>	<i>Bombix mori</i>	LEPIDOPTERA
<i>aizawai</i>	<i>Ephastia cautella</i>	LEPIDOPTERA
<i>israelensis</i>	<i>Aedes aegypti</i>	DIPTERA
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	DIPTERA
<i>sandiego</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	COLEOPTERA

Fuente : Ertola (31)

Las perspectivas del Control Biológico de plagas, así como el manejo relativamente fácil de esta bacteria, han permitido su empleo en la elaboración de insecticidas por fermentación como se ejemplifica en la Tabla 3 (31, 64).

TABLA 3. PRODUCTOS INSECTICIDAS UTILIZADOS A NIVEL MUNDIAL ELABORADOS A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis* .

NOMBRE	PAIS	SEROTIPO/VARIEDAD	COMPANIA
BACTOSPEINE	FRANCIA	H-1/thuringiensis	BIOCHEM. PROD.S.A.
LEPTOX	FRANCIA	H-1/thuringiensis	BIOCHEM. PROD.S.A.
BUGTIME	FRANCIA	H-3(HD-1)/kurstaki	BIOCHEM. PROD.S.A.
THURICIDE	E. U.	H-3(HD-1)/kurstaki	SANDOZ. INC.
DIPEL	E. U.	H-3(HD-1)/kurstaki	ABBOTT LABS.
INSECTINE	U. R. S. S.	H-1/insectus	
BIP	U. R. S. S.	H-10/caucasicus	
BITOXIBACILINA	U. R. S. S.	H-1/thuringiensis	
BAKTUKAL	YUGOSLAVIA	H-1/thuringiensis	
BACTIMOS	FRANCIA	H-14/israelensis	BIOCHEM. PROD.S.A.
SKEETAL	G. B.	H-14/israelensis	TATE & LYLE. INC.
TEKNAR	E. U.	H-14/israelensis	SANDOZ. INC.
VECTOBAC	E. U.	H-14/israelensis	ABBOTT LABS.

Fuente: Krieg (43)

II ANTECEDENTES.

2.1 CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE *Bacillus thuringiensis*

La bacteria *Bacillus thuringiensis* es un bacilo con una dimensión de $1\mu \times 3 - 5\mu$; Gram positivo, con flagelos peritricos, aeróbico y produce una endospora elipsoidal central, en la Figura 1 se presenta un esquema de esta bacteria. En medios de cultivo sólidos forma colonias color crema, opacas, planas y de bordes irregulares (13).

Habita en el suelo como saprófito y sus esporas pueden permanecer en estado latente hasta que las condiciones ambientales permitan su germinación o las destruyan. La endospora difiere ópticamente de la célula vegetativa, ya que es más refractiva y menos susceptible a tinción, además de tener una gran resistencia al calor y otros agentes destructivos, como los solventes orgánicos (13,24).

La capacidad de producir un cristal protéico (δ -endotoxina), es la principal característica que diferencia a los miembros de *B. thuringiensis* de aquellos del grupo de *B. cereus*, el cuál no es entomopatógeno. A pesar de que este cristal es sintetizado durante el proceso de esporulación, hay pruebas de que se forma fuera de las partes componentes de la espora (10,12).

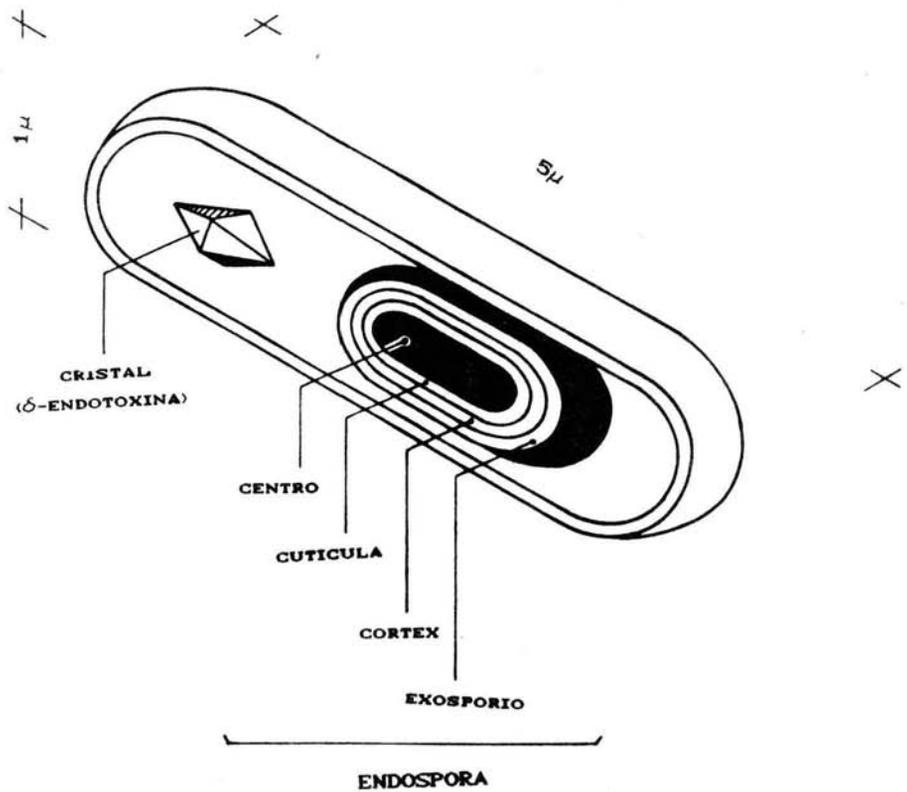


FIG. 1 : REPRESENTACION DE Bacillus thuringiensis .

2.2 CARACTERISTICAS DE LA δ -ENDOTOXINA

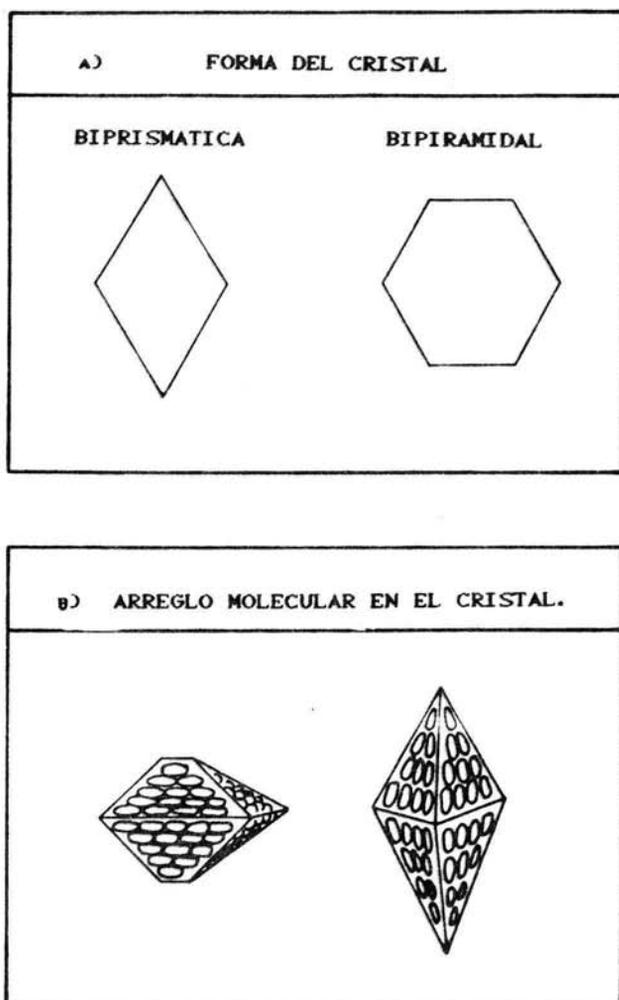
Esta proteína cristalina cuyas dimensiones aproximadas son de $1\mu\text{m}$, constituye hasta un 30% del peso seco de un cultivo esporulado (32).

Hasta el momento se han descrito de manera clara 2 tipos de cristales, uno en forma bipirismática (diamante regular) y otro bipiramidal (cúbico con ángulos redondeados) (37), representados en la Figura 2. Ambos están formados por un mismo tipo de molécula de forma elipsoidal, la cual dependiendo de su orientación y longitud de separación entre sí, origina la forma del cristal. Existen otras formas de cristal (amorfos, esféricas) pero no han sido descritas de manera particular (18).

El análisis en la composición del cristal, de *B. thuringiensis* de la variedad *kurstaki*, reveló que contiene 95% de proteínas y 5% de carbohidratos. Este cristal protéico contiene una subunidad de glicoproteína de peso molecular aproximado de 1.3×10^5 Daltones (D), así mismo contiene 3.8% de glucosa y 1.8% de manosa (52); no obstante, existen diferencias bioquímicas entre los cristales de las variedades de *B. thuringiensis* como: los pesos moleculares de las subunidades del cristal, la composición y en la activación de aminoácidos. Estas diferencias se emplean para proponer el origen de los diversos espectros de acción y toxicidad de las variedades del grupo de *B. thuringiensis* (19,33,38,73).

FIG. 2 : MUESTRA DE DOS TIPOS DE CRISTAL DE Bacillus thuringiensis.

[MODIFICADO DE GRIGOROVA et.al. (37)]



2.3 MECANISMOS DE ACCION DE LA δ -ENDOTOXINA

En la Figura 3 se muestra esquemáticamente el epitelio del intestino medio de las larvas de lepidópteros, el cual posee una bomba de potasio que genera una diferencia de potencial y un gradiente de iones H^+ y K^+ hacia el lumen intestinal, lo cual da lugar a que el pH sea alcalino (con valores de 10.0 a 11.0) en el interior del tracto intestinal. Estas condiciones son favorables para la hidrólisis de los taninos que se encuentran en una alta cantidad en la dieta foliar de las larvas (23).

La ingestión del cristal (δ -endotoxina), es el primer paso para su acción tóxica. Al ser ingeridos, se disuelven en el intestino medio gracias a las condiciones alcalinas prevalecientes y a la acción de algunas proteasas (32); la glicoproteína o protoxina del cristal (de aprox. $1.34 \times 10^5 D$) se transforma en una molécula tóxica (de aprox. $6.8 \times 10^4 D$) resistente a dichas condiciones (38, 73). Esta molécula difunde rápidamente e interactúa con los receptores específicos de las membranas apicales de las columnas celulares intestinales (23). Esta interacción incrementa la conductividad del K^+ , modificando la diferencia de potencial generada por la bomba, provocando disturbios en los diferentes gradientes iónicos (Na^{2+} , Mg^+ y Ca^{2+}) y finalmente una citólisis. Las alteraciones anteriores conducen a una parálisis intestinal y a un aumento en la alcalinidad de la hemolinfa (de pH 6.8 a 10.5) (23,45).

Por otra parte la germinación de esporas da origen a una septicemia, con lo que se acelera la parálisis general, produciéndose finalmente la muerte del organismo (45). Esta forma de acción se ilustra en la Figura 4.

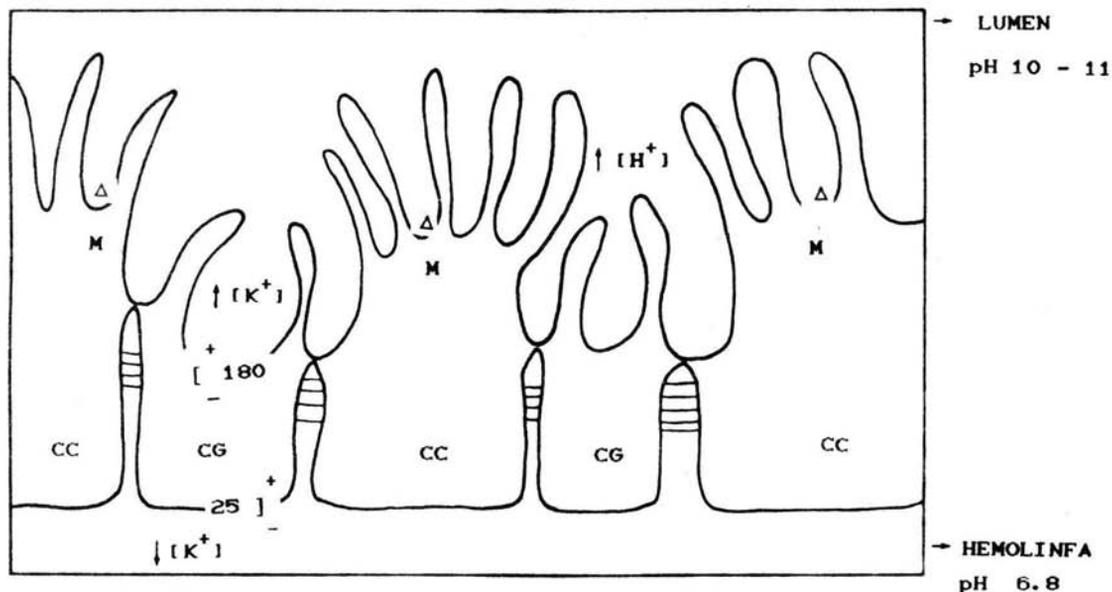


FIG. 3 : MODELO DEL EPITELIO INTESTINAL DE LEPIDOPTEROS,
LA BOMBA POTASIO Y SITIOS ESPECIFICOS DE
RECONOCIMIENTO DE LA TOXINA.

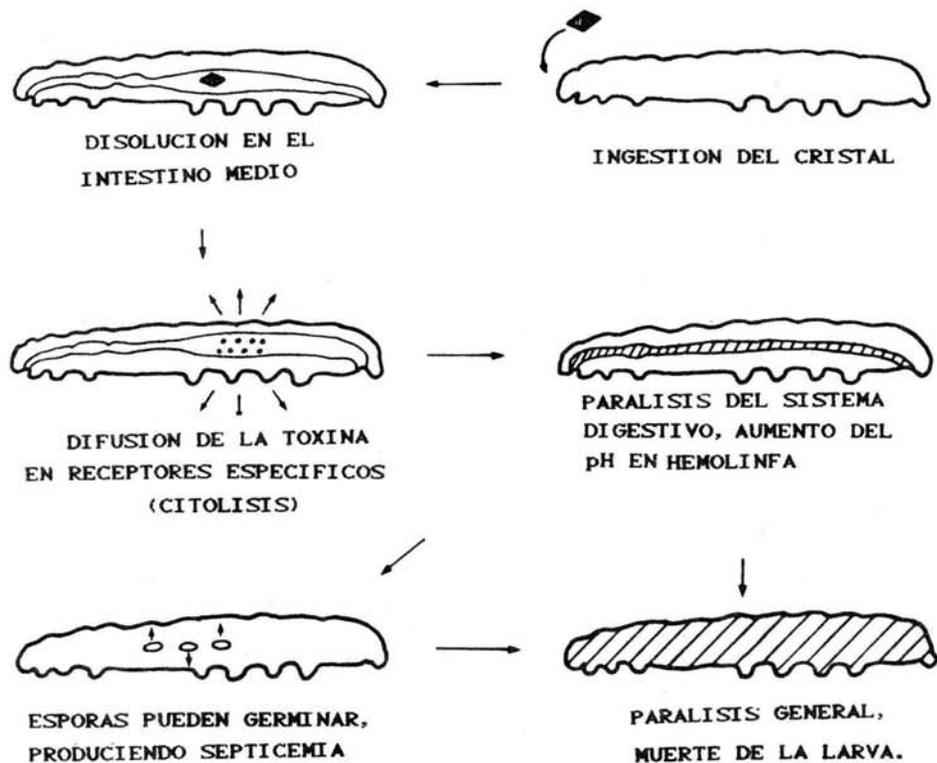
[MODIFICADO DE CROWFORD *et. al.* (23)]

CG. CELULAS GLOBULARES; CC. CELULAS COLUMNARES

M. SITIOS DE RECONOCIMIENTO EN MEMBRANA

Δ. δ-ENDOTOXINA

+
[DIFERENCIA DE POTENCIAL (mV)
-



13

FIG. 4 : ESQUEMA DE LA ACTIVIDAD TOXICA DE Bacillus thuringiensis EN LARVAS DE LEPIDOPTEROS.

Otro papel que se ha asignado a los polipéptidos tóxicos sobre todo al inicio de su acción, es la inhibición del consumo de oxígeno por las mitocondrias de las células epiteliales y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, por lo que se da lugar a un desbalance metabólico que contribuye a la parálisis generalizada (40,41).

Si bien éste esquema de actividad se ha propuesto para lepidópteros, es posible que se presente de manera análoga en los diferentes órdenes de insectos que son afectados por las diversas variedades de *B. thuringiensis* (57,71).

2.4 HISTORIA

El primer aislamiento de *B. thuringiensis*, fué hecho en Japón por Ishawata en 1902, a partir de "gusanos de la seda" (*Bombix mori*); el microorganismo aislado fue denominado "Bacilo de soto" (76).

En 1911 en Thuringia, Alemania, Berliner aisló un organismo similar de larvas enfermas de la "palomilla del mediterráneo" (*Anagasta kuehniella*). Berliner junto con su colaborador Mattes, observaron que las células esporuladas de los cultivos no sólo contenían la espora, sino también un cuerpo de forma romboide irregular, a ésta estructura la llamó "Restkörper" y a la bacteria *Bacillus thuringiensis* (76).

Aoki y Chigasaki en 1915, observaron que sólo cultivos esporulados y viejos del bacilo podían causar la afección del "gusano de la seda" y por la rapidez de la misma, sugirieron que pudiera ser causada por la acción de una tóxina (76).

En Canada, Hannay en 1953, estudió la esporulación del bacilo, retomando el "Restkörper" de Berliner, determinando que cuando se forma la espora ésta invariablemente es acompañada de los cuerpos parasporales; sugiriendo así que dichos cuerpos pudieran estar involucrados en la enfermedad provocada al insecto, por esta bacteria. En Estados Unidos, T.A. Angus explicó la patogenicidad de la bacteria en una serie de trabajos, de 1954 a 1956, en los que confirmó las sugerencias de Aoki y Chigasaki, así como las de Hannay (62).

A partir de estos trabajos, se vislumbró la posibilidad de emplear a *B. thuringiensis* como un agente eficaz en el control de insectos; por esta razón se acentuó la investigación sobre esta bacteria.

El sistema de clasificación más común de las variedades de *B. thuringiensis*, está basado en las propiedades antigénicas de las proteínas flagelares llamadas antígenos H, es decir, un sistema de tipo serológico establecido en 1962 por Barjac y Bonefoi (9), del Instituto Pasteur (el cual se enlista en la Tabla 4). La serotipificación fue apoyada por un análisis de esterases de las diferentes variedades de la bacteria, estudio efectuado por Norris en 1963 (54).

En 1969 Dulmage reportó la cepa HD-1 de la variedad *kurstaki* (26), dicha cepa era 16 veces más potente que las cepas estándar usadas en los productos comerciales de la época; en 1971, dicha cepa se adoptó como estándar internacional de muchos de esos productos . El mismo investigador propuso la regulación de la potencia de los productos, con base en sistemas de unidades internacionales (U.I.) en los ensayos biológicos, de igual manera, propuso la búsqueda e implementación de nuevos medios y formulaciones para la producción de *B. thuringiensis* (27), ya que significaba una alternativa ecológica y económica a los insecticidas químicos.

En las décadas de los años de 1970 y 1980, se incrementaron los estudios de *B. thuringiensis* en muchos países, principalmente en la búsqueda de nuevas cepas ; algunas investigaciones fructificaron al encontrar nuevos estándares con mayor potencia (como HD-1-1973 o HD-1-1980) (28) o nuevas variedades de esta bacteria que atacan otros ordenes de insectos (dípteros y coleópteros) (17, 74) de importancia económica cuando se convierten en plagas.

TABLA 4. SEROTIPOS DE DIFERENTES VARIETADES DE
Bacillus thuringiensis.*

SEROTIPO H	VARIEDAD
1	<i>thuringiensis</i>
2	<i>finitimus</i>
3a	<i>alesti</i>
3a, 3b	<i>kurstaki</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>
4a, 4c	<i>dendrolimus</i>
5a, 5b	<i>galleriae</i>
5a, 5c	<i>canadiensis</i>
6	<i>entomocidius</i>
7	<i>aizawai</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>
9	<i>tolworthi</i>
10	<i>darmstadiensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>
12	<i>thompsoni</i>
13	<i>pakistani</i>
14	<i>israelensis</i>
15	<i>dakota</i>
16	<i>indiana</i>
17	<i>tohokuensis</i>
18	<i>kumamotoensis</i>
19	<i>tochigiensis</i>
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>
21	<i>colmeri</i>
22	<i>shandogiensis</i>
-	<i>tenebrionis</i>
-	<i>sandiego</i>

* DE ACUERDO CON LA CLASIFICACION DE H. DE BARJAC. (9,10)

- NO ESTABLECIDO

También los estudios genéticos con éste microorganismo han tenido una gran relevancia, sobre todo porqué han localizado los genes que regulan la síntesis de la δ -endotoxina (46). Con esta información, se ha pretendido aumentar la potencia en las cepas estándar o el intentar transmitir los genes que sintetizan la δ -endotoxina en plantas (creación de plantas transgénicas), para que éstas elaboren la proteína directamente, de manera que ahora las plantas sean resistentes, por sí mismas, al ataque de algunas plagas (11).

2.5 UTILIZACION DE *Bacillus thuringiensis* EN MEXICO

Según Alcocer Gómez, el primer registro que se tiene de *B. thuringiensis* en México (1), fue en 1959 cuando se usó en una parcela de Chapingo, Méx. contra "gusanos de la col" (*Pieris elodia*). En esa misma época, se realizaron ensayos de actividad insecticida de la bacteria sobre el "boludo del nogal" (*Hyphantia cunea*) y la "conchuela del frijol" (*Epilancha varivestis*), teniendo mortalidades del 86 y 78% respectivamente (5).

Posteriormente en 1977, Alcocer Gómez (2) reporta sus trabajos sobre larvas del "gusano cogollero del maíz" (*Spodoptera frugiperda*), plaga importante en el país y en Latinoamérica; obteniendo buenos resultados con las larvas más jóvenes. Reporta además la actividad del producto comercial DPEL (ABBOTT, LABS.) contra larvas del "gusano de bolsa" (*Malacosoma azteca*) en sauces de Xochimilco, D.F., teniendo resultados del 74% de mortalidad.

En 1980 Alcocer Gómez realizó un estudio preliminar, con miras a la producción de *B. thuringiensis*, así mismo reportó la aplicación de este organismo para el control de plagas de lepidópteros en diversos cultivos y estados del país como Sinaloa y Chiapas. En la primera entidad lo aplicó sobre el "gusano falso medidor" (*Trichoplusia ni*) en cultivos de melón y en la segunda entidad contra el "gusano soldado" (*Spodoptera exigua*) (3). Otras plagas de lepidópteros contra las que fue aplicado según el reporte del mismo investigador son: *Pieris elodia*, *Hyphantia cunea* y *Diatrea saccharalis*.

Durante la década de 1980, en nuestro país, se acentuó la investigación en torno a esta bacteria, en virtud de los altos volúmenes de importación de productos elaborados a partir de *B. thuringiensis*: DIPEL en 1980 tuvo una cifra de importación de 15 toneladas anuales y actualmente alcanza las 50 toneladas al año, THURICIDE (SANDOZ), un producto de reciente introducción y registro en la SARH, logró en 1990 una cifra de 30 toneladas anuales (61). Es por ello que se han realizado trabajos con la intención de generar una tecnología de producción para el país en algunos centros de investigación como: el Tecnológico de Veracruz, CINVESTAV y Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) (8,25,47).

A nivel de investigación básica, la UANL estableció un programa de aislamiento, hace aproximadamente 10 años, de cepas de *B. thuringiensis* a partir de suelo y de larvas enfermas de plagas locales. Estas cepas han sido probadas a nivel experimental en matraz y con distintos medios de fermentación (47) además de determinar la toxicidad del producto; los resultados han sido interesantes en algunos de sus ensayos, ya que algunas cepas han superado en actividad al estándar internacional HD-1S-1980 (66).

Con base en la información anterior, se considera conveniente desarrollar investigaciones más profundas con cepas aisladas en el país, porque si bien las preparaciones comerciales actúan satisfactoriamente sobre las plagas contra las que son usadas; es posible que algunos de estos aislados lleguen a tener mayor efectividad biológica y puedan ser utilizados en la solución de problemas originados por plagas locales.

Además la búsqueda de nuevas cepas junto con la ingeniería genética de *B. thuringiensis*, es uno de los puntos principales, en el panorama de investigación de esta bacteria a

nivel mundial (46,55). Esto permitirá tener cepas con un mayor espectro de actividad y/o potencia y la posibilidad de un rendimiento económico mayor que algunas de las cepas de colección actuales (24), previendo que en el futuro se incremente el mercado de los insecticidas biológicos (60).

2.6 PROCESOS DE PRODUCCION DE *Bacillus thuringiensis*

La producción comercial del bioinsecticida basado en *B. thuringiensis* se ha realizado mediante dos tipos de procesos fermentativos : Fermentación Semisólida y Fermentación Sumergida (64).

1) FERMENTACION SEMISOLIDA.

El proceso consiste en que el medio de cultivo se encuentra en forma de pequeñas partículas sólidas, entre las cuales se crean puentes de agua, siendo en estos donde el microorganismo lleva a cabo el intercambio de materia, gas y energía (64). El sustrato es extendido en cajones o charolas, que son colocadas en una cámara de fermentación, donde se controla la temperatura y humedad del aire (la cual tiene generalmente un valor muy alto).

Este procedimiento fue el primero en emplearse en la producción de esporas y δ -endotoxina de *B. thuringiensis*; sin embargo, actualmente ya no es empleado, debido a las siguientes desventajas:

- a) Baja producción de esporas por volumen de medio.
- b) Problemas de control de las condiciones ambientales de producción (temperatura, pH y aireación).
- c) Calidad heterogénea del producto.

2) FERMENTACION SUMERGIDA.

Esta técnica es la más conocida y desarrollada a escala industrial. Consiste en el cultivo de un microorganismo en medio líquido; dicho cultivo contiene los nutrimentos y condiciones necesarias para el crecimiento y la obtención del producto.

Este proceso, es el que se ha utilizado para la producción comercial de *B. thuringiensis* (75) (el cual se ilustra en la Figura 5), debido a las ventajas que presenta con respecto al cultivo semisólido, como son :

- a) Control adecuado de las condiciones ambientales de la fermentación.
- b) Rápido crecimiento y una mayor concentración de esporas por volumen de medio.
- c) Producto de calidad homogénea.

CONDICIONES DE CULTIVO

Las condiciones óptimas para un adecuado crecimiento, esporulación y formación del cristal proteico en la bacteria son :

* Temperatura.

El Rango de crecimiento para *B. thuringiensis* se encuentra entre los 20 y 35 °C, pero la producción óptima se observa a los 30 °C (43).

* pH.

El crecimiento de la bacteria se observa en un rango de pH de 5.8 a 8.5; sin embargo el pH óptimo de crecimiento es de 7.0 (22).

* Oxígeno.

Se ha observado que durante el crecimiento, así como en la etapa de esporulación y producción de la δ -endotoxina, *B. thuringiensis* requiere por lo menos de 20 a 30 % de oxígeno disuelto en el medio (35).

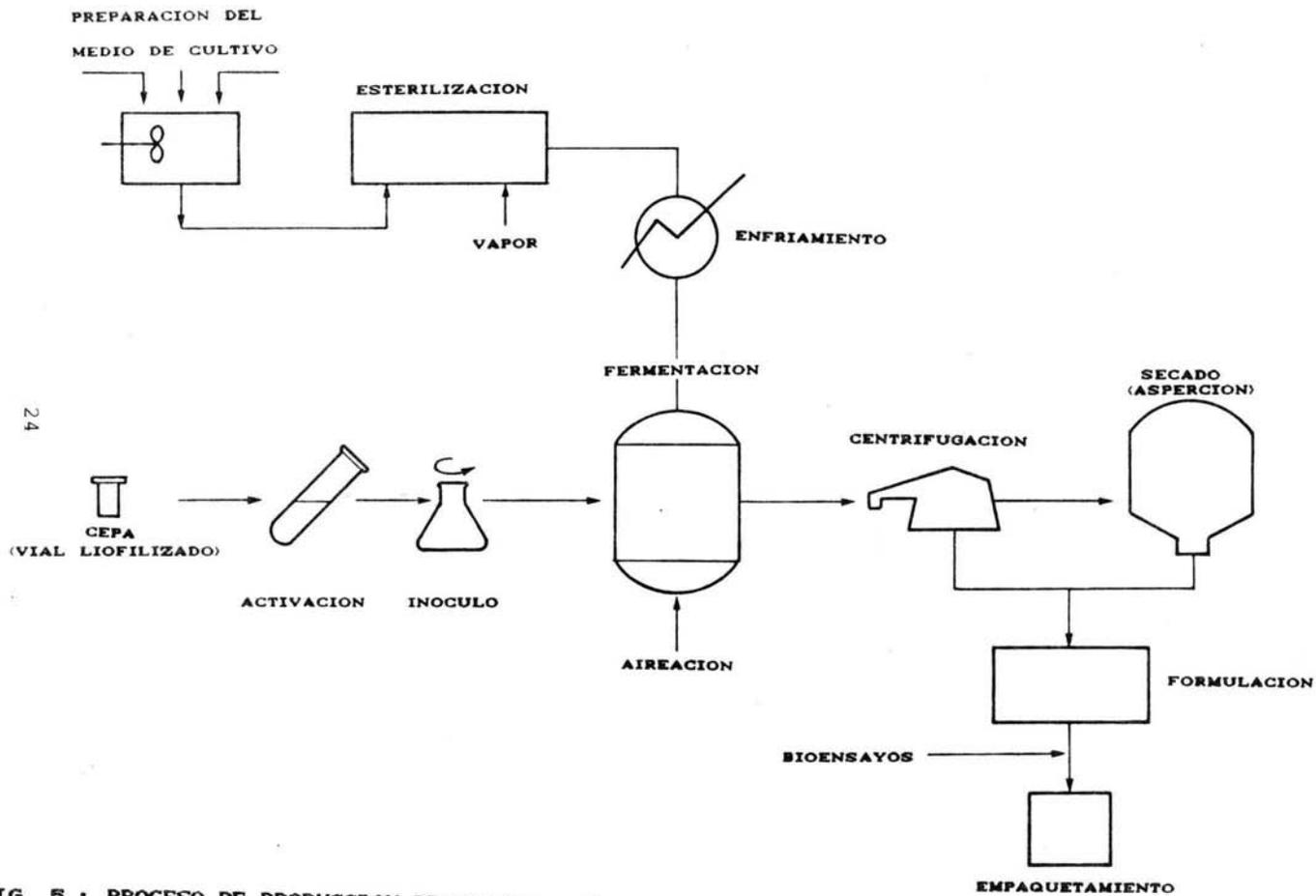


FIG. 5 : PROCESO DE PRODUCCION DE *Bacillus thuringiensis*,
BAJO EL SISTEMA DE CULTIVO SUMERGIDO.
[ESQUEMA MODIFICADO DE KRIEG (43)]

MEDIOS DE CULTIVO

Los procesos fermentativos a escala industrial de la producción de esporas y cristales tóxicos de la bacteria, utilizan medios definidos y medios complejos (36, 58). Actualmente se ópta por estos últimos, pues en su composición pueden emplearse derivados agroindustriales (Tabla 5), que aportan los nutrientes necesarios (principalmente fuente de nitrógeno y carbono) para generar un crecimiento abundante y adecuadas esporulaciones, siendo además de precio bajo y fácil adquisición (22); lo que ha permitido disminuir los costos de producción.

En los medios de cultivo se han empleado como fuentes de carbono: glucosa, fructosa, almidón, maltosa, melaza, ácidos orgánicos e incluso aminoácidos (6,28,31). Cuando se ha utilizado glucosa, generalmente se han obtenido buenos resultados. Smith (70) en su trabajo con la variedad *israelensis* obtuvo una mejor actividad insecticida y mayor producción de esporas en medios con glucosa, que en medios conteniendo sacarosa y glicerol.

Arcas y col. (6), tuvieron un incremento en la producción de esporas , cuando aumentó la concentración de glucosa de 10 a 20 g/L. Goldberg (36) incrementó la concentración 15 a 30 g/L, sin que se registrará una influencia negativa en la actividad metabólica de la bacteria. De Urquijo (25) trabajó con 30 g/L obteniendo buenos resultados en la producción de la variedad *kurstaki* (HD-73).

**TABLA 5. DERIVADOS AGROINDUSTRIALES EN LA PRODUCCION DE
BIOINSECTICIDAS**

FUENTES DE CARBONO	FUENTES DE NITROGENO
GLUCOSA	HARINA DE SOYA
HARINA DE MAIZ	HARINA DE ALGODON
LACTOSA	AGUA DE COCIMIENTO
ACEITE DE SOYA	DE MAIZ
MELAZAS	GLUTEN DE MAIZ
ALMIDON	LEVADURA
	LEVADURA DE CERVEZA
	CASEINA

FUENTE : ERTOLA Y ROWE (31,64)

Las fuentes de nitrógeno empleadas han sido: peptona, triptona, extracto de levadura, aminoácidos y harinas de semillas. Dulmage (26) ha establecido que la omisión de una concentración adecuada de esta fuente, reduce la producción y actividad insecticida del cristal tóxico de la bacteria; además reportó variaciones en la producción y actividad insecticida, al utilizar diversas fuentes de nitrógeno (bactotriptona, harina de algodón, triptona y fécula de maíz), con 12 variedades de la bacteria; concluyendo que la actividad insecticida depende del efecto combinado de las potencias de cada cepa y la influencia del medio de cultivo. El mismo efecto fue observado por Salama y col. (67).

En relación a las sales minerales requeridas por el microorganismo, algunas investigaciones resaltan la importancia de el Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} . De estas investigaciones sobresale la de Nickerson y Bulla (53), quienes trabajaron con 18 cepas de *B. thuringiensis* en un medio mínimo de sales, glucosa y ácidos orgánicos; observando la importancia del Mn^{+2} y Ca^{+2} durante la formación de la espora.

CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO (CLA)

Aún cuando los procesos industriales de elaboración del complejo espora-cristal están establecidos, continúan las investigaciones para elevar la productividad del sistema de fermentación y aumentar la potencia de la δ -endotoxina.

La productividad de un sistema de fermentación es afectada por la formulación del medio, factores fisicoquímicos (pH, temperatura y aireación), rendimiento celular y técnica de

cultivo (29, 34). Entonces para obtener una mayor productividad en los sistemas de fermentación, pueden utilizarse nuevos medios y técnicas de cultivo, como el Cultivo por Lote Alimentado (CLA). Este método ha permitido un uso más eficiente de los componentes del medio de cultivo y una mayor productividad del sistema (30,75).

Esta técnica consiste en agregar al fermentador, una corriente de alimentación que contenga uno o más nutrientes sin que exista una corriente de salida (Figura 6); por lo que el volumen del reactor de fermentación se incrementa y al alcanzar el volumen máximo de operación , se da por terminada la corrida (59). Es importante puntualizar que en esta técnica se considera a un componente del medio de cultivo como el sustrato limitante del crecimiento, cuya concentración determina la tasa de crecimiento celular. Los otros componentes del medio pueden estar en exceso en relación a la demanda celular o bien pueden encontrarse en concentraciones subóptimas (51).

Por lo que es importante que en un CLA se programe el aporte de medio fresco y el tiempo de suministro, para evitar inhibiciones al crecimiento por exceso de sustrato así como la limitación del crecimiento por falta del mismo (44, 48, 49).

Los métodos más comunes para establecer un parámetro de control en la adición de sustrato son: alimentar a una velocidad prefijada, la cual puede ser constante, exponencial o lineal; controlar la velocidad de alimentación para mantener constante el pH (El medio de adición puede contener ácido o base) y la última, es controlando el oxígeno disuelto en el medio para aquellas fermentaciones en las cuales la producción es limitada por la disponibilidad de oxígeno (42).

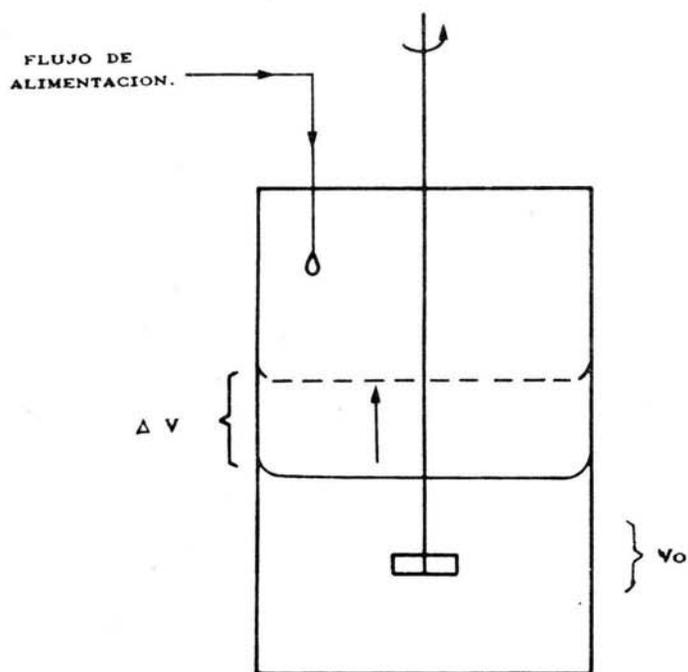


FIG. 6 : REPRESENTACION DE UN CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO.

[MODIFICADO DE PIRT (59)].

Un CLA, puede mantener constante la tasa de crecimiento del microorganismo, incrementar la concentración de biomasa y/o controlar la producción de metabolitos secundarios. Además, permite determinar parámetros bioenergéticos, influencia de factores fisicoquímicos y limitaciones por diferentes nutrientes (30,42,49).

Este sistema de cultivo empezó a utilizarse de forma empírica, a principios del siglo XX, en la producción de levadura de panificación; en los años treinta de manera más científica, se utilizó en la producción de glicerol, acetona, butanol y otros productos (30,75). Actualmente con esta técnica se producen antibióticos, aminoácidos, vitaminas y enzimas (30,44); de manera más reciente se ha empleado en la producción de proteína unicelular (56).

En relación al uso de esta técnica para producir *B. thuringiensis* sólo existe el reporte de Arcas y col (7), que utilizaron un CLA lineal con la variedad *kurstaki*. Dichos autores lograron incrementar la producción de esporas de 1.08×10^{12} a 7.36×10^{12} esp/L, al probar concentraciones de glucosa de hasta 56 g/L con el incremento proporcional de los demás componentes del medio.

Debido a la importancia económica y biológica de *B. thuringiensis*, el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV ha establecido proyectos, para desarrollar una tecnología para la producción de bioinsecticidas, a escala semipiloto con el fin de controlar ciertas plagas agrícolas y sanitarias.

III O B J E T I V O S .

Los objetivos del presente Trabajo de tesis fueron :

3.1 OBJETIVO GENERAL.

3.1.1 Establecimiento de un Cultivo por Lote Alimentado, para la producción de un Insecticida Biológico empleando cepas Bacillus thuringiensis, nativas de México.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

3.2.1 Seleccionar dos cepas de Bacillus thuringiensis, en cuanto a capacidad de crecimiento y actividad insecticida, para realizar los ensayos en el reactor de fermentación.

3.2.2 Establecer y elegir el medio de fermentación, en el cual se obtienen las cualidades de selección de las cepas.

3.2.3 Determinar los parámetros y condiciones adecuadas para el desarrollo del Cultivo por Lote Alimentado.

IV MATERIALES Y METODOS.

4.1 MICROORGANISMO.

En el presente trabajo se emplearon 11 cepas de *B. thuringiensis* las cuales se enlistan en la Tabla 6 , provenientes de la Colección de Cepas Nativas del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

4.2 CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

Las cepas utilizadas se conservaron por resiembras trimestrales en agar nutritivo (Merck) de pH 7.0. Antes de efectuar la conservación, se realizó un cultivo por estria cruzada para verificar la morfología colonial y por lo tanto tener un cultivo axénico. La conservación se efectuó sembrando las cepas en tubos de tapón de rosca con medio inclinado, los cuales se incubaron a 30°C durante 24 h y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4°C.

TABLA 6. CEPAS DE *Bacillus thuringiensis** UTILIZADAS EN LA EXPERIMENTACION.

CEPA	SEROTIPO	VARIEDAD
GM 1	21	<i>colmeri</i>
GM 8	21	<i>colmeri</i>
GM 9	21	<i>colmeri</i>
GM 10	21	<i>colmeri</i>
GM 11	21	<i>colmeri</i>
GM 23	7	<i>aizawai</i>
GM 34	3a, 3b	<i>kurstaki</i>
GM 49	3a, 3b	<i>kurstaki</i>
GM 50	3a, 3b	<i>kurstaki</i>
GM 59	3a, 3b	<i>kurstaki</i>
GM 60	9	<i>tolworthi</i>

* PERTENECIENTES A LA COLECCION DE CEPAS NATIVAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y DEL SUELO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA UANL.

4.3 MEDIOS DE CULTIVO.

Las materias primas y sales utilizadas en la composición de los medios de cultivo fueron de grado industrial a excepción de los microelementos, que fueron grado reactivo. En la preparación de los medios se utilizó agua potable.

4.3.1 MEDIO HARINA DE SOYA (MHS).

La composición de este medio se indica en la Tabla número 7; para su elaboración la melaza se ajustó a una concentración de 11% de azúcares totales y el CaCO_3 se disolvió previamente en 0.1 mL de HCl a 0.5 N, con la finalidad de solubilizar el compuesto. El pH se ajustó a 7.0 antes de la esterilización, la cual se llevó a cabo a 15 lb/in² por 15 min..

TABLA 7. COMPOSICION DEL MEDIO DE FERMENTACION
HARINA DE SOYA (MHS)

Melaza (11% de azúcares)	5 g
Harina de Soya	10 g
Agua de cocimiento de maíz	1 g
CaCO_3	0.1 g
pH	7.0
Agua	1000 mL

EL CaCO_3 SE DISUELVE PREVIAMENTE EN 0.1 mL DE HCl (0.5 N)

4.3.2 MEDIO HARINA DE SANGRE (M - 25).

La composición de este medio se presenta en la Tabla 8; para su elaboración se prepararon tres suspensiones denominadas A, B y C. La suspensión A requirió de un tratamiento térmico que se efectuó a 17 lb/in² durante 50 minutos, la suspensión C se preparó disolviendo cada componente en forma sucesiva. Posteriormente se mezclaron las suspensiones A y C, ajustando el pH a 7.0 con NaOH 3.0 N y se esterilizó a 20 lb/in² durante 25 minutos. La solución B se esterilizó por separado a 10 lb/in² durante 10 minutos y se mezcló después con la suspensión A-C, en forma aséptica.

4.4 INOCULO

El inóculo para las fermentaciones a nivel matraz, se preparó en tubos de tapón de rosca conteniendo 10 mL de Caldo Triptosa Fosfato (CTP, Bioxon). Los tubos fueron sembrados con una asada de los cultivos mantenidos en tubo inclinado, incubándose por 18 h a 30°C. Con este cultivo se inocularon los matraces, empleando una concentración del 0.5% con respecto al volumen de trabajo.

El inóculo para el fermentador, se preparó en matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 250 mL de medio CTP y sembrados con una asada del cultivo de tubo inclinado. Este cultivo se incubó con agitación constante (agitadora de ambiente controlado New-Brunswick G25) a 200 rpm y 30°C durante 10 h. El fermentador se inoculó en una relación del 2% con referencia al volumen de operación.

TABLA 8. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA
FERMENTACION.
HARINA DE SANGRE (M - 25)

PARTE	COMPUESTO	CANTIDAD
A	Harina de Sangre	12 g
	Levadura de Cerveza	6 g
	H ₃ PO ₄ (85% v/v)	7 mL
B	Glucosa	30 g
C	Agua de cocimiento de maiz	5 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
	MgSO ₄	2 g
	KCl	1.5 g
	CoCl ₂	30 mg
	MnSO ₄	40 mg
	ZnSO ₄	5.8 mg
	CuSO ₄	7.5 mg
	Agua	1000 mL

LA PARTE A SE SOMETE UN TRATAMIENTO TERMICO ANTES DE MEZCLAR CON LA PARTE C PARA ESTERILIZAR.

LA PORCION B SE ESTERILIZA POR SEPARADO.

4.5 FERMENTACION EN MATRAZ

Estos ensayos se efectuaron con las 11 cepas de *B. thuringiensis*, que fueron divididas en dos grupos: I y II para facilitar el posterior manejo y análisis de resultados. El grupo I correspondió a las cepas GM-1 a GM-11 y el grupo II estuvo formado por las cepas GM-23 a GM-60.

Las fermentaciones se realizaron por duplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 100 mL de medio, los cuales se incubaron en agitación a 250 rpm y 30 °C. De cada matraz se tomó 1 mL de muestra, a intervalos de 6 h, para evaluar el crecimiento y grado de esporulación; cuando se tuvo más del 80% de esporas libres, la fermentación se dió por terminada. Estas fermentaciones se efectuaron tanto en el medio MHS, como en el M-25.

4.6 FERMENTACION EN REACTOR DE 14 LITROS.

Para estos ensayos se utilizaron fermentadores de 14 L de volumen nominal (New-Brunswick FS-314) equipados con : controlador de pH (New-Brunswick pH 22), electródo de pH esterilizable (Ingold electrode), medidor de oxígeno disuelto (New-Brunswick DO 81), electródo de oxígeno galvánico (construido en el Depto. de Biotecnología del CINVESTAV) y electródo de espuma. El sistema de agitación de los fermentadores consistió de dos impulsores tipo turbina. A estos fermentadores se les adaptaron bombas peristálticas (New-Brunswick) para la adición del antiespumante y el ácido o la base; el esquema del fermentador se muestra en la Figura 7.

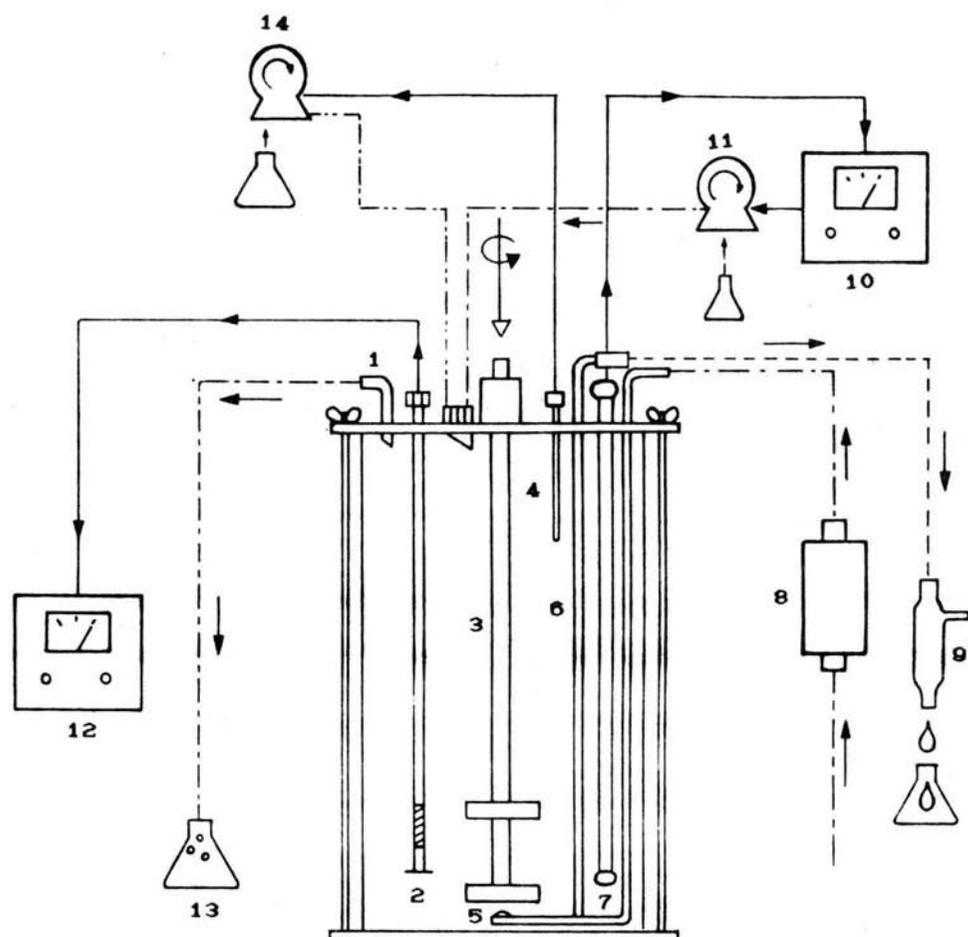


FIG. 7 : ESQUEMA DEL REACTOR DE FERMENTACION DE
14 L CON SUS ACCESORIOS.

- | | |
|---|--|
| 1. SALIDA DE AIRE | 8. FILTRO DE AIRE |
| 2. ELECTRODO DE OXIGENO | 9. TOMA DE MUESTRA |
| 3. FLECHA E IMPULSORES | 10. CONTROLADOR (pH) |
| 4. ELECTRODO DE ESPUMA | 11. BOMBA PERISTALTICA (pH) |
| 5. CONDUCTO ENTRADA DE AIRE | 12. REG. OXIGENO DISUELTO |
| 6. CONDUCTO DE SALIDA (TOMA DE MUESTRA) | 13. BENZAL (AIRE DE SALIDA) |
| 7. ELECTRODO DE pH | 14. BOMBA PERISTALTICA (ANTIESPUMANTE) |

4.6.1 CULTIVO POR LOTE

El fermentador se esterilizó con el medio de cultivo (M-25) y las fuentes accesorias que contenían el ácido, la base y el antiespumante a 20 Lb/in² por 25 minutos.

Las condiciones de operación del fermentador fueron :

VOLUMEN	7 L
TEMPERATURA	30 °C
AGITACION	600 rpm *
AIREACION	1 v.v.m.
pH	7.0

*(volumen de aire por volumen de medio por minuto)

El valor del pH se mantuvo por adición de ácido (H₃PO₄ 85 %) o base (NaOH 0.1 N).

La formación de espuma se controló automáticamente por medio de un electródo de espuma, que al entrar en contacto con ésta, cerraba el circuito eléctrico de una bomba peristáltica, para adicionar el antiespumante (polipropilenglicol 1 %); al bajar el nivel de la espuma se abría el circuito deteniéndose la adición del antiespumante.

Del fermentador se tomaron muestras cada 4 h para su análisis (conteo celular y azúcares reductores).

4.6.2 CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO (CLA).

Para establecer las condiciones de operación del CLA a probar con las cepas GM-9 y GM-10, se utilizó el programa de computación ECUCLA (ECUACIONES PARA CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO) elaborado por Ordaz (56). Las variables que maneja el programa fueron cargadas con los siguientes valores (en la sección de

nomenclatura se encuentra la correspondencia y unidades utilizadas):

$$V_0 = 5 \text{ L}, V_f = 10 \text{ L}, \mu_{\max} = 0.24, C_{S00} = 30,$$

$$C_{X00} = 0.13, Y = 0.3, K_s = 5.0043, \Delta = 0.1.$$

El programa permite variar el inicio y los flujos de adición volumétrica, con el propósito de obtener las mejores condiciones para el establecimiento de un CLA.

De las diferentes opciones obtenidas con el programa se optó por un CLA de las siguientes características: Un CLA constante, de velocidad de adición volumétrica de 500 (± 50) mL/h; un volumen de operación inicial de 5 L para alcanzar con la alimentación un volumen máximo de operación de 10 L.

Como medio de cultivo se empleó el medio M-25, tanto en la fase inicial del cultivo (cultivo por lote a concentración normal del medio) como en la alimentación, donde el medio tuvo un incremento en su concentración 3 veces con respecto a la composición original y sin micronutrientes. La composición final del medio M-25 para alimentación se presenta en la Tabla 9; la preparación, el tratamiento y esterilización del medio de adición se efectuó de la manera descrita para el medio normal.

El medio para la alimentación (5 L) fue colocado en un garrafón Pyrex de 8 L (Figura 8) para efectuar la adición del medio al reactor, la cual fue hecha a través de una manguera (Master flex 6411-14) y una bomba peristáltica; además se modificó otra bomba peristáltica a función prensil para evitar el bloqueo del flujo en la manguera. Durante el tiempo que duró la alimentación (aproximadamente 10 h) el medio se mantuvo con agitación mediante una barra magnética, este sistema de alimentación se esquematiza en la Figura 9.

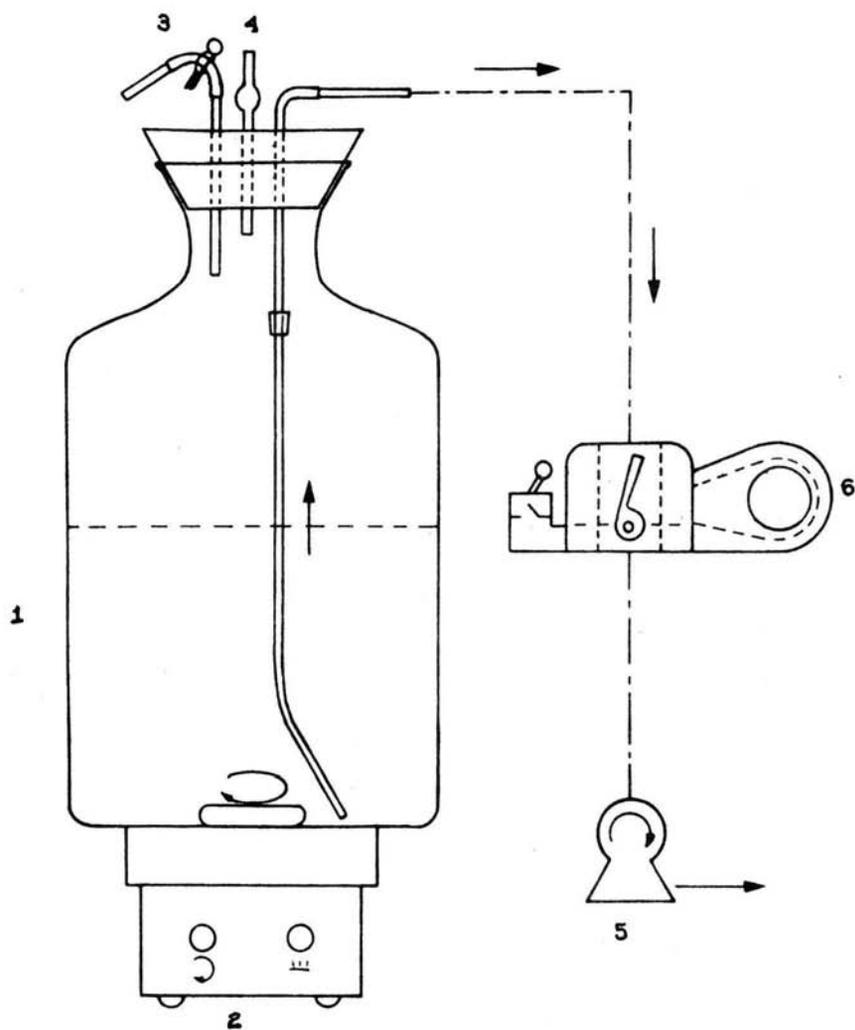


FIG. 8 : ESQUEMA DEL SISTEMA DE ALIMENTACION

- | | |
|--|--|
| 1. GARRAFON. | 4. RESPIRADERO. |
| 2. PLACA DE AGITACION. | 5. BOMBA PERISTALTICA |
| 3. CONDUCTO DE ADICION.
DE GLUCOSA. | 6. BOMBA PERISTALTICA.
(MODIFICADA A PRENSIL) |

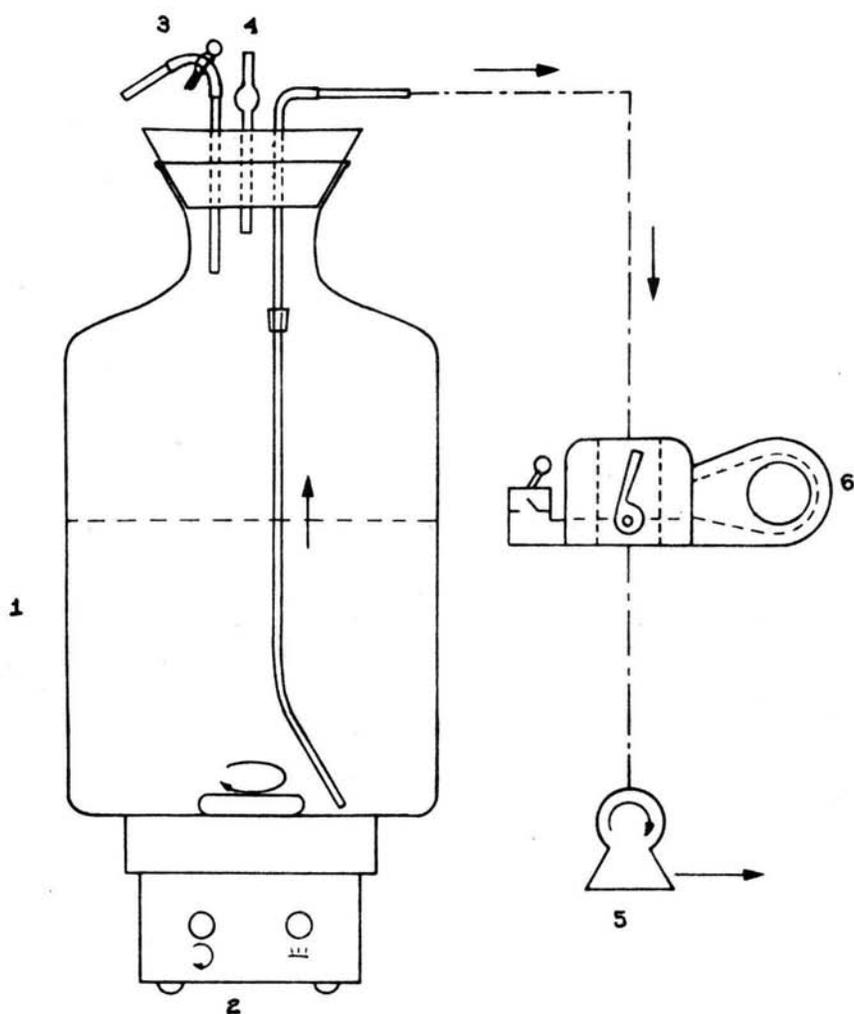


FIG. 8 : ESQUEMA DEL SISTEMA DE ALIMENTACION

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 1. GARRAFON. | 4. RESPIRADERO. |
| 2. PLACA DE AGITACION. | 5. BOMBA PERISTALTICA |
| 3. CONDUCTO DE ADICION. | 6. BOMBA PERISTALTICA. |
| DE GLUCOSA. | (MODIFICADA A PRENSIL) |

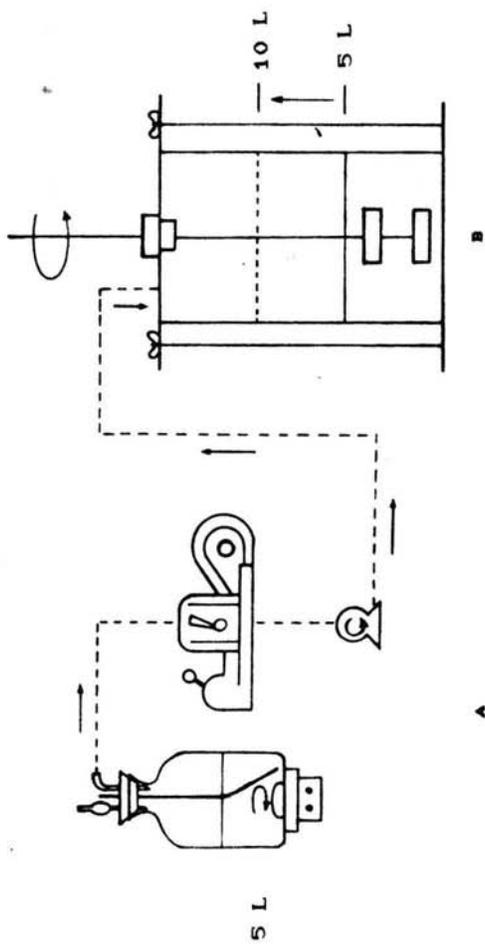


FIG. 9 : REPRESENTACION DE EL CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO.

A) SISTEMA DE ALIMENTACION

B) REACTOR DE FERMENTACION.

ALIMENTADO A UNA VELOCIDAD DE $500 \frac{1}{h}$ 50 ml/h

DESDE UN VOLUMEN INICIAL DE 5 L A UN

VOLUMEN FINAL DE 10 L.

**TABLA 9. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ALIMENTACION
HARINA DE SANGRE (M-25).**

	Harina de Sangre	36 g
A	Levadura de Cerveza	18 g
	H ₃ PO ₄ (85% v/v)	21 mL
B	Glucosa	90 g
	Agua de cocimiento de maiz	15 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	9 g
C	MgSO ₄	6 g
	KCl	4.5 g
	Agua	1000 mL

A SE SOMETE A UN TRATAMIENTO TERMICO ANTES DE MEZCLAR CON LA PARTE C PARA ESTERILIZAR.

B SE ESTERILIZA POR SEPARADO

Es importante mencionar que las condiciones de preparación y operación del fermentador con este sistema fueron las mismas que para el cultivo por lote. Al término de la alimentación se continuó el cultivo por lote, para permitir el proceso de esporulación y síntesis de la δ -endotoxina.

Las muestras para análisis se tomaron cada 4 h durante el cultivo por lote y, cada 2 h durante la alimentación.

4.7 EVALUACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano se cuantificó por Cuenta directa al microscopio. Esta evaluación se realizó en una Cámara de Neubauer (Propper 090022) y en un microscopio de contraste de fases (Zeiss, Sandor 18).

De cada muestra se realizaron diluciones apropiadas, de acuerdo con el tiempo de fermentación; la cuenta celular se efectuó a un aumento de 400x y por duplicado.

4.8 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA RESIDUAL.

Se empleó la técnica del Acido 3,5-Dinitro salicílico (DNS) descrita por Miller (50), la cual permite cuantificar el contenido de azúcares reductores presentes en el medio.

Para el análisis de las muestras se efectuaron diluciones 1:100, 1:50, 1:25 y 1:10, dependiendo de la edad del cultivo. Cada muestra fue tratada por triplicado para obtener un valor promedio.

4.9 DETERMINACION DEL PESO CELULAR PROMEDIO.

Para este ensayo se utilizó un equipo de filtración Millipore (receptáculo, fórceps y embudo) con membranas de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$. Las membranas se pusieron a peso constante colocándolas a 80°C en una estufa al vacío durante 24 h y posteriormente en un desecador al vacío otras 24 h; el peso de las membranas se determinó en balanza analítica. Todo el equipo se colocó en un matraz kitazato conectado al sistema de vacío, para efectuar la filtración.

Para hacer la determinación del peso, se efectuaron dos cultivos con la cepa GM-9 en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio CTP c/u, e incubados en agitación a 250 rpm y 30°C hasta la fase exponencial; entonces, de cada uno de los cultivos se tomó una muestra por triplicado, para realizar el conteo celular y un volumen de 10 mL (también por triplicado) que se filtró sobre la membrana.

Las membranas con el filtrado celular se colocaron nuevamente a peso constante. El peso promedio de la bacteria se obtuvo dividiendo el peso obtenido entre el número de bacterias contenido en el mismo volumen.

4.10 DETERMINACION DEL RENDIMIENTO (Y_x/B)

La valoración de este parámetro sólo se efectuó en los cultivos realizados en el fermentador.

El rendimiento (Y_x/s) indica la cantidad de células producidas en relación a la cantidad de sustrato que se utiliza (44) y se calcula mediante la siguiente expresión (49):

g de células obtenidas

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g de células obtenidas}}{\text{g de sustrato consumido}}$$

Para determinar los gramos de células obtenidos en las fermentaciones, se utilizó el peso promedio obtenido, en relación al número de bacterias resultantes de estas corridas.

4.11 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE SATURACION (K_s) Y VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO MAXIMA (μ_{max}).

La determinación de la K_s de *B. thuringiensis* para glucosa, se realizó con base en el modelo de crecimiento establecido por Monod (49), relacionando la velocidad específica de crecimiento instantánea (μ) con la concentración de sustrato residual en la parte cercana a la fase estacionaria de crecimiento, de un cultivo por lote. En este caso se utilizó la última fermentación de la cepa GM-9.

A partir de esta cinética de crecimiento, se obtuvieron datos teóricos del número de células y concentración de sustrato a diferentes tiempos. Con estos datos se establecieron dos matrices:

[t] : VALORES DE TIEMPO
[X] ó [S] : VALORES DE NUMERO DE CELULAS ó
VALORES DE CONCENTRACION DE
AZUCARES REDUCTORES.

Por medio de una calculadora programable (Ti 58C/59), se efectuaron las operaciones matriciales correspondientes, para obtener una ecuación polinomial de tercer orden para

relacionar tanto X y S con t :

$$S = at^0 + a_1t^1 + a_2t^2 + a_3t^3$$

Donde :

S = valor para X O S a un tiempo dado

a = valor del coeficiente (num. cel. /ml o g/L)

t = tiempo

La ecuación polinomial para X, se derivó con respecto al tiempo que al ser dividida por X se obtiene la μ instantánea. Este valor y la concentración de sustrato residual correspondiente, se determinaron en el intervalo que dura la fase exponencial de crecimiento (13 a 28 h); los resultados se graficaron por el sistema de recíprocos ($1/\mu$ vs $1/[S]$), ajustándose la recta por regresión lineal, para obtener los valores de $\mu_{\text{máx}}$ y K_s .

4.12 RECUPERACION Y SECADO DEL PRODUCTO.

El sistema de obtención del producto (complejo espora-cristal) se hizo mediante la técnica de Coprecipitación de lactosa y acetona, establecida por Dulmage (27), la cual se describe en la Figura 10.

El secado del producto se efectuó en estufa al vacío a 40°C durante 24 h, después se colocó en un desecador al vacío por 24 h a temperatura ambiente para completar el secado.

El producto seco fue molido en mortero, hasta obtener partículas finas; este polvo fue guardado en bolsas de polietileno y refrigerado a 4°C hasta su envío, para pruebas biológicas, a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

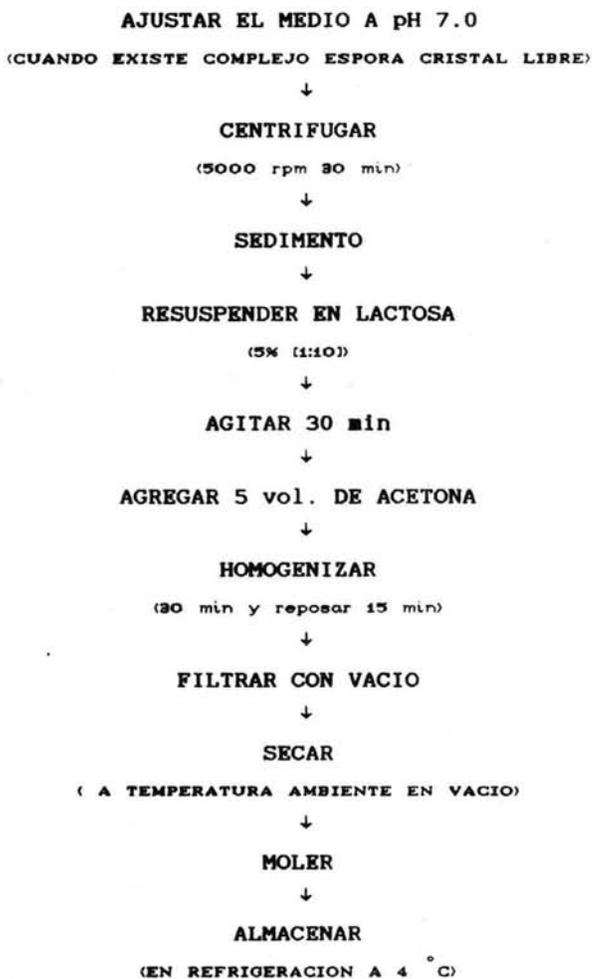


FIG. 10. DIAGRAMA DE RECUPERACION Y SECADO DEL PRODUCTO
(27)

4.13 BIOENSAYOS.

Las pruebas biológicas de los productos se efectuaron en la UANL, utilizando como insectos prueba a larvas de lepidópteros (*Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* y *Trichoplusia ni*) y dípteros (*Aedes aegypti*).

Los bioensayos se realizaron en diluciones seriadas de las muestras, para alcanzar una dosis de prueba de 500 µg/mL, utilizando un regulador de fosfatos (pH 7.0).

Cada dilución se incorporó y homogenizó a una dieta artificial, en porciones de 1 parte de dilución por 50 partes de dieta.

El homogenizado de cada dilución se transfirió a recipientes plásticos (volumen de 3/4 de onza); 25 copas plásticas fueron utilizadas por dilución. Posteriormente, mediante el uso de pinceles de cerdas finas, en cada una de las copas se puso una larva. En las muestras control, únicamente se incorporó a la dieta la solución reguladora.

Los recipientes con larvas fueron colocados en incubadora a 30°C con una humedad relativa del 50%. Después de 7 días de incubación, se realizó el conteo de larvas muertas para cada dilución y se registró el porcentaje de mortalidad para cada una de las diluciones.

v RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 FERMENTACION POR LOTE EN MATRAZ.

Las cinéticas de crecimiento, obtenidas de las fermentaciones por lote en matraz de cada una de las cepas en los dos medios de fermentación (M-25 y MHS), se presentan en las Figuras 11 a 15 para las cepas pertenecientes al grupo I las Figuras 16 a 21 para las del grupo II.

En ambos grupos de estudio hubo un mejor crecimiento en el medio M-25 , en comparación con el medio MHS. En el grupo I se registraron buenos crecimientos en ambos medios de fermentación; también en este primer grupo de ensayo se obtuvieron las cepas que registraron el máximo crecimiento poblacional de todas las cepas probadas, siendo las cepas GM-9 y GM-10. En el medio MHS, la cepa GM-9 tuvo un crecimiento de 1.7×10^8 cel/mL y la cepa GM-10 alcanzó un crecimiento de 2.0×10^8 cel/mL; estas mismas cepas tuvieron crecimientos del orden de 2.8×10^8 y 2.7×10^8 cel/mL respectivamente ,en el medio M-25.

En el segundo grupo de estudio, todas las cepas, tuvieron crecimientos bajos; sin embargo las cepas GM-34 (Figura 17) y GM-49 (Figura 18) en el medio M-25, tuvieron concentraciones de 1.78×10^8 y 1.7×10^8 cel/mL, respectivamente. En el medio MHS el valor más alto del grupo, fue del orden de 1.0×10^8 cel/mL, para la cepa GM-34

Las diferencias de crecimiento observadas entre los grupos se debe, probablemente, al hecho de que pertenecen a diferentes variedades. El grupo I está compuesto en su totalidad por cepas de la variedad *colmeri* y el grupo II por las variedades *kurstaki*, *aizawai* y *tolworthi*. Esta sugerencia se apoya en los estudios de varios autores (24,58) quienes, trabajando cada uno de ellos con un medio de cultivo y diferentes variedades de la

bacteria, encontraron diversos valores en el crecimiento. Concluyendo, entonces, que la variedad de la especie en estudio influye en la capacidad de crecimiento del microorganismo.

En relación a los medios de cultivo empleados, algunos investigadores (6,55,57) han demostrado que *B. thuringiensis* mejora sustancialmente su crecimiento, cuando a medios definidos de glucosa y sales minerales se les añade extracto de levadura, peptona de carne o hidrolizados de caseína, es decir componentes de nitrógeno aminado.

Las investigaciones efectuadas por Salama (67), al diseñar un medio a base de glucosa, extracto de levadura y derivados nitrogenados de origen animal (harina de pescado, harina de sangre y algunos otros), señalan la obtención de valores significativos de concentración de esporas y actividad biológica, lo que permite concluir al autor que este tipo de medios son los óptimos para el cultivo de *B. thuringiensis*. Resultados similares son reportados por De Urquijo (25), quien confirmó además las consideraciones hechas por Rogoff (62), investigador que determinó la existencia de un mejor crecimiento y esporulación de la bacteria, en aquellos medios que contienen como fuente de nitrógeno, proteínas hidrolizadas; conclusiones similares fueron obtenidas en las investigaciones realizadas por Bailón y col. (8), obteniendo un crecimiento importante del serotipo H-14 (*israelensis*), cuando empleó harina de soya hidrolizada en sus medios de cultivo.

En nuestro caso, aún cuando se ocuparon medios de cultivo complejos, se obtuvieron mejores crecimientos en el medio M-25 que en el medio MHS; probablemente debido a que el primero está constituido por componentes (glucosa e hidrolizados de fuente de nitrógeno) que pueden favorecer el crecimiento y esporulación. En tanto el medio MHS, aunque sus componentes son adecuados

(melazas y harina soya), no permitieron un buen crecimiento de la bacteria. Por lo que se sugiere, para obtener un mejor crecimiento con este medio, hidrolizar sus fuentes de nitrógeno y carbono y/o combinarlas con otros componentes.

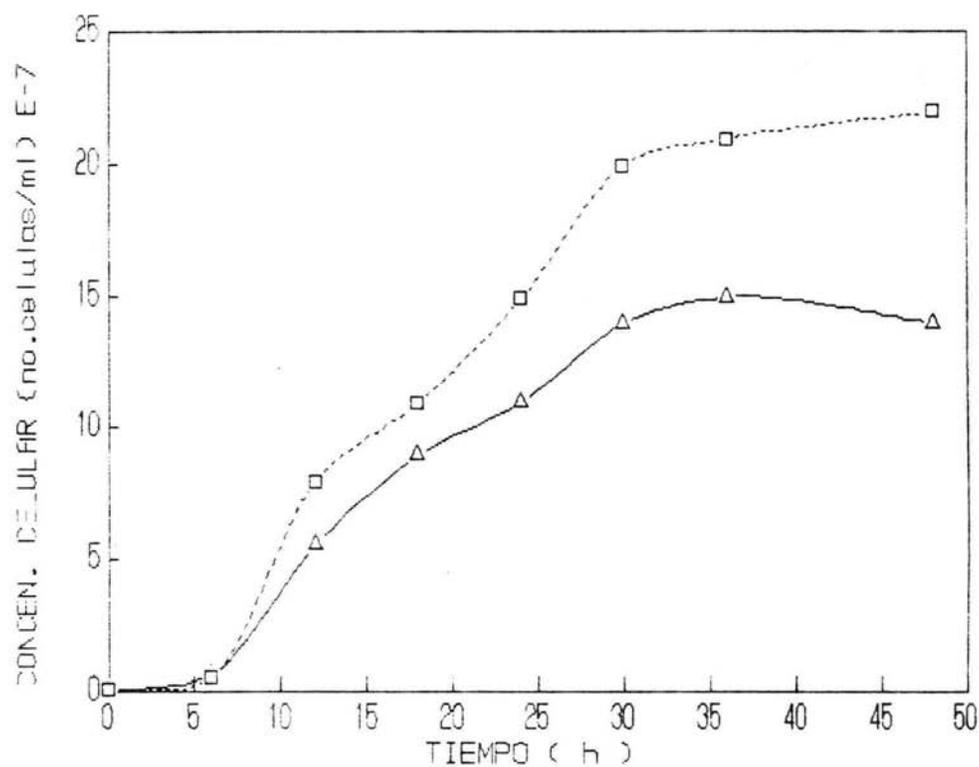


Fig. 11 . Crecimiento de la cepa GM - 1.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

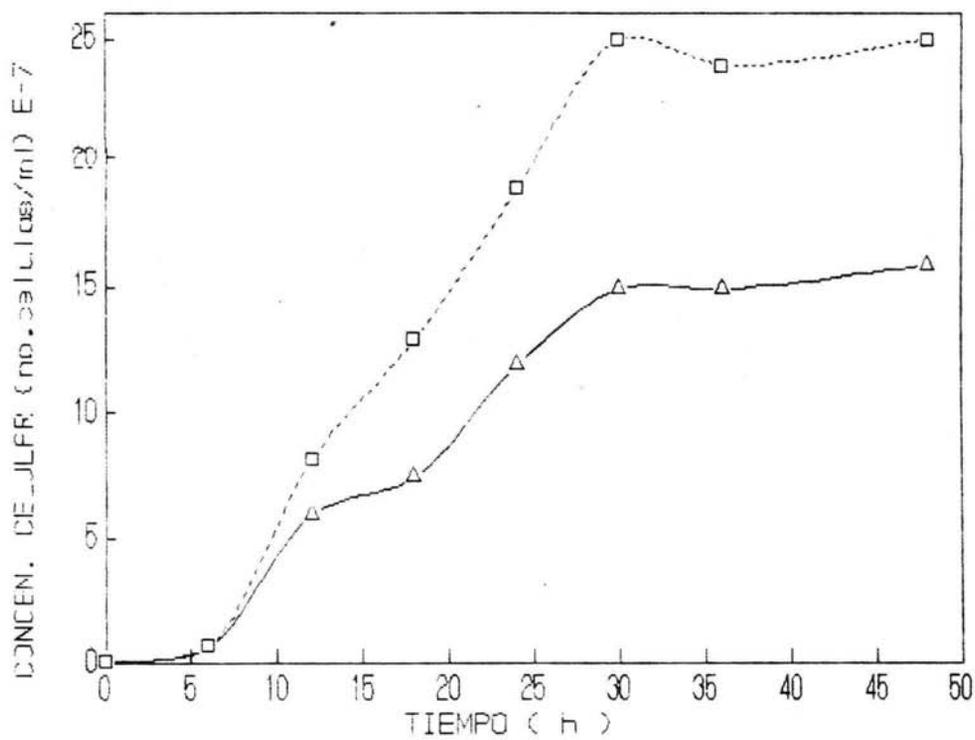


Fig. 12 . Crecimiento de la cepa GM - 8.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

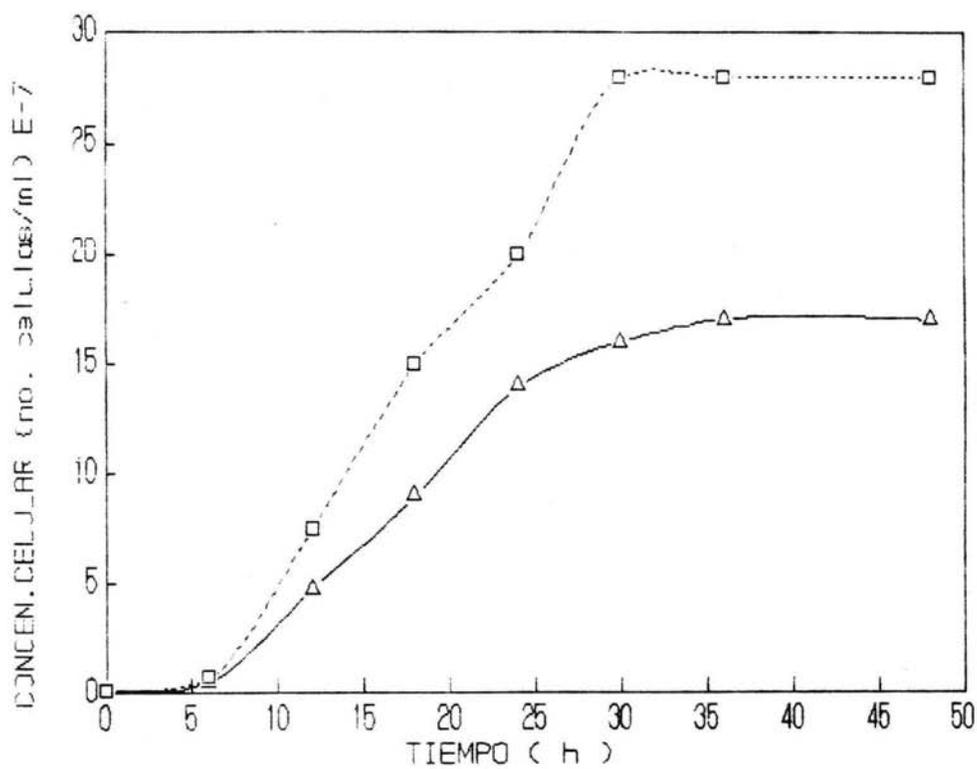


Fig. 13 . Crecimiento de la cepa GM - 9.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

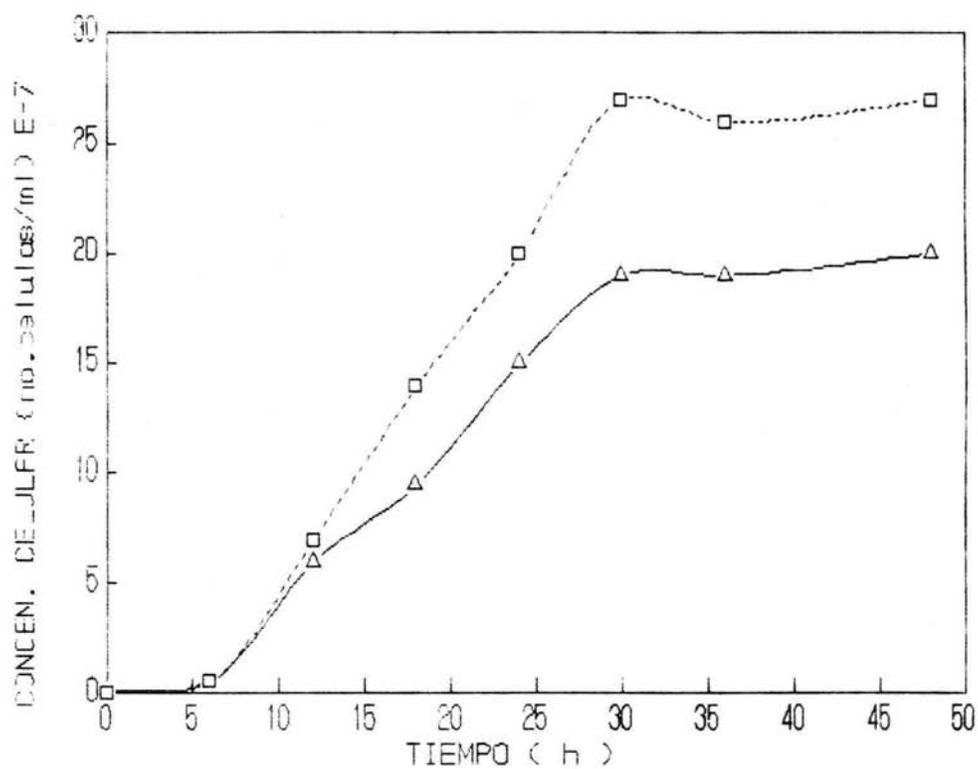


Fig. 14 . Crecimiento de la cepa GM - 10.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

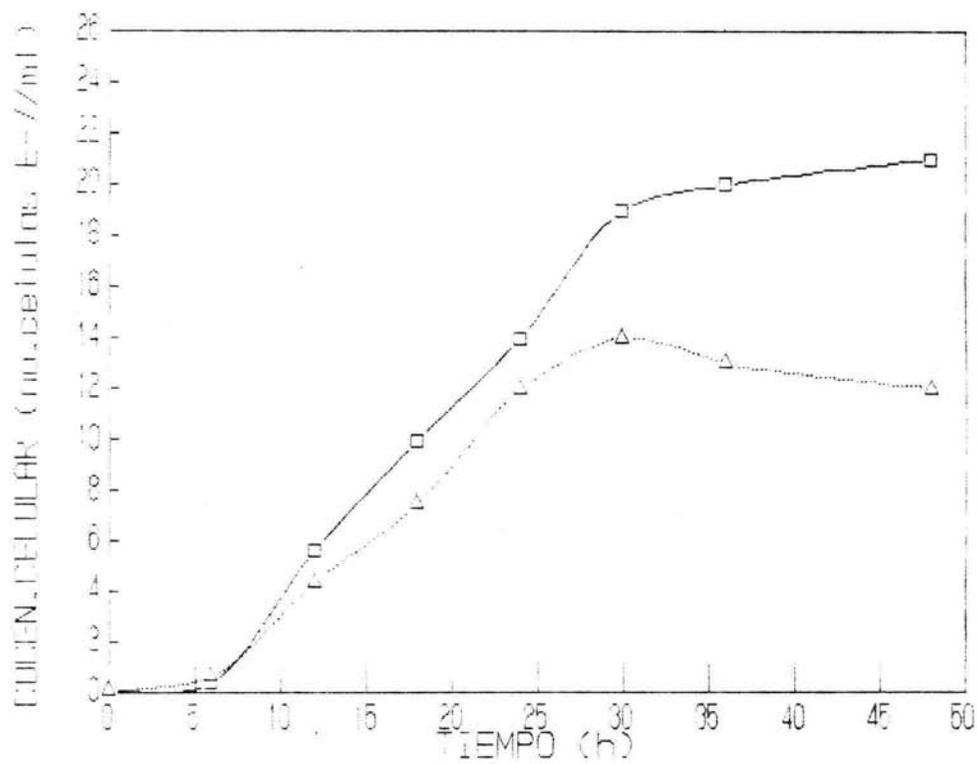


Fig. 15 . Crecimiento de la cepa GM - 11.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

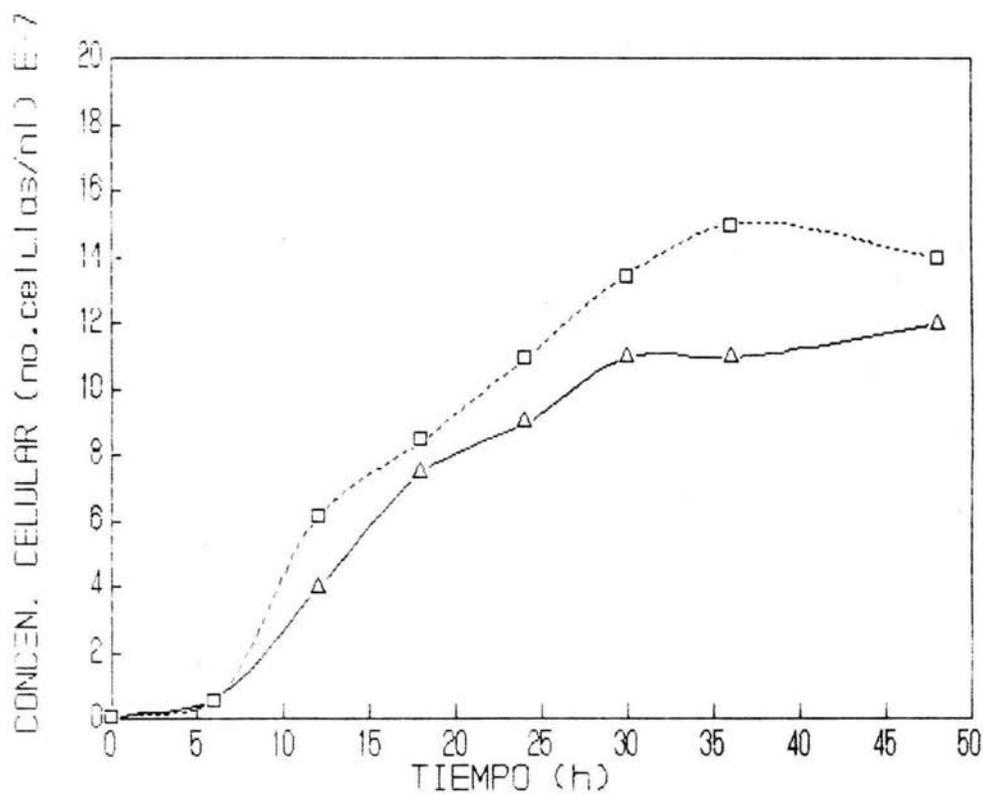


Fig. 16 . Crecimiento de la cepa GM - 23.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

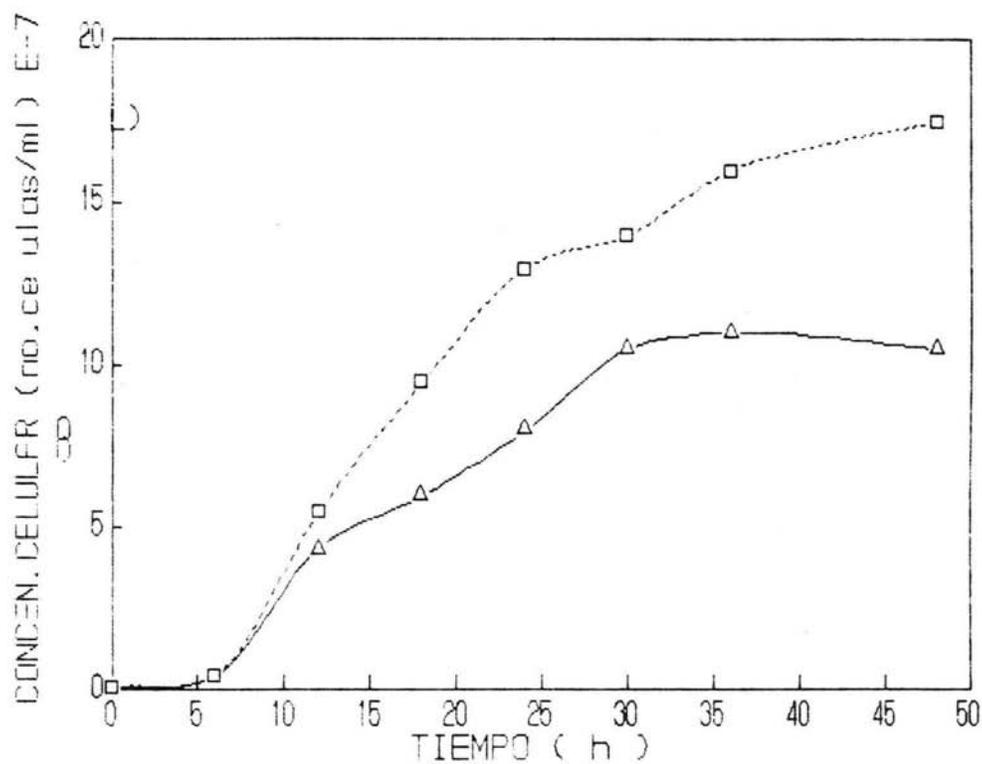


Fig. 17 . Crecimiento de la cepa GM - 34.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

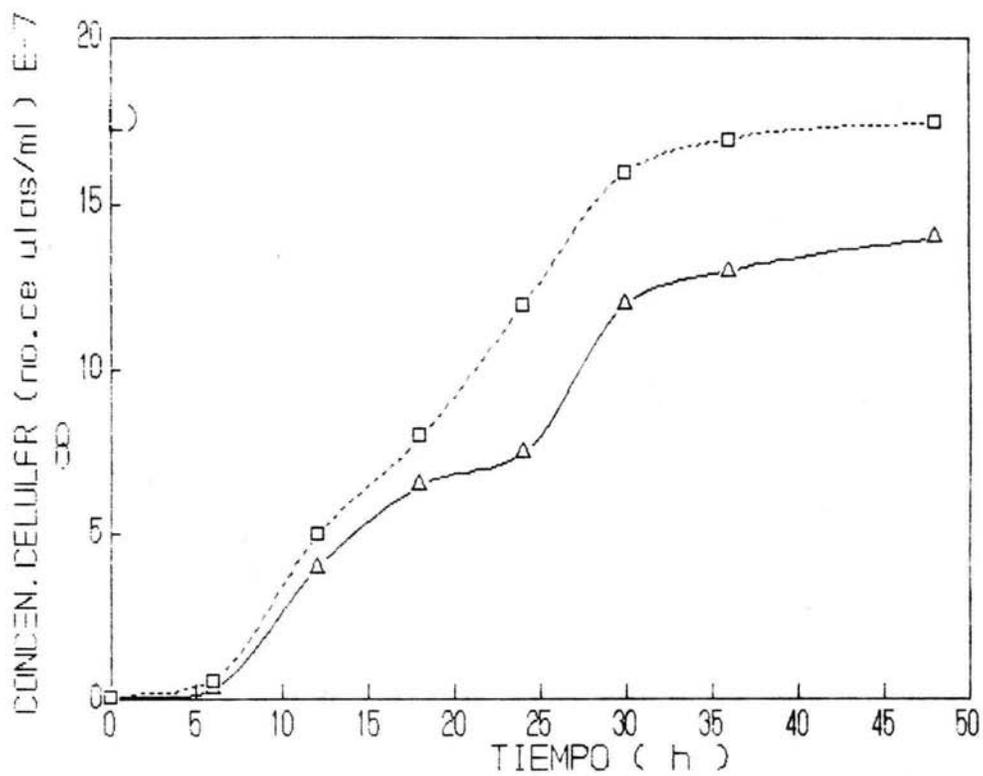


Fig. 18 . Crecimiento de la cepa GM - 49.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

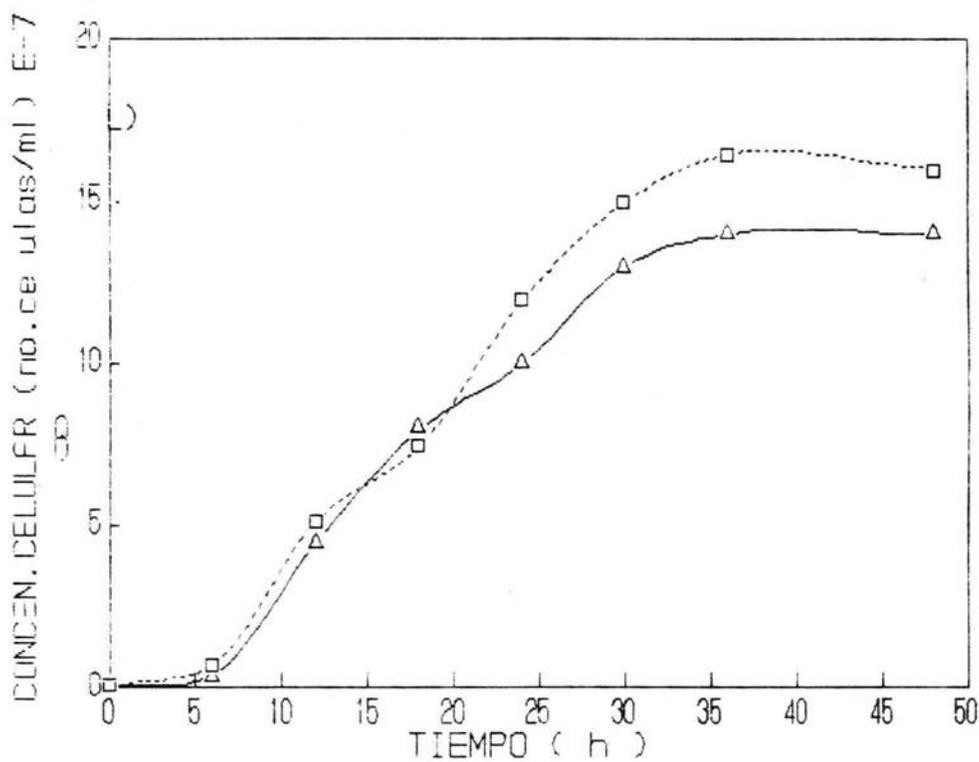


Fig. 19 . Crecimiento de la cepa GM - 50.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

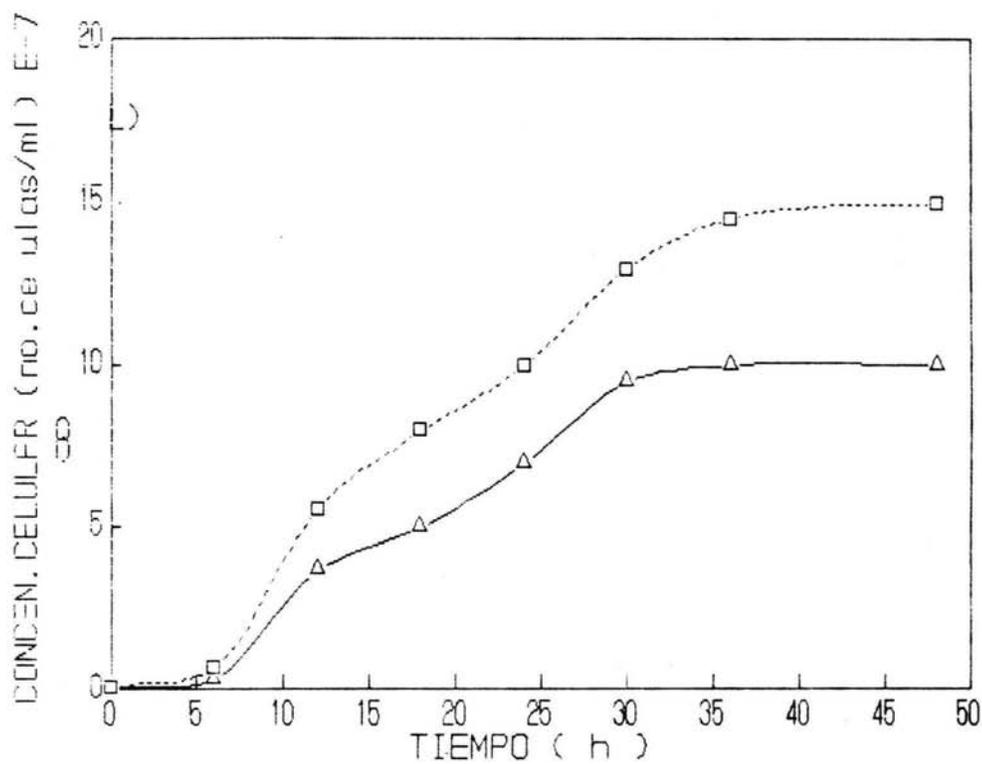


Fig. 20 . Crecimiento de la cepa GM - 59.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

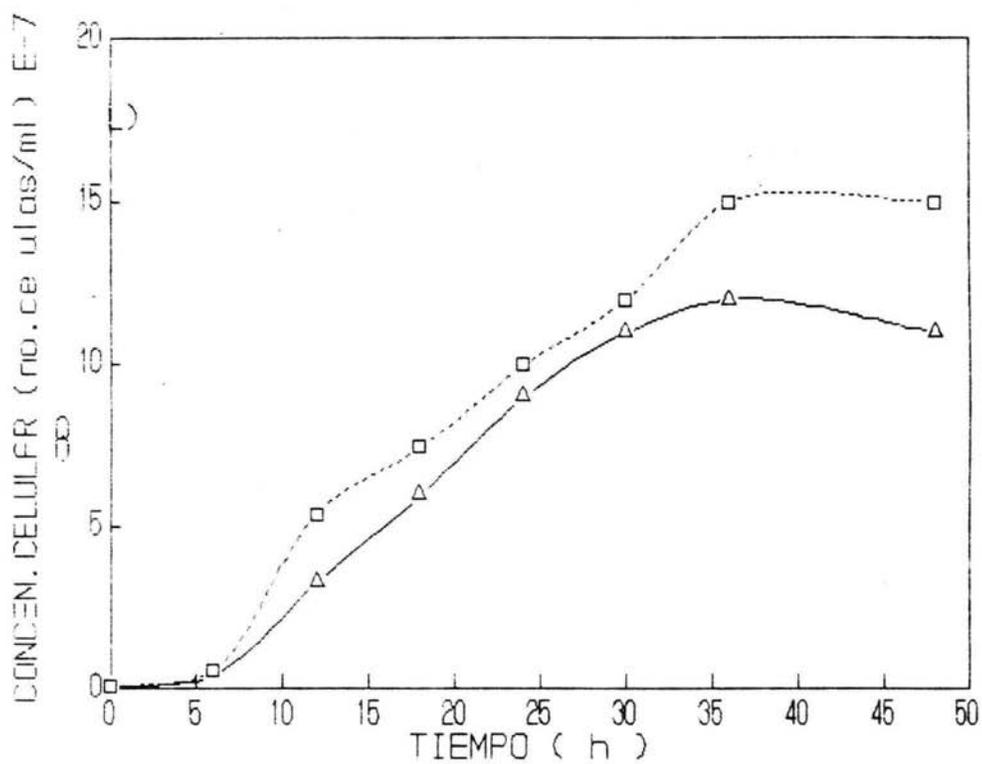


Fig. 21 . Crecimiento de la cepa GM - 60.

(Δ) Medio MHS, (\square) MEDIO M - 25.

5.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

(PRODUCTO DE FERMENTACION EN MATRAZ)

Los resultados de la actividad biológica del producto obtenido al realizar los cultivos por lote en matraz se presentan en la Tabla 10 (para el grupo I) y en la Tabla 11 (para el grupo II). La dosis de prueba, en todos los casos, fue de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los productos de las cepas del grupo I cultivados en M-25 mostraron el mayor efecto de muerte contra *Spodoptera frugiperda*. Siendo las cepas GM-9 y GM-10 las que registraron los valores más altos con 60 y 58% respectivamente; la cepa GM-8 presentó el menor porcentaje de mortalidad en este medio (46 %). Los productos obtenidos en el medio MHS con este mismo grupo de cepas, dieron una menor mortalidad con valores del 36% al 50%; correspondiendo la más alta actividad insecticida (50%) a la cepa GM-10.

En general, las cepas del grupo II presentaron un menor porcentaje de actividad, como se puede observar en la Tabla 11. Los productos de de las cepas GM-23 y GM-34 resultantes de la fermentación tanto, en M-25 como en MHS, tuvieron un efecto nulo sobre el insecto prueba *Aedes aegypti*. Este insecto fue incluido en el estudio, debido a informes de la UANL, que indicaban que esta cepas habían mostrado cierta acción contra este díptero; sin embargo el que el producto haya resultado inefectivo, resulta de alguna manera lógico, ya que se ha reportado que las variedades *aizawai* (GM-23) y *kurstaki* (GM-34), son efectivas preferentemente contra lepidópteros y no contra dípteros (40,68,72).

TABLA 10. Actividad Biológica del producto de fermentación en matraz de las cepas de *Bacillus thuringiensis* del grupo I.

CEPA	% MORTALIDAD	
	1	2
GM 1	46	38
GM 8	46	36
GM 9	60	48
GM 10	58	50
GM 11	50	43

Insecto Prueba : *Spodoptera frugiperda*

Dosis de muestra: 500 µg/mL .

1 Medio de fermentación M-25.

2 Medio de fermentación MHS.

Las cepas restantes del grupo II probadas contra *Trichoplusia ni*, mostraron actividades bajas (10 - 20%), únicamente el producto de la cepa GM-49 obtenido en el medio M-25, alcanzó el 50% de actividad insecticida (Tabla 11b). Además los productos de estas cepas, probados a dosis menores de 450 $\mu\text{g/mL}$, fueron atóxicos.

Los diferentes comportamientos de las cepas de los grupos I y II en relación a su actividad insecticida contra las diferentes larvas de insecto, pueden explicarse considerando diversos factores, por ejemplo: la variedad y los aspectos nutricionales de la bacteria, el medio de cultivo en el que se desarrolló y por otro lado la sensibilidad de los insectos a los productos de cada uno de los aislados bacterianos. Se ha informado por diversos autores (18,38,57,58,70,72), que todos estos factores intervienen en la calidad y actividad de la δ -endotoxina producida por el microorganismo.

Sánchez (66) probó la toxicidad de diferentes aislados nativos contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, encontrando que las cepas GM-1, GM-8, GM-9, GM-10 y GM-11 tuvieron las actividades insecticidas más altas (40% al 100%). A su vez Castro (20) reporta en su trabajo las actividades insecticidas de las cepas GM-8 y GM-10 probados en medios a base de melazas y contra el mismo insecto, del 68% y 100% respectivamente.

Los resultados de las actividades insecticidas obtenidas en el presente trabajo muestran diferencias, con respecto a los trabajos mencionados en el párrafo anterior. Estas diferencias pueden explicarse, tomando en cuenta que los medios de cultivo empleados son diferentes así como las condiciones utilizadas que, si bien son similares, no son iguales.

TABLA 11. Actividad Biológica del producto de fermentación en matraz de las cepas de *Bacillus thuringiensis* del grupo II.

11a. Insecto Prueba : *Aedes aegypti*.

Cepa	% Mortalidad	
	1	2
GM 23	0	0
GM 34	0	0

11b.* Insecto Pueba : *Trichoplusia ni*

GM 49	50	30
GM 50	20	10
GM 59	10	10
GM 60	10	10

Dosis : 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1. Medio de Fermentación M-25.

2. Medio de Fermentación MHS.

* Muestras atóxicas (0 % de mortalidad), en concentraciones menores de 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.3 DETERMINACION DEL PESO PROMEDIO BACTERIANO.

Para determinar este valor, se ocupó a la cepa GM-9 como modelo, ésta fue crecida en medio CTP, para evitar interferencias por parte de la gran cantidad de sólidos en suspensión, que se encuentran en el medio de fermentación M-25. La masa promedio del microorganismo se obtuvo considerando la relación entre el peso de un volumen de cultivo con el número de bacterias encontradas en éste. El valor obtenido para el peso bacteriano promedio fue de 6.85×10^{-12} g.

Mandelstam (48) da un valor para el peso bacteriano de 2.5×10^{-13} g; Rose (63) reporta en sus estudios de centrifugación (diferencial y en gradiente) un valor de 1.5×10^{-11} g, a su vez Brock (15), establece que el peso seco de una célula procariótica, fluctúa entre 10^{-15} a 10^{-11} g. Como se puede apreciar, no existe ningún valor específico para el peso de una célula bacteriana ; sin embargo, consideramos que el valor encontrado, es válido ya que se encuentra entre los límites establecidos.

5.4 CULTIVO POR LOTE (REACTOR DE 14 L.).

Para estas corridas se utilizaron las cepas que presentaron una mayor actividad biológica y mejor crecimiento a nivel de matraz, así como el medio de fermentación donde se obtuvieron estas cualidades; por lo tanto se eligieron las cepas GM-9, GM-10 y el medio M-25.

El seguimiento del cultivo así como el manejo del reactor, se llevó a cabo conforme se indica en la sección de metodología. Las cinéticas de crecimiento obtenidas para la cepa GM-10 se presentan en las Figuras 22 y 23, para la cepa GM-9 en las Figuras 24 y 25.

El comportamiento cinético de las cepas fue similar, a excepción del primer cultivo de la cepa GM-9 donde se registró la mínima concentración celular, que fue de 1.16×10^9 cel/mL; éste resultado puede atribuirse a fallas en el manejo del sistema, ya que los experimentos posteriores dieron mayores concentraciones celulares. En el siguiente cultivo de esta misma cepa se obtuvo un valor de 1.77×10^9 cel/mL y en los crecimientos de la cepa GM-10, se encontró un valor en promedio de 2.47×10^9 cel/mL.

Los cultivos alcanzaron estas magnitudes y el 90% de esporulación en aproximadamente 35 h ; el alcanzar este porcentaje de esporulación en ese tiempo se considera aceptable, en relación a trabajos similares (6).

La velocidad específica de crecimiento (μ) para los cultivos, se determinó a partir de la pendiente de la curva de crecimiento al graficar el logaritmo natural (\ln) de la concentración celular (cel/ml) contra la edad del cultivo (h) ,

las μ obtenidas para las diferentes cepas son similares, pues todas se encontraron en un intervalo de .18 a .19 h^{-1} .

Existen algunos reportes de μ para *B. thuringiensis* HD-1 (*kurstaki*) bajo condiciones similares, en los que el valor promedio obtenido es de 0.3 h^{-1} (35); es decir, la tasa de crecimiento de estas cepas nativas es menor al de una cepa estandar.

En cuanto al consumo de la fuente de carbono se encontró que es total, ya que la concentración de sustrato residual al término del cultivo, fue en promedio de 0.0275 g/L.

En relación al rendimiento (Y_x/s) de los cultivos por lote se obtuvo en promedio, un valor de 0.33 g/g para la cepa GM-9 y de 0.54 g/g cepa GM-10. En la literatura se han informado rendimientos de 0.30 y 0.40 g/g (43); sin embargo no podemos realizar una comparación válida con nuestros resultados, dado que en aquellos trabajos no se indica la manera o el factor utilizado para realizar la determinación.

Al comparar las cinéticas de crecimiento de las cepas GM-9 y GM-10 y algunas efectuadas con cepas estandar como la HD-73 (*kurstaki*), en el mismo medio (25) y la cepa H-14 (*israelensis*) crecida en medios con fuentes nitrogenadas (8), puede decirse que tienen características similares en relación al tiempo promedio de fermentación, 30 h en las cepas estandar y 35 h para las empleadas en este trabajo. En relación a la concentración celular al final del tiempo de fermentación, las cepas estandar registran concentraciones de aproximadamente 4×10^9 cel/mL y los valores máximos obtenidos en este trabajo son de 1.14 a 1.5×10^9 cel/mL, es decir la capacidad de crecimiento de las cepas nativas, es casi tres veces menor que la de las cepas estandar.

CULTIVO POR LOTE

CEPA GM-10

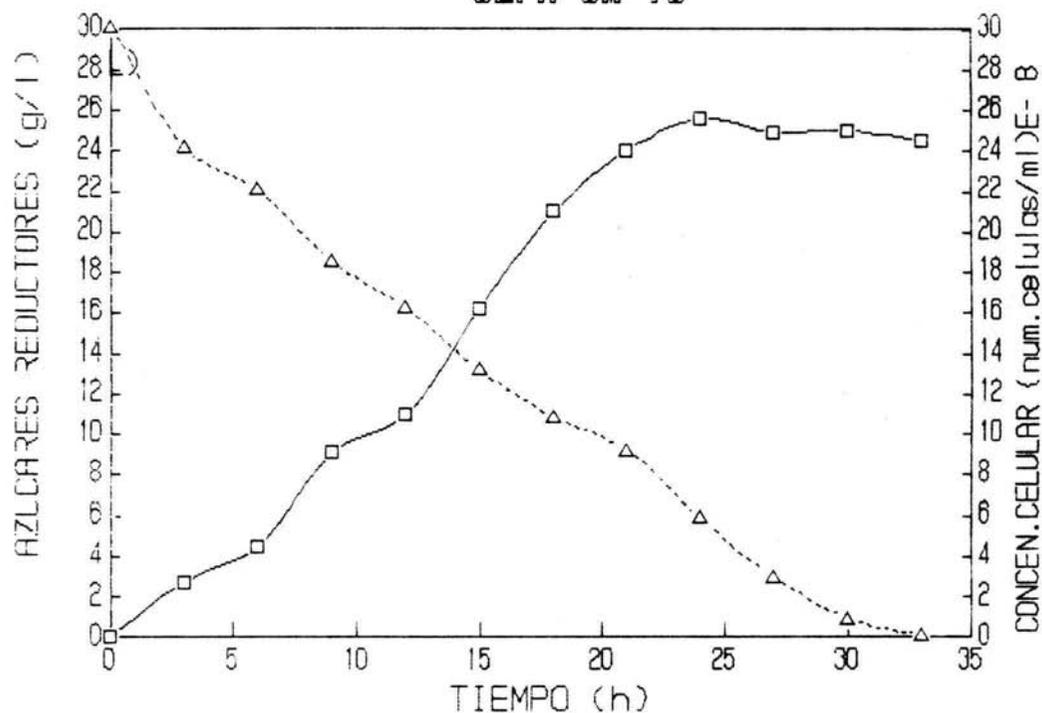


FIG. 22 . Cinetica de crecimiento de la cepa GM - 10,
de cultivo por lote en reactor de 14 L.
($\mu = 0.19 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.53 \text{ g/g}$)

CULTIVO POR LOTE

CEPA GM-10

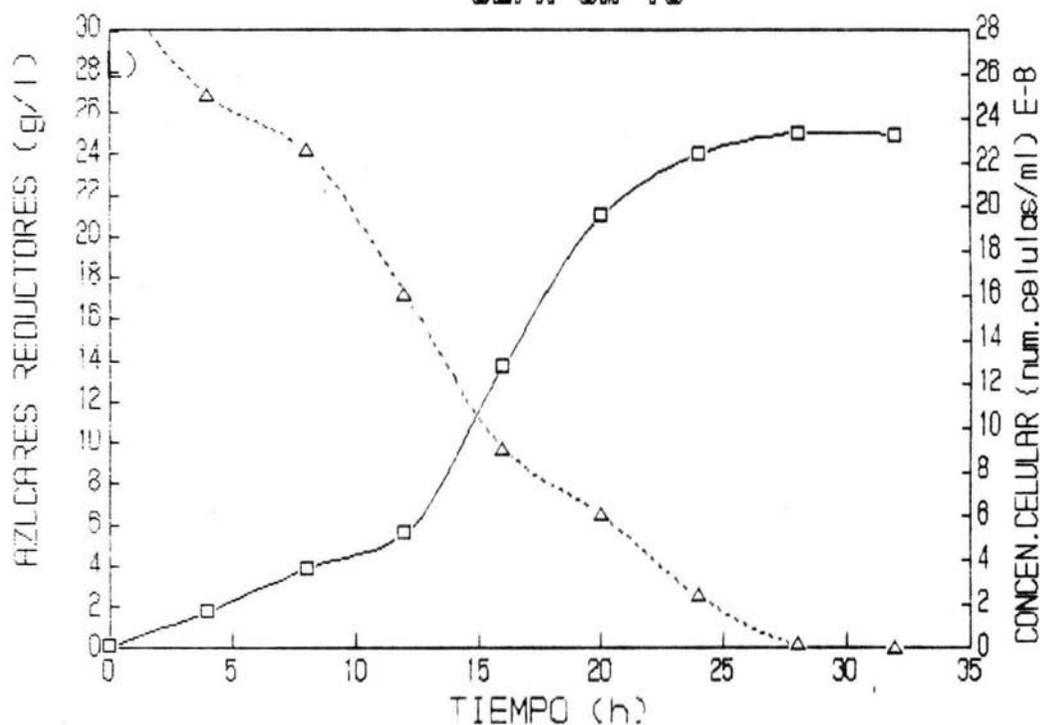


FIG. 23 . Cinetica de crecimiento de la cepa GM - 10,
de cultivo por lote en reactor de 14 L.
($\mu = 0.19 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.55 \text{ g/g}$)

CULTIVO POR LOTE

CEPA GM-9

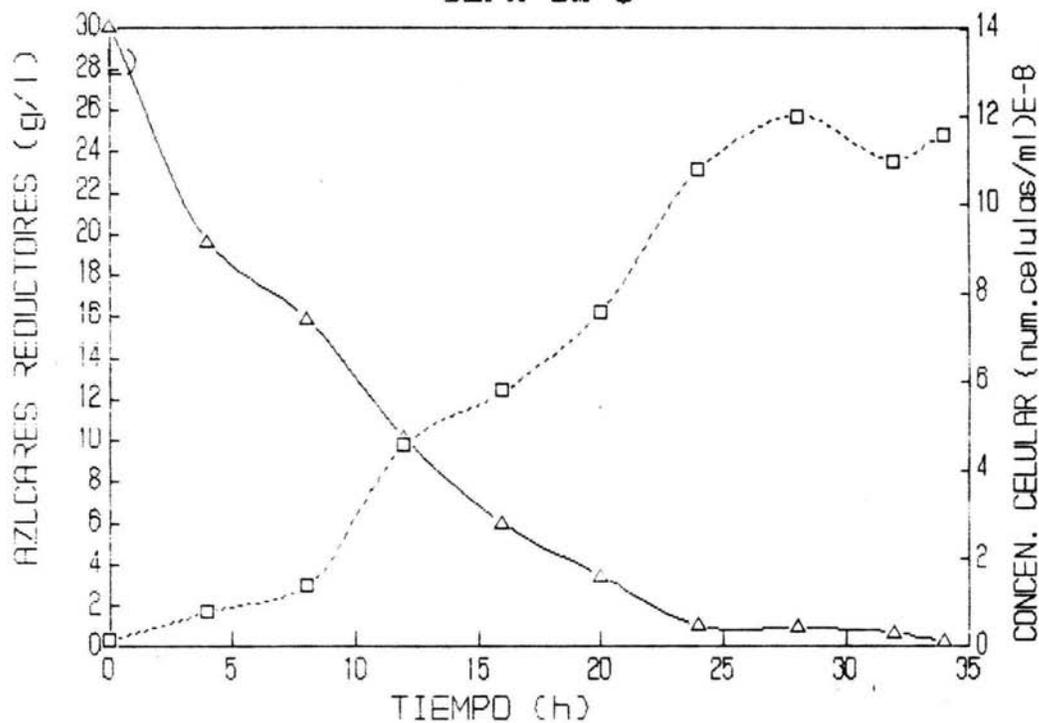


FIG. 24 . Cinética de crecimiento de la cepa GM - 9,
de cultivo por lote en reactor de 14 L.
($\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.26 \text{ g/g}$)

CULTIVO POR LOTE

CEPA GM-9

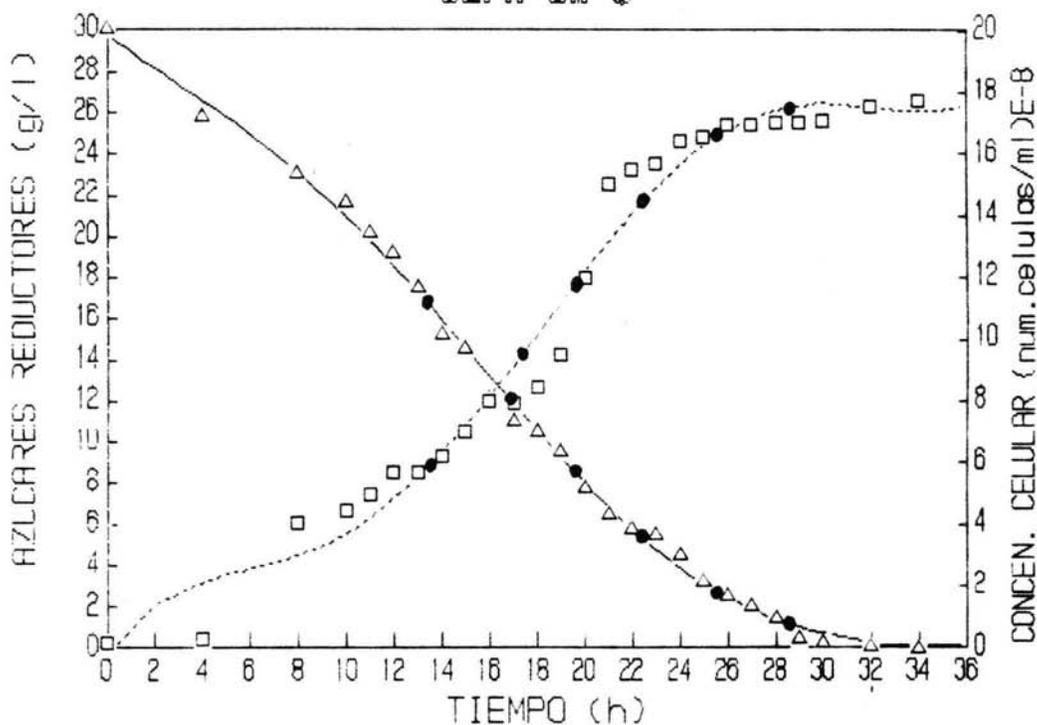


FIG. 25 . Cinetica de cultivo por lote en reactor de 14 L de la cepa GM - 9, ajustada para la obtencion de datos teoricos para el calculo de los parametros de μ_{max} y K_s .

● Puntos utilizados del ajuste.

5.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

(PRODUCTO DE FERMENTACION EN REACTOR)

Las pruebas de capacidad insecticida para los productos obtenidos en los cultivos por lote, de las cepas GM-9 y GM-10, se efectuaron utilizando como insecto prueba a *Trichoplusia ni*, con dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados de estas actividades se registran en la Tabla 12; como se observa el producto de la cepa GM-10 presenta mayor actividad con respecto al primer bioensayo, este valor obtenido de 100%, es un resultado aceptable para cualquier cepa.

TABLA 12. Actividad Biológica de cepas de *Bacillus thuringiensis*.
Producto de Cultivo por Lote en Reactor de 14 L.

Cepa	% Mortalidad
GM 9	60
GM 10	100

Insecto Prueba : *Trichoplusia ni*.

Dosis : 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Por otra parte el producto de la cepa GM-9 presentó el mismo nivel de actividad biológica, que el registrado por el producto obtenido por fermentación en matraz (60%); sin embargo estos datos deben tomarse con reserva, dado que el organismo

blanco utilizado en este ensayo, es diferente al empleado en la primera determinación (*Spodoptera frugiperda*), pues se ha establecido que los insectos que son afectados por este microorganismo, tienen diferente sensibilidad a un mismo producto (71,72, 74), aún cuando pertenezcan al mismo orden de insecto; como en este caso, que pertenecen al orden lepidóptera.

**5.6 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE SATURACION (K_S)
Y LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO MAXIMA
(μ_{max})**

Para efectuar la determinación de estos parámetros, se realizó, en primer lugar el ajuste de los datos cinéticos obtenidos durante el cultivo por lote de la cepa GM-9 (Figura 25); de las curvas ajustadas se tomaron algunos puntos, los cuales se presentan a continuación:

t	X	S
tiempo (h)	No. de células (10 ⁸ cel/mL)	Sustrato residual (g/L)
13.2	5.3	10.0
17.3	9.3	5.3
20.0	12.1	3.25
22.7	15.3	1.88
25.7	17.0	0.75
28.2	17.3	0.25

A partir de éstos datos y por tratamiento matricial se estableció la ecuación polinomial de tercer orden que relacionó a las variables: núm. de células (X) y concentración de sustrato residual (S) con tiempo (t); obteniéndose los siguientes valores, para cada una de las variables:

No. de células	Sustrato
a = 24.4098095	a = 44.97339765
a ₁ = -4.4865875	a ₁ = -4.125083675
a ₂ = 0.301503833	a ₂ = 0.1312598668
a ₃ = -0.00534	a ₃ = -0.0014591296

Para comprobar que la ecuación obtenida representaba la cinética de crecimiento de la bacteria, se sustituyeron los valores de los coeficientes de la ecuación, mostrados en el cuadro anterior, obteniéndose los siguientes datos:

t	X	S
13	5.30019632	10.3241959
17	9.022879932	5.612372904
20	12.5365869	3.30263401
22	14.74180029	2.214520284
25	17.2025885	1.08482245
28	17.87756445	0.347977258

Como se observa existe similitud entre los valores calculados mediante la ecuación y los valores obtenidos por el ajuste, lo que nos permitió establecer que el ajuste fue adecuado y que representaba adecuadamente la cinética de crecimiento. Una vez hecha esta comprobación y la derivación de la ecuación que relaciona a X con t, se calcularon los valores de μ instantánea y su S correspondiente, que fueron estimados desde las 13 hasta

las 26 h. Estos valores se graficaron de manera semejante al modelo de Lineaweaver-Burk, para cinética enzimática (Figura 26). De esta gráfica se obtuvieron los valores de $\mu_{\text{máx}}$, y K_s para glucosa, tomando en cuenta la pendiente y la ordenada al origen de la gráfica. Como se indica a continuación:

$$m = 23.538 = k_s/\mu_{\text{máx}} \quad \therefore K_s = 5.6043 \text{ g/L}$$

$$b = 4.2 = 1/\mu_{\text{máx}} \quad \therefore \mu_{\text{máx}} = 0.238 \text{ h}^{-1}$$

Al investigar los valores de estos parámetros, en la literatura, encontramos los datos reportados por Bailón (8), quién reporta un valor de $\mu_{\text{máx}}$ de 0.246 h^{-1} y de K_s de 7.6019 g/L , para la cepa H-14 (*israelensis*). Sin embargo estos datos fueron obtenidos en un medio a base de melazas, por lo que no se puede efectuar una comparación completa, ya que es un sustrato diferente al empleado en nuestra experimentación. Pero podemos observar que existen similitudes en los valores, sobre todo para la tasa máxima de crecimiento y para el caso K_s no están muy alejados.

DETERMINACION DE K_S

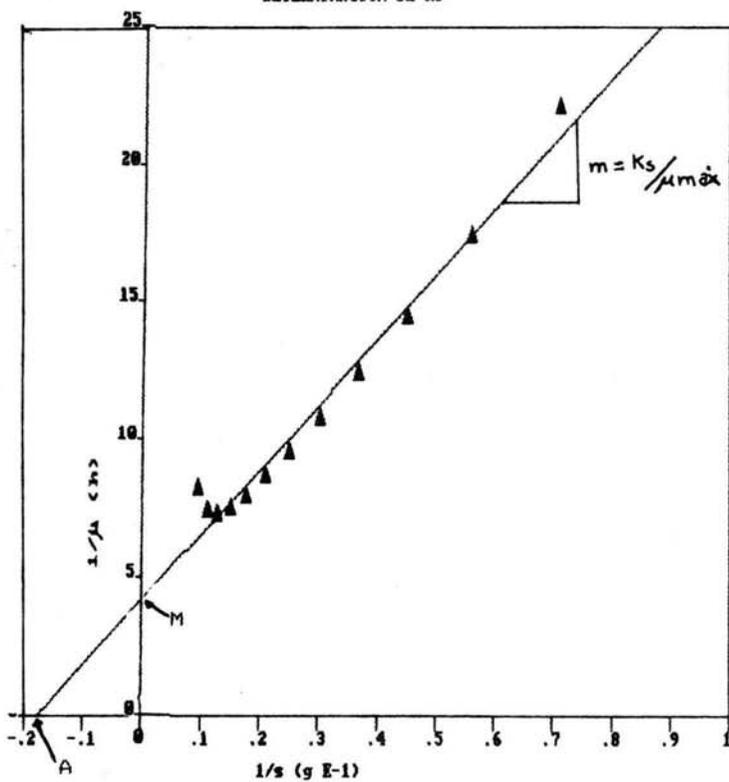


Fig. 26 . Grafica de los datos para el calculo de μ_{max} y K_s , por el metodo de reciprocos.

$$A = -1/K_s = 0.18$$

$$M = 1/\mu_{max} = 4.206$$

5.7 CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO.

El Cultivo por Lote Alimentado (CLA), fue el tercer sistema de fermentación empleado. En primer lugar, se efectuó un análisis para el establecimiento de las condiciones de manejo y operación del CLA, mediante el programa de computación ECUCLA, estableciendo entonces las características del cultivo realizado que fueron: una alimentación constante de 500 ± 50 mL/h ; comenzando la adición a las 15 h de edad del cultivo, el CLA se inició en dicho momento por que es en éste, donde se presenta la fase exponencial de crecimiento del microorganismo; y una concentración del medio de alimentación, incrementada 3 veces con respecto al medio original (M-25).

Es importante mencionar que la concentración del medio de alimentación utilizada, fue la máxima permitida por el sistema de alimentación.

5.7.1 CLA PRELIMINAR

(Sin adición de sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 y KCl)

El primer ensayo bajo el sistema de CLA, fue una prueba preliminar, la cuál consistió en no adicionar al medio de alimentación las sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 y KCl , considerando que estas pudieran ser aportados por los componentes complejos presentes en el medio (30). El experimento se efectuó con la cepa GM-9 y la cinética obtenida se muestra en la Figura 27; a partir de la cual se calculó un $Y_{x/s}$ de 0.52 g/g y una μ de 0.18 h^{-1} . Estos resultados son similares a los valores obtenidos en el cultivo por lote; por lo tanto, nos permitió establecer la importancia de incorporar en la composición del medio las sales excluidas. Concepto que fue reafirmado en los cultivos realizados posteriormente bajo la técnica del CLA.

5.7.2 CLA ESTABLECIDO.

Tomando en cuenta el resultado del primer ensayo del CLA, se realizaron otros dos, en estos cultivos se ocuparon las cepas GM-9 y GM-10 y las cinéticas obtenidas se presentan en las Figuras 28 y 29 respectivamente. En ambos casos el medio de alimentación contó con las sales que se habían restringido en el CLA preliminar; ambos cultivos presentaron un comportamiento cinético similar, como se muestra a continuación:

Cepa	GM-9	GM-10
cuenta celular (10^9 cel/mL)	5.4	5.5
μ (h^{-1})	.29	.3
Yx/s (gr/gr)	.7	.7

Como se observa existe una duplicación en la concentración celular (5.5×10^9 cel/mL), en comparación con los cultivos por lote (2.47×10^9 cel/mL) y por tanto se mejoraron los rendimientos.

Por otra parte, las μ de ambas cepas (0.29 y $0.30 h^{-1}$), superaron a la $\mu_{\text{máx}}$ calculada para el cultivo por lote: $0.24 h^{-1}$ y en ambos cultivos se alcanzó la máxima concentración celular en un periodo de 35 a 40 h y obteniéndose el 90 % de esporulación cercano a las 55 h de edad del cultivo.

CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO

CEPA GM-9

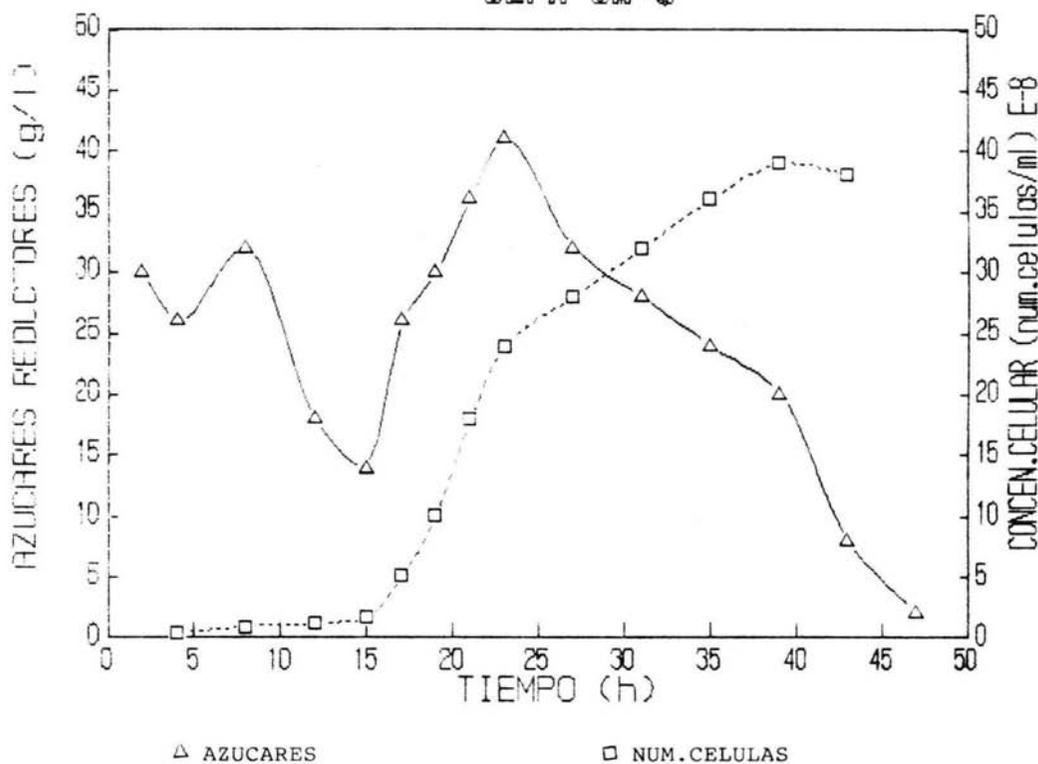


Fig. 27 . Comportamiento de la cepa GM - 9 en CLA.

En este caso el medio de adición no contenía las sales de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 y KCl .

$\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.52 \text{ g/g}$

CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO

CEPA GM-9

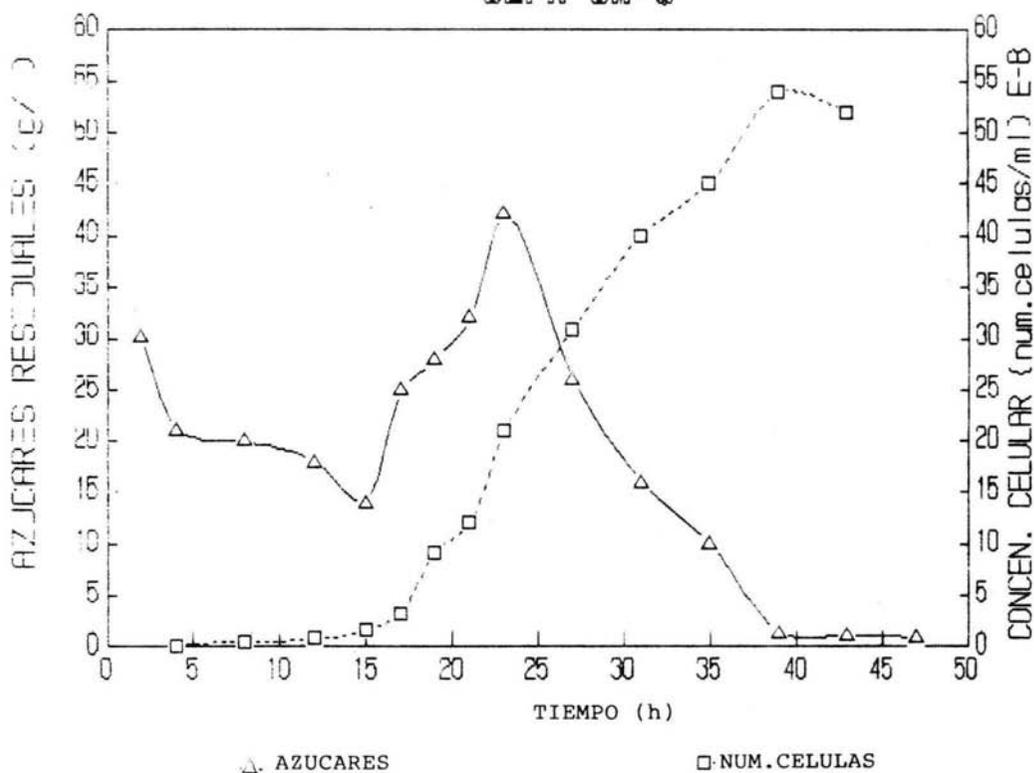


Fig. 28 . Cinetica de CLA de la cepa GM - 9.

$V_0 = 5 \text{ L}$

$V_f = 10 \text{ L}$

En fermentador de 14 L

$\mu = 0.29 \text{ h}^{-1}$

$Y_{x/s} = 0.7 \text{ g/g}$

CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO

CEPA GM-10

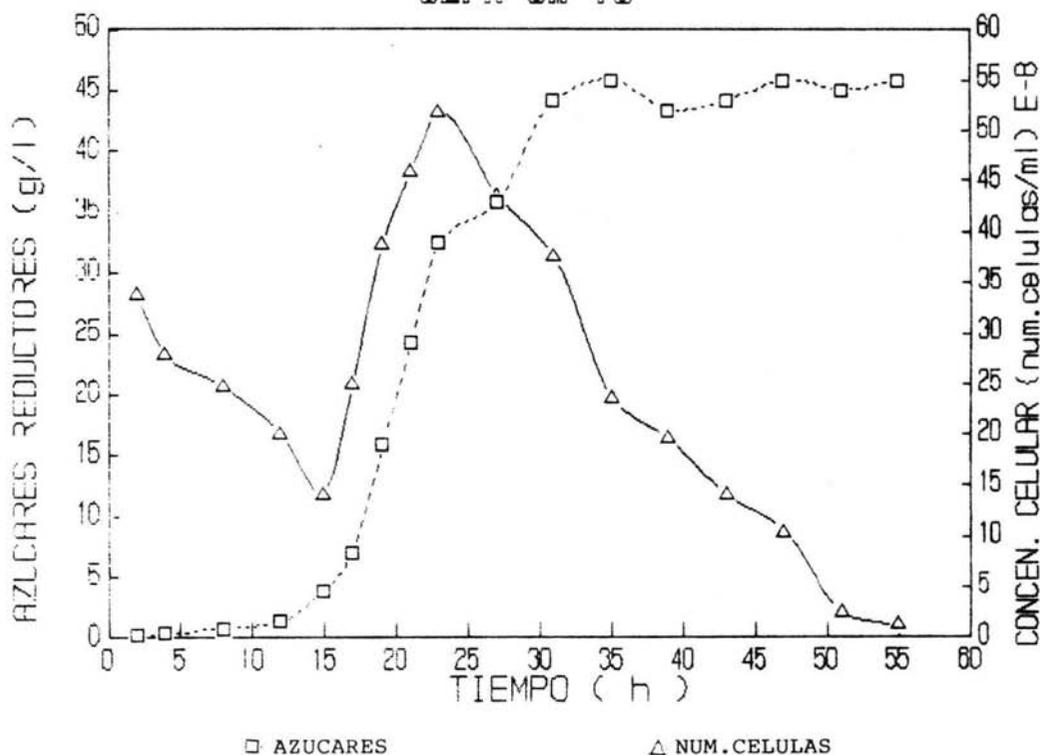


Fig. 29 . Cinetica de CLA de la cepa GM - 10.

$V_0 = 5 \text{ L}$ $V_f = 10 \text{ L}$
 En fermentador de 14 L
 $\mu = 0.30 \text{ h}^{-1}$ $Y_{x/s} = 0.7 \text{ g/g}$

En ningún caso, de los dos CLA, se alcanzaron concentraciones de glucosa de 50 gr/L ni superiores, siendo la máxima de 46 gr/L; este resultado es importante, ya que algunos autores mencionan que a concentraciones superiores de 50 gr/L de glucosa se inhibe el proceso de formación de esporas, afectándose entonces, la producción de la δ -endotoxina (7,34).

Bajo este sistema de CLA, las cepas lograron buenos crecimientos; lo que es importante, porque permite continuar la investigación para el posible uso de esta técnica en la producción de la bacteria a una mayor escala.

5.8 ACTIVIDAD BIOLÓGICA (PRODUCTO OBTENIDO POR CLA)

Los resultados de la actividad insecticida de los productos recuperados de los CLA se registran en la Tabla 13, utilizando como insecto prueba a *Trichoplusia ni* y con dosis de 500 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA 13. Actividad Biológica de cepas de *Bacillus thuringiensis*.
Producto obtenido en CLA.

Cepa	Mortalidad (%)
GM 9	40
GM 10	40

Insecto prueba: *Trichoplusia ni*
Dosis :500 $\mu\text{g/ml}$

En este ensayo, los productos de las cepas GM-9 y GM-10 presentan un mismo valor de actividad biológica, siendo éste menor a los registrados en los cultivos por lote. Esta baja de actividad insecticida fue mucho más notable para la cepa GM-10, ya que bajó su actividad en un 60%, y la cepa GM-9 bajó su actividad en un 20%. Estos resultados no eran los esperados, dado el mejoramiento del comportamiento cinético de las cepas.

La disminución en la actividad puede ser explicada por diferentes factores. Uno de ellos puede ser porque el cultivo se detuvo cuando se liberó el 90% de las esporas, lo que implicó un período de aproximado de 55 h, tiempo en el cuál pudieron liberarse enzimas proteolíticas, que pueden afectar la calidad de la δ -endotoxina; tal como ha sido reportado por Andrews y col. (4).

Otro mecanismo que pudo haber influido en la baja de actividad insecticida puede ser, la pérdida de la información genética para la elaboración de la δ -endotoxina. Esta información se encuentra en plásmidos (de 30 a 70 Md) que contienen los genes *cry* (formación del cristal) (41,46), en la cepa HD-1 (*kurstaki*) estos plásmidos son multicopia (11); Selinger (69) y Roy (65) encontraron que en fermentaciones de cultivos continuos con frecuencia se pierde el plásmido, siendo esta pérdida relacionada con la obtención de cepas acristalíferas o de baja acción biológica.

La pérdida de expresión de genes encontrados en plásmidos se explica por: a) inestabilidad segregacional del plásmido entre células hijas; b) inestabilidad estructural o rearrreglos en el DNA plasmídico. Sin embargo los mecanismos que gobiernan la estabilidad de un plásmido dentro de la célula, aún no están completamente entendidos (16,39).

En fermentaciones de cultivo continuo de la cepa GM-10, realizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM, se encontró que la cepa presenta inestabilidad genética (Cerón 1989, comunicación personal en III Con. Nal. de Biotec.); este hecho apoya la sugerencia de que la baja de actividad de los cultivos en CLA puede deberse a la pérdida de información genética para la síntesis del cristal protéico.

Un tercer factor que podría explicar la baja de actividad biológica, fue la dificultad que se encontró para suspender el producto en la solución amortiguadora para efectuar el bioensayo, esto de acuerdo con los informes de la UANL; lo que pudo traducirse en errores al momento de calcular la concentración del producto administrado en la dieta de los organismos prueba, y por lo tanto dar valores de actividad biológica virtualmente menores.

El único registro que se tiene de CLA para esta bacteria (además del presente trabajo), es el estudio de Arcas y col. (7), quienes trabajaron con un CLA lineal y la cepa HD-1 (*kurstaki*), con el propósito de estudiar el efecto de aumentar la concentración de nutrimentos de un medio a base de glucosa-extracto de levadura, sobre el crecimiento, esporulación y producción de la δ -endotoxina; ellos obtienen un incremento en la obtención de esporas y en la actividad de la δ -endotoxina, concluyendo que este sistema puede ser aplicado en la producción del bioinsecticida de *B. thuringiensis*.

Consideramos que los datos aportados por este trabajo son importantes, dado que es el primer intento en nuestro país, del empleo de este sistema de cultivo con *B. thuringiensis* y sobre todo utilizando cepas nativas . Además estos resultados permiten la apertura de nuevas líneas de investigación, que tengan por meta llegar a establecer y consolidar un CLA para la producción de la bacteria en cuestión.

VI C O N C L U S I O N E S .

- 1) El mejor medio de cultivo, para crecimiento y actividad biológica de las cepas, fue el medio M-25.
- 2) Las mejores cepas, en cuanto a capacidad de crecimiento y actividad insecticida, obtenido en el cultivo por lote en matraz fueron las cepas GM-9 y GM-10.
- 3) Las cepas anteriormente en los cultivos por lote, en el reactor de 14 L, tienen concentraciones celulares de 1.77×10^9 y de 2.47×10^9 .
- 4) La cepa GM-10, bajo el sistema de cultivo por lote, alcanza el máximo porcentaje (100 %) de actividad insecticida.
- 5) El CLA establecido fue de alimentación constante, con una velocidad de adición de 500 (\pm 50 ml/h).
- 6) El CLA de adición constante incrementa notablemente la concentración celular de las cepas utilizadas (5.4 y 5.5×10^9), con respecto al cultivo por lote; sin embargo existe una disminución de la actividad insecticida. Por lo que en el trabajo se discuten algunas posibilidades que explican este comportamiento.

VII R E C O M E N D A C I O N E S .

- 1) Efectuar estudios de optimización de el medio de cultivo MHS, para su utilización en procesos de fermentación, donde se utilice *B. thuringiensis*
- 2) Continuar los ensayos de cultivo por lote, en reactor de 14 L, de las cepas GM-9 y GM-10, con la finalidad de mejorar su producción bajo este sistema.
- 3) Realizar una minimización del medio M-25, para evitar problemas de adición, al momento de incrementar su concentración en un CLA.
- 4) Determinar $\mu_{\text{máx}}$ y K_s (para glucosa) de *B. thuringiensis* por medio de otros métodos como, el sistema de Cultivo Continuo.
- 5) Probar otros tipos de CLA (exponencial y lineal), aparte del sistema de adición constante y con cepas estandar del microorganismo.
- 6) Si se pretenden continuar los ensayos de elaboración de insecticidas biológicos con cepas nativas, se recomienda determinar su estabilidad genética.

VIII BIBLIOGRAFIA.

1. ALCOCER-GOMEZ, L. 1968 . El combate microbiológico de algunas plagas por medio de agentes patológicos. Fitofilo, SAG-DGSV. no. 60.
2. ALCOCER-GOMEZ, L., GOTTWALD-ALCOCER, C. 1977 . Patología inducida con *Bacillus thuringiensis* en larvas de *Spodoptera frugiperda* criadas en laboratorio. V Reunion Nacional de Control Biológico y Sector Agropecuario. SARH-DGSV. 27-29 de abril, Cd. Victoria Tamps., México.
3. ALCOCER-GOMEZ, L. 1980 . Posibilidades de producción en México de *Bacillus thuringiensis* a nivel de planta piloto. VIII Reunion Nacional de Control Biológico. Manzanillo Col. México.
4. ANDREWS, R.F.; BETCHEL, D.B.; BULLA, L.A. 1981 . Solubility of paraesporal crystals of *Bacillus thuringiensis* and presence of toxic protein during sporulation and outgrowth . In "Sporulation and Germination." (Levinson, H.S. & Fipper, D.J. Eds.) AMS Pubs. Washington D.C. p.p: 174-177.
5. ANONIMO. 1979 . Proyecto de establecimiento de un Centro Piloto para cultivo, desarrollo y producción de microorganismos entomopatogenos para fines de control biológico. I (*Bacillus thuringiensis*). SARH-DGSV.
6. ARCAS, J., YANTORNO, O. 1984 . A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biotech. Lett. 6 (8): 495-500.
7. ARCAS, J., YANTORNO, O., ERTOLA, R. 1987 . Effect of high concentration of nutrients of *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotech. Lett. 9 (2): 105-110.

8. BAILON, O.A. . 1986 . Estudio preliminar para la producción de bioinsecticida por fermentación a partir de *Bacillus thuringiensis* para el control de ciertas plagas agrícolas y sanitarias. *Gestion Tecnologica*. 2 : 54-55.
9. BARJAC, H., BONEFOI, A. 1965. A clasiffication of strains of *B. t.* Berliner with a key to their differentiation. *J. Invert. Pathol.* 11 : 335-347.
10. BARJAC, H. 1981 . Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In "Microbial Control of Pests and Diseases 1970-1980." (Burgess, H.D. Ed.) pag.35-46. Academic Press, London.
11. BARTON, K.A., WHITELEY, H.R. & YANG, N.G. 1987 . *Bacillus thuringiensis* expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85 : 1103-1109.
12. BECHTEL, B.B. & BULLA, L.A. 1981 . Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127 (3): 1472-1481.
13. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol II. 1982 . (Sneath, P.H.A. Ed.) Williams & Wilkins Co. Baltimore; p.p.: 1135-1139.
14. BERRYMAN, A.A. 1982 . Biological control thresholds and pest outbreaks. *Environ. Entomol.* 11 : 544-549.
15. BROCK, T.D. 1978 . Biología de los microorganismos. Omega. 2d.ed.; p.p.: 253-255.
16. BRODA, P. 1983 . Plasmids. W.H. Freeman Co. San Francisco E.U.; p.p.: 53-63.

17. BROWNBIDGE, M.E. & MARGALIF, J. 1986 . New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. *J. Invert. Pathol.* 48 : 216-222.
18. BULLA, L.A., KRAMER, K.J. & DAVIDSON, L.I. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130 (1): 375-383.
19. CALABRESE, D.M. & NICKERSON, K.W. 1980. A comparison protein crystal subunits size in *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 26 : 1006-1010.
20. CASTRO-PINÓN, E. 1985 . Toxicidad de trece nuevos aislados de *B.t.* a partir de suelo y larvas enfermas. Tesis de Licenciatura, FCB-UANL., Monterrey, N.L., México.
21. CERON, J. 1989 . Comunicación personal.
22. COUCH, T.L. & ROSS, R.A. 1980 . Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. and Bioeng.* 22 : 1297 - 1304.
23. CRAWFORD, D.N. & HARVEY, W.R. 1988 . Barium and Calcium block *Bacillus thuringiensis* subsps *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of Potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Experimen.* 137 : 271-286.
24. DELUCCA, A.J., PELGREN, M.S. & CREGLES, G. 1982 . *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.* 28 : 452-456.
25. DE URQUIJO-NIEMBRO, E.. 1987. Producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de ciertas plagas de importancia agrícola y médica en México. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN. México.

26. DULMAGE, H.T. 1970 . Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* . J. Inver. Pathol. 15 : 235-239.
27. DULMAGE, H.T., CORREA, J.A. & MARTINEZ, A.J. 1970 . Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Inver. Pathol. 15 : 15-20.
28. DULMAGE, H.T. et.al. 1981 . Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases. 1970-1980." (Burgess, H.D., Ed.); p.p.:193-222. Academic Press, London.
29. DUNN, I.J. & MORE, J.R. 1975 . Variable-volume continuous cultivation . Biotech. and Bioeng. 17 : 1805-1822.
30. DZIEWULSKY, D.M., HAUGHNER, H.A., DAS, K. 1986 . Fed-batch with biomass recycle and batch production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus polymyxa*. J. Biotech. 4 :171-180.
31. ERTOLA, R. 1987 . Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. In "Horizons of Biochemical Engineering". (Aiba, S. Ed.). University of Tokio Press.
32. FAST, P.G. 1981 . The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. En "Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980." (Burgess, H.D. Ed.); p.p. : 223-244. Academic Press, London.
33. FAUST, R.M. 1975 . Toxins of *Bacillus thuringiensis* : Mode of action . Conference Report, In : "Toxins Regulation of Vectors the Saprophytic and Aerobic Bacteria and Fungi."

Organized by: The National Institute of Allergy and Infections Diseases. U.S. Department of Health Education and Welforer Eston, M.D.U.S.(6-8 oct.).

34. FODA, M.S., SALAMA, H.S. & SELING, M. 1985 . Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. Biotech. 22 : 50-52.
35. FREIMAN, V.B. & CHUPIN, A.A. 1973 . Aspects of continuous cultivation of spore-forming microbes from the group *B.t.* Bioeng. Symp. No.4. Advances in Microbial Eng. Biotech. & Bioeng.; p.p.: 259-265.
36. GOLDBERG, I., SNEH, B., BATTAT, E. & KLEIN, D. 1980. Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Sopodoptera littoralis*. Biotech. Lett. 2 (10) : 419-426.
37. GRIGOROVA, R., ANTAR, D.G. & PASHOV, N.. 1967 . On the shape and structure of the crystal in two strains of *Bacillus thuringiensis*. J. Invert. Pathol. 9 :503-509.
38. HAIDER, M.Z. & ELLER, D.J.. 1987 . Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin. Biochem J. 248 : 197-201.
39. HARDY, K.. 1981 . Bacterial plasmids. ASM Pubs. Washington D.C.; p.p: 11-13.
40. HERNANDEZ, J.L.. 1988 . Evaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. Entomophaga 33 (2) : 163-171.

41. JARRET, P.. 1985 . Potency factors in the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* and the significance of plasmids in their control. *J. Appl. Bacteriol.* 58 : 437-448.

42. JONES, R.C. & ANTHONY, R.M.. 1977 . The relations between feed rate and specific growth rate in fed batch cultures. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4 : 87-92.

43. KRIEG, A. & MILTENBURGER, H.. 1984 . Bioinsecticides I: *Bacillus thuringiensis*. In "Adv. In Biotechnological Processes"; 3 : 273-290.

44. LARSEN, R & KJAEGAARD, R.. 1978 . A structural model for microbial growth and product formation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 5 : 177-188.

45. LECADET, M. & MERTOURET, D.. 1967 . Enzymatic Hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. *J. Invert. Pathol.* 9 : 330-332.

46. LUTHY, P.. 1986 . Genetics and aspects of genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* . Conference: "Symposium in memoria Dr. Ernest Berliner on the occasion of the 75th anniversary of primary description of *Bacillus thuringiensis*." (Krieg, A. y Huger, A.M. organizadores) Berlin.

47. MALDONADO-BLANCO, G. (1981). Produccion de Bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* GM-1 utilizando tres diferentes medios de cultivo. Tesis de licenciatura. Monterrey, N.L. México.

48. MANDELSTAM, J & McQUILLEN, K.. 1973 . Biochemistry of bacterial growth and product formation . 2 ed. Blacwell Scientific Pubs. London; p.p.:11-15.
49. MANKAD, T. & BUNGAY, H.R.. 1988 . Model for microbial growth with more than one limiting nutrients. J. Biotech. 7 : 161-166.
50. MILLER, G.L.. 1959 . Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Annal. Chem. 31 (3) : 426.
51. MULCHANDANI, A & LUONG, J.H.. 1989 . Microbial inhibition kinetics revisited. Enzyme Microb. Technol. 11 : 66-70.
52. NICKERSON, K.W.. 1980 . Structure and fuction of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal. Biotech. and Bioeng. 22 : 1305-1333.
53. NICKERSON, K.W. & BULLA L.A.. 1979 . Physilogy of sporeforming bacteria associated with insects : Minimal nutritional requeriments, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol 28 (1): 124-128.
54. NORRIS, J.R.. 1971 . The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* biosynthesis and physycal structure. En "Microbial Control of Insects and Mites." (Burges, H.D. & Hussey, N.W. Eds.); p.p. : 229-246. Academic Press, USA.
55. OHBA, M. & AIZAWA, K.. 1986 . Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. J. Invert. Pathol. 47 : 12-20.

56. ORDAZ-CONTRERAS, L.. 1987 . Obtención de proteína unicelular a partir de bagacillo de caña en cultivo por lote alimentado. Tesis de Maestría . CINVESTAV-IPN, México.

57. PEARSON, D. & WARD, O.P.. 1988 . Bioinsecticide activity, bacterial cell lysis and proteolytic activity in cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Appl. Bacteriol. 65 : 195-202.

58. PEARSON, D. & WARD, O.P.. 1988 . Effect of culture condition on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development media for production of the protein crystal endotoxin. Biotech. Lett. 10 (7) : 451-456.

59. PIRT, S.J.. 1974 . The theory of the fed-batch culture with reference to the penicillin fermentation . J. Appl. Chem. Biotechnol. 24 : 415-424.

60. PRONOSTICOS GTN. 1985. U.S. Bioinsecticide Market. Gen. Tech. News. 2 : 6-7.

61. RODRIGUEZ, M.M.; DE LA TORRE, M & DE URQUIJO, E. 1991 . *Bacillus thuringiensis* características biológicas y perspectivas de producción. Rev. Lat-amer. Microbiol. 53 (4): 279-292.

62. ROGOFF, M.H.. 1966 . Crystal-forming bacteria as insects pathogens. In "Advances in Applied Microbiology." (Umbert, W. W. Ed.); p.p.: 291-312. Academic Press , USA.

63. ROSE, A.. 1976 . Chemical microbiology. 3 ed. Butterworth and Co. England.; p.p.: 73-75.

64. ROWE, G.E. & MARGARITIS, A.. 1987 . Commercial processes for production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides. In "Critical Reviews in Biotechnology." (Graham, G.S. & Inge, R. Ed.); 6 (1). CRC Press, USA.
65. ROY, B.P., SELINGER, L.B. & KHACHATOURIENS, G.G. 1987 . Plasmid stability of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) during continuous phased cultivation. *Biotech. Lett.* 9 (7): 482-488.
66. SANCHEZ-NOVOA, A .1985. Propagación y toxicidad de *Bacillus thuringiensis* (GM-1 a GM-19) en un medio a base de melazas contra *Spodoptera frugiperda* y *Heliothis virescens*. Tesis de Licenciatura. F.C.B.-U.A.N.L.. Monterrey , N.L. México.
67. SALAMA, H.S., FODA, M.S., DULMAGE, H.T.. 1983 . Novel fermentation for production of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Inver. Pathol.* 41 : 8-19.
68. SCHMELL, D.J. & Nickerson, K.W. 1983 . Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals to *Aedes aegypti* larvae: Carbonate Reversal. *Appl. Envir. Microbiol.* 5 : 1691-1693.
69. SELINGER, L.B., DAWSON, P.S. & KHACHATOURIANS, G.G.. 1988 . Behavior of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* under continuous phased cultivation in a cyclone fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 : 247-253.
70. 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.

71. THOMAS, W.E. & ELLAR, D.J.. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin : effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.* 60: 181-197.
72. TROTTIER, M.R., MORRIS, O.N. & DULMAGE, H.T.. 1988. Susceptibility of the bertha army worm, *Mamestra configurata* (lepidoptera, noctuide) to sixty-one strains from ten varieties of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Path.* 51 : 242-249.
73. TYRELL, D.J., BULLA, L.A. & et.al.. 1981 . Comparative biochemistry of entomocidal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Bact.* 145 (2) : 1052-1062.
74. Wilcox, E.R., Herrnstadt, C., Soares, G.G., Edwards, D.L.. 1986 . A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Biotech.* 4 : 305-308.
75. WILLEMOT, R.M. & DURAN, G. 1988 . Los Reactores Biológicos. El futuro de las biotecnologías. *Mundo Científico* (edición especial). 71 (7) : 718-741.
76. YOSTEN, A.A. & ROGOFF, M.H.. 1969 . Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. *J. Bacteriol.* 100 : 1229-1236.

IX NOMENCLATURA.

a = Coeficiente de número de células
C_{soo} = concentración inicial de sustrato (g/L)
c_{xoo} = concentración inicial celular (g/L)
Δ = cambio de flujo (L/h)
g = gramos
h = horas
in = pulgadas
K_s = constante de saturación (mg/ml)
L = litros
lb = libras
mg = miligramos
mL = mililitros
μ = tasa específica de crecimiento (h⁻¹)
μ_{máx} = tasa específica de crecimiento máxima (h⁻¹)
rpm = revoluciones por minuto
S = concentración de sustrato (g/L)
S_Δ = concentración de sustrato en el medio alimentado (g/L)
T = temperatura (°C)
t = tiempo
V_o = volumen inicial de medio
V_f = volumen final de medio
v_{vm} = volumen de aire por volumen de medio por minuto
X = concentración celular (g/L ó cel/mL)
Y_{x/s} = rendimiento celular por unidad de sustrato (g/g)
γ = concentración de sustrato al final del cultivo por lote (g/L)