

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE CULTIVO SÓLIDO Y LÍQUIDO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE ESPORAS DE *Bacillus thuringiensis* Y15 y EA3”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**I.B.I. BRISEIDA FLORES TUFÍÑO**

**DIRECTOR:**

**Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

**México, Ciudad de México 2016**

**“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”**

México D.F. a 20 de Julio del 2016.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
Estudio comparativo de cultivo sólido y líquido para la producción de esporas de *Bacillus*  
*thuringiensis* Y15 y EA3

que presentó

I.B.I. Briseida Flores Tufiño

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Marcos López Pérez

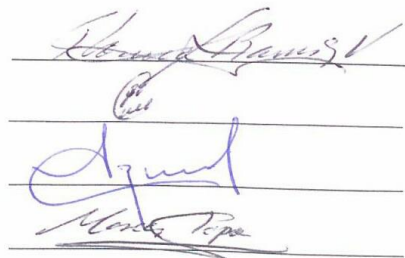
Jurado:

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Vocal: Dr. Alejandro A. Azaola Espinosa

Vocal: Dr. Marcos López Pérez



The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written on a horizontal line. The top signature is the most legible and appears to be 'Florina Ramírez Vives'. The middle signature is more stylized and less legible. The bottom signature is also stylized and less legible.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por la beca otorgada bajo el No. de registro 570603.

Al Dr. Octavio Loera por el apoyo y dirección durante la realización de la tesis, gracias por los consejos brindados así como los conocimientos transmitidos, por aceptarme en su equipo de trabajo y ser un ejemplo de dedicación. Al Dr. Gustavo Viniestra y al Dr. Marcos López por las acertadas observaciones al trabajo y sugerencias para mejorarlo. A los doctores Florina Ramírez, Araceli Tomasini y Alejandro Azaola por las observaciones realizadas con el fin de mejorar la presentación del trabajo.

A mis padres por siempre estar presentes y no dejarme rendir, por apoyarme en toda dedición que he tomado, por su infinito cariño que guía mi existencia. GRACIAS por todos los sacrificios que han realizado para que tenga la mejor educación y sobre todo por las grandiosas personas que son.

A mis hermanos, tíos y abuelos por el apoyo y cariño que siempre me brindan.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo, observaciones e ideas que aportaron durante la realización de este trabajo y que contribuyeron a la mejora del mismo.

A Shey, Jorge, Ale, Iván, Pau, Vic, Gaby y Facundo por su compañía antes y durante la realización de este trabajo, por siempre tener una palabra de ánimo, por su paciencia y porque siempre hay algo nuevo que aprender con ustedes, gracias por ser unas excelentes personas y muy buenos amigos.

A Jovany por su paciencia inagotable, por siempre creer en mí, por acompañarme, aconsejarme, apoyarme y no dejarme rendir. Gracias por ser una gran persona y la inspiración para ser una mejor.

Para ellos: MUCHAS GRACIAS.

## RESUMEN

Las plagas agrícolas son definidas como una población de animales fitófagos que disminuyen la producción del cultivo, reducen el valor de la cosecha o incrementa los costos de producción. Como respuesta se han implementado varias estrategias para el control de dichas plagas, el uso de agentes químicos ha sido el método más utilizado a nivel global por la rápida acción que presenta hacia los organismos objetivo, no obstante, no son específicos pues también tienen acción insecticida hacia organismo benéficos como los organismos polinizadores. Los plaguicidas son generalmente compuestos químicos no degradables generando contaminación no solo de suelos sino también de mantos freáticos, más la exposición a dichos agentes químicos ha generado enfermedades tanto en el ser humano como en animales y en las mismas plantas.

En busca de alternativas al uso de plaguicidas químicos surge el término de control biológico plagas, el cual es una vertiente del Manejo Integrado de Plagas (MIP). El control biológico de plagas se define como el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control poblacional de la plaga. De los microorganismos utilizados en el control biológico de plagas, *Bacillus thuringiensis* es el más empleado, debido al amplio rango de acción que posee hacia diversos ordenes de insectos, sin afectar a organismos no objetivos o al mismo humano.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva, con la capacidad de producir esporas y algunos compuestos con propiedades insecticidas como la denominada proteína Cry. Las características de *B. thuringiensis* son provechadas para la producción de bioinsecticidas de plagas específicas. Los beneficios económicos de la aplicación de este microorganismo han sido motivo del desarrollo de técnicas para mejorar la producción de esporas y proteína Cry. Convencionalmente la producción de esporas y proteína Cry se realiza en cultivos líquidos, no obstante, dichos sistemas de cultivo presentan ciertas desventajas frente a otro tipo de cultivos. La producción de *B. thuringiensis* en cultivos sólidos es una alternativa para la obtención de los compuestos de interés, aunque la información y aplicación de la misma es muy poca, debido a ello el objetivo de este trabajo fue comparar los rendimientos producción de esporas de dos cepas de *B. thuringiensis* en ambos sistemas de cultivo utilizando el mismo medio de producción.

Se cuantifico la producción de esporas en cultivo en medio líquido (CML) y sólido (CMS, con espuma de poliuretano PUF como soporte inerte) utilizando medios con distinta composición, la máxima producción de biomasa en los medios LB y GYS se obtienen en cultivo en medio líquido, más en medio GYS x4 la máxima producción de biomasa se obtiene en CMS siendo 2.44 veces mayor para la cepa EA3 y 1.3 veces mayor en la cepa Y15 a la reportada en CML, el aumento de concentración de medio GYS a GYS x4 provoca inhibición de crecimiento en los cultivos líquidos ya que hay una disminución en los valores de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ). La producción de biomasa en medio LB provoco una alcalinización del medio alcanzando valores de 9 de pH, mientras que el uso de medio GYS y GYS x4 produce una acidificación del obteniendo valores de hasta 4.5 de pH.

El cambio de medio LB a medio GYS provoco un incremento de hasta 11 veces en la producción de esporas, por el contrario el aumento de 4 veces la concentración de sustrato en el medio GYS x4 sólo produjo un aumento de hasta 3 veces en la producción de esporas en cultivo sólido para la cepa EA3 en comparación con el medio GYS, dicho aumento en la concentración de sustrato produjo un descenso en la producción de esporas de hasta 7 veces en el cultivo líquido de la cepa EA3 respecto al medio GYS.

Los resultados demuestran que hay diferencias intrínsecas en cada cepa que producen diferentes repuestas al cambio de la formulación del medio y a los sistemas de cultivo líquido y sólido. El CMS provee ventajas sobre el CML cuando se utilizan altas concentraciones de sustrato, reduciendo el proceso de inhibición y aumentando la producción de esporas.

## **ABSTRACT**

Agricultural pests are defined as a population of herbivorous animals which decrease crop production, reduce the value of the crop or increase cost production. In response to pest several strategies have been implemented to control these pests, the use of chemical agents has been the method most used world wide since the rapid action towards the target organisms, however, they are not specific because they also have insecticidal action to beneficial organisms such as pollinators. Pesticides are generally non-degradable chemicals that generate pollution not only in soil but also groundwater, the exposure to these chemicals has generated diseases in both humans, animals and plants.

In search of alternatives to the use of chemical pesticides arises the term biological pest control, which is an aspect of Integrated Pest Management (IPM). Biological pest control is defined as the use of natural enemies and microorganisms for population control of the pest. Of microorganisms used in biological pest control, *Bacillus thuringiensis* is the most used because of the wide range of action that has toward various insect orders, without affecting agencies not objectives or to the same human.

*Bacillus thuringiensis* is a gram positive bacterium, capable of producing spores and some compounds with insecticidal properties as a called Cry protein. The characteristics of *B. thuringiensis* are provechadas for the production of bio-insecticides of specific pests. The economic benefits of the application of this organism have been the subject of development of techniques to improve the production of spores and Cry protein. Conventionally the production of spores and Cry protein is performed in liquid cultures, however, such systems have certain disadvantages braked to another type of cultures. Production of *B. thuringiensis* in solid culture is an alternative for the obtaining of the compounds of interest , although information and application is very low, due to it the objective of this work was to compare yields production of spore of two strains of *B. thuringiensis* in both culture systems using the same production medium.

Production of spores in culture in liquid medium (CML) and Solid (CMS, polyurethane foam PUF as an inert support) was quantified using media with different composition , the maximum production of biomass in the medium LB and GYS are obtained in culture in liquid medium , the medium GYS x4 the maximum biomass production is obtained in CMS is 2.44 times higher for EA3 strain and 1.3 times higher for strain Y15 mayor to that reported in CML , increased concentration medium GYS to GYS x4 causes inhibition of growth in liquid cultures as there is a decrease in the values of the specific growth rate ( $\mu$ ). Biomass production in LB medium caused alkalization of the medium reaching pH values of 9, while the use of GYS and GYS x4 medium produces acidification obtaining values of pH up to 4.5.

The change of LB medium to GYS medium caused an increase up to 11 times in the spore production, conversely the increase of 4 times in the concentration of sustrate in the medium GYS x4 only produced an increase up to 3 times in the production of spores in solid culture to the strain EA3 compared with the GYS médium, the increase in the concentration of sustrate

cause can decrease in the production of spores up to 7 times in submerged culture of the EA3 strain respect to GYS médium.

Results show that there are inherent differences in each strain that produce different responses to changing media formulation and liquid and solid culture systems. The CMS provides advantages over CML when high substrate concentrations are used, reducing the inhibition process and increasing production of spores.



## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Plagas y su efecto.....	1
1.2. Métodos de control de plagas.....	2
1.3. Control biológico.....	2
1.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	3
1.4.1.Ciclo infeccioso.....	4
1.4.2.Producción de Bt.....	6
1.5. Cultivos sólidos.....	6
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>10</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
5.1. General .....	11
5.2. Específicos.....	11
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
6.1. Estrategia experimental.....	12
6.2. Microorganismos.....	12
6.3. Conservación de cepas .....	12
6.4. Medios de cultivo.....	13
6.4.1. Preparación de inóculo.....	14
6.4.1.1. Medio LB.....	14
6.4.1.2. Medio GYS.....	13
6.5. Sistemas de producción.....	14
6.5.1.Cultivo líquido.....	14
6.5.2.Cultivo sólido.....	15
6.6. Determinación de biomasa.....	15
6.7. Determinación de pH.....	15
6.8. Consumo de glucosa.....	16
6.9. Conteo de esporas.....	16
6.10. Modelos de ajuste .....	17
6.10.1. Modelo logístico.....	17
6.10.2. Modelo de dos fases.....	17
6.11. Análisis estadísticos.....	17

<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
7.1. Conservación de cepas.....	18
7.2. Medio LB.....	19
7.2.1. Evolución de pH.....	19
7.2.2. Producción de biomasa.....	21
7.2.3. Producción de esporas.....	23
7.3. Medio GYS.....	24
7.3.1. Evolución de pH.....	25
7.3.2. Consumo de glucosa.....	26
7.3.3. Producción de biomasa.....	28
7.3.4. Producción de esporas.....	31
7.4. Medio GYS x4.....	32
7.4.1. Evolución de pH.....	32
7.4.2. Consumo de glucosa.....	34
7.4.3. Producción de biomasa.....	36
7.4.4. Producción de esporas.....	38
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>48</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Efecto económico potencial de las plagas o de enfermedades transfronterizas.

**Figura 2.** Imagen de microscopia electrónica de transmisión de una cepa de *B. thuringiensis* en estado de esporangio.

**Figura 3.** Ciclo infectivo de proteínas Cry de Bt.

**Figura 4.** Conservación de cepas: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 cuenta de células vegetativas y esporas, b) cepa de *B. thuringiensis* Y15

**Figura 5.** Evolución del pH durante el de cultivo en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 CML y CMS: b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 CML y CMS.

**Figura 6.** Producción de biomasa en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 en CML y CMS; b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en CML y CMS.

**Figura 7.** Producción de esporas en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, CML y CMS; b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en medio LB, CML y CMS.

**Figura 8.** . Evolución del pH durante el cultivo en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 CML y CMS: b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 CML y CMS.

**Figura 9.** Cinética del consumo de sustrato durante el cultivo en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, CML y CMS: b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 GYS, CML y CMS.

**Figura 10.** Producción de biomasa en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 en CML y CMS b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en CML y CMS.

**Figura 11.** Producción de esporas en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, CML y CMS; b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en medio LB, CML y CMS.

**Figura 12.** Evolución del pH durante el cultivo en medio GYS x4: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 CML y CMS: b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 CML y CMS.

**Figura 13.** Cinética del consumo de sustrato durante el cultivo en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, CML y CMS: b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 GYS, CML y CMS.

**Figura 14** Producción de biomasa en medio GYS x4: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 en CML y CMS b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en CML y CMS.

**Figura 15.** Producción de esporas en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, CML y CMS; b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en medio LB, CML y CMS.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de las cepas *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en medio LB.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos del consumo de glucosa de la cepa de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en CML y CMS obtenidos en medio GYS.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de las cepas de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en medio GYS.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos del consumo de glucosa de la cepa de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en CML y CMS obtenidos en medio GYS x4.

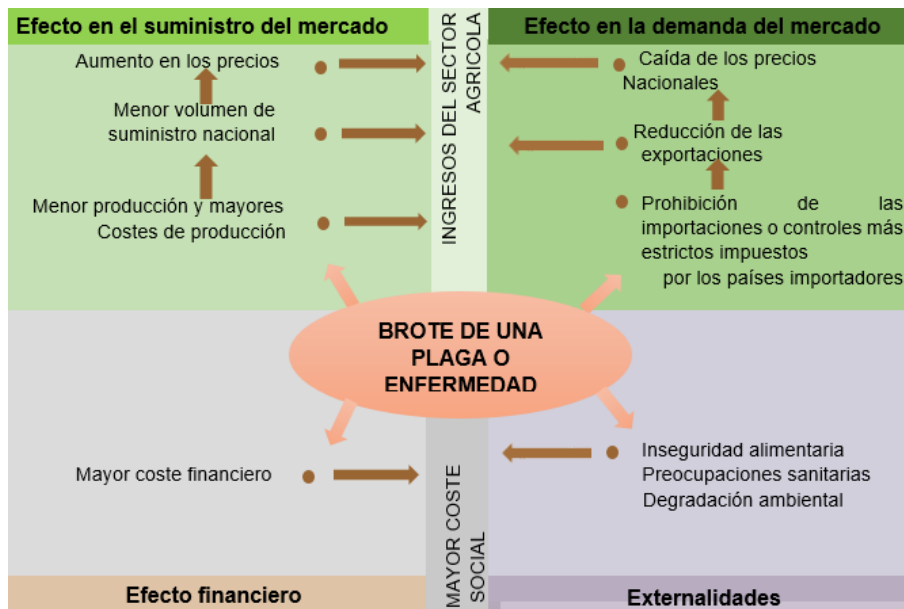
**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de las cepas de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en medio GYS x4.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PLAGAS Y SU EFECTO

Una plaga se define como cualquier especie animal que el hombre considera perjudicial a su persona, a su propiedad o al medioambiente. Dentro de éstas se encuentran las plagas de interés médico (zancudos, chinche besucona y otros parásitos y vectores de enfermedades humanas); plagas de interés veterinario (piojos y garrapatas del ganado); plagas caseras (cucarachas y moscas); plagas de productos almacenados (diversos insectos y roedores); y las plagas agrícolas que dañan los cultivos. Se considera como plaga agrícola a una población de animales fitófagos que disminuyen la producción del cultivo, reduce el valor de la cosecha o incrementa los costos de su producción (Cisneros, 1995).

Los daños provocados por las plagas han perjudicado a los agricultores desde el comienzo mismo de la agricultura. Estos daños pueden ser económicos (pérdida de productividad, ingresos e inversiones) y psicológicos (conmoción y pánico) (FAO, 2001). En la Figura 1 se muestran los efectos económicos que podrían causar las plagas de cultivos o enfermedades.



**Figura 1.** Efecto económico potencial de las plagas o de enfermedades transfronterizas.

**Fuente:** FAO, 2001.

## 1.2. MÉTODOS DE CONTROL DE PLAGAS

La implementación de las estrategias del control de plagas, sobre todo la reducción de las densidades de las poblaciones de insectos, requiere de la utilización de diversos métodos o técnicas de control. Estos métodos se suelen clasificar según su naturaleza de la siguiente manera (Cisneros, 1995):

- Control Mecánico: Uso de barreras.
- Control Físico: Uso de altas o bajas temperaturas.
- Control Cultural: Utilización de prácticas agronómicas y plantas resistentes.
- Control Biológico: Uso de predadores, parasitoides y patógenos.
- Control Químico: Uso de insecticidas.
- Control Etológico: Uso de trampas, feromonas.
- Control Genético: Hibridaciones estériles.

## 1.3. CONTROL BIOLÓGICO

En México el uso indiscriminado de plaguicidas químicos en los cultivos agrícolas ha generado altos niveles de contaminación. Estos productos químicos generalmente no se degradan y persistentes en la naturaleza, lo que ocasiona daños no sólo al ambiente sino también a los humanos expuestos a estos productos químicos, según la Secretaría de Salud en diciembre de 2014 se reportaron 4424 muertes debido a intoxicaciones por plaguicidas. La exposición a dichos plaguicidas tiene varias consecuencias a la salud, como la disminución de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que termina el efecto neurotransmisor de la acetilcolina, los cambios en su concentración o propiedades se relacionan con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson aunque estas no son la causa de la enfermedad (López et al, 2007). Además de intoxicaciones cabe mencionar la capacidad de algunas plagas a desarrollar resistencia a estos compuestos, ejemplo de ello es la múltiple resistencia a plaguicidas de *Anopheles gambiae*, mosquito que es uno de los mayores vectores de malaria en la zona sub-Saharan de África, el cual es resistente a carbamatos y derivados, organofosforados, y Pirimifos metil (Aïkpon et al, 2014). Otro ejemplo de ello es la resistencia de *Bemisia tabaci* (mosca blanca) biotipo Q a los plaguicidas derivados de ácido nicotínico y de piridina (Horowitz et al, 2005).

En la necesidad de tener plaguicidas que no generen los problemas ya mencionados, se introduce el uso del control biológico de plagas. Este concepto se define como el uso de

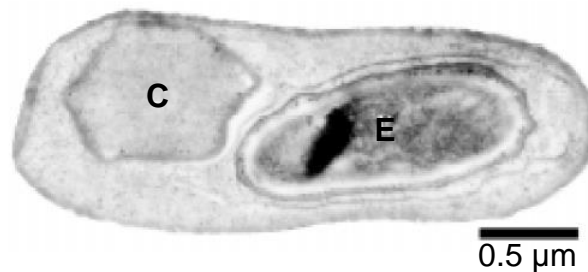
enemigos naturales y microorganismos para el control poblacional de la plaga (Nicholls, 2008). Esta técnica de control de plagas tiene menor impacto ecológico, menor riesgo en cuanto a salud y posee una alta especificidad en cuanto a la plaga a combatir, lo cual es de mucha utilidad para la agricultura en México pues al ser un proveedor a nivel internacional de algunos cultivos, el control biológico le da un valor agregado a los productos.

Los organismos utilizados para el control biológico son: insectos, virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos. Dentro del grupo de las bacterias el género *Bacillus* se han estudiado algunas especies como: *B. popilliae* especie renombrada como *Paenibacillus popilliae*, dicho bacilo tiene efecto contra *Papuana uninodis*, el cual es un escarabajo que afecta a la planta del taro (*Colocasia esculenta*) y a otras aráceas, plátano y papa (Theunis y Aloali'i, 1999). Otra de las especies de bacilos estudiadas es *B. sphaericus*, dicha bacteria produce una toxina binaria con una alta actividad contra larvas de *Culex uinquefasciatus* (Hire et al, 2010); *B. licheniformis* tiene la capacidad de producir quitinasas con potencial para producir lisis celular de algunos hongos fitopatogenos (Gomma, 2012); *B. subtilis* produce compuestos con actividad antibiótica y antifúngica contra especies como *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotium* (Araujo et al, 2005); finalmente, *B. thuringiensis* tiene la capacidad de producir metabolitos con propiedades insecticidas. Todos los microorganismos mencionados anteriormente se han utilizado como agentes de control biológico, sin embargo la última especie es la más utilizada al tener un rango de acción más amplio que los demás organismos y por la inocuidad que presenta hacia otros organismos no objetivo y para el mismo ser humano (Martin y Travers, 1989; Palma et al, 2014).

#### **1.4. *Bacillus thuringiensis* (Bt)**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram positiva que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 1 a 1.2  $\mu\text{m}$  de ancho, tiene la capacidad de producir esporas, proteasas, quitinasas, proteínas insecticidas vegetativas (VIPs) y proteínas Citolíticas (Cyt) (Bravo et al, 2007), sin embargo la característica principal de Bt es la producción de un cristal de naturaleza proteica denominada proteína Cry. Las toxinas Cyt y Cry son conocidas también como toxinas formadoras de poro (PFT) debido al modo de acción en los insectos hospederos. La  $\delta$ -endotoxina o proteína Cry puede formar del 20 al 30% del peso seco de las células esporuladas aunque la expresión de los genes *cry*, pueden o no depender del proceso de esporulación (Schnepf et al, 1998). En la Figura 2 se observa la morfología de un bacilo, a

través de microscopía electrónica de transmisión. Li y colaboradores (1991) determinaron la estructura de la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis por difracción de rayos X la cual consiste en 3 dominios. El dominio I es un conjunto de 7  $\alpha$ -hélices en la que la hélice central es hidrofóbica y está rodeada de 6 hélices anfipáticas, este dominio helicoidal es el responsable de la inserción en la membrana del intestino medio del insecto y la formación del poro; el dominio II consta de 3 láminas  $\beta$  antiparalelas y el dominio III conformado por otra sección de láminas denominado  $\beta$ - sándwich



**Figura 2.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *B. thuringiensis* en estado de esporangio. C: cristal parasporal (proteína Cry); E: espora. **Fuente:** Sauka y Benintende (2008)

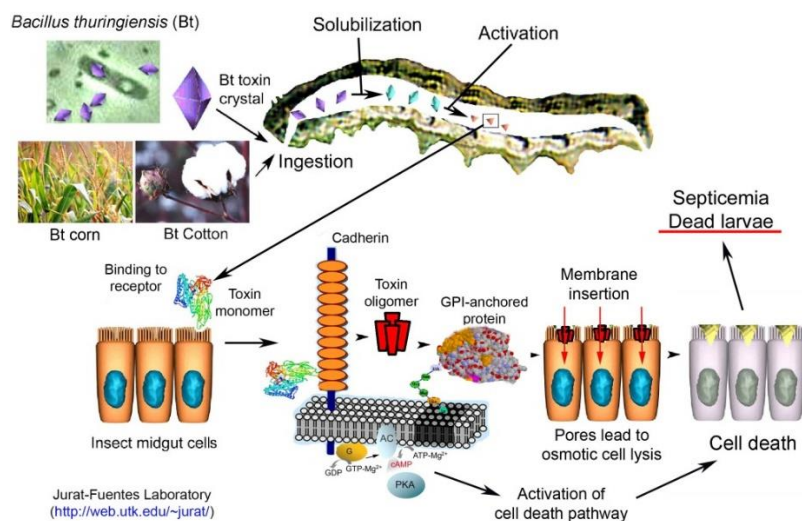
Se ha demostrado que la proteína Cry es tóxica para insectos de los órdenes de: *Coleóptera*, *Lepidóptera* (Dulmage y Aizawa, 1982) y *Díptera* (Lambert y Perferoen, 1992) y se considera un microorganismo ubicuo por la diversidad de lugares donde ha sido aislado, habitando normalmente en el suelo, pero también aislado de hojas de plantas e insectos (Dulmage y Aizawa, 1982; Smith y Couche, 1991). Debido al amplio hábitat en el que se encuentra, se han aislado distintas sub-especies de Bt, permitiendo tener un uso local de la sub-especie y así no afectar la carga microbiológica de los suelos en los que se aplica, además de tener la ventaja de estar “aclimatada” a la zona.

#### 1.4.1. CICLO INFECTIVO

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se ha descrito principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Primero la  $\delta$ - endotoxina se sintetiza en forma de protoxina dentro de Bt, una vez que es ingerido por el insecto blanco, el microcristal se disuelve en el pH alcalino del intestino medio y la protoxina es procesada por una proteasa del intestino para liberar la toxina activa. Se han descrito cuatro diferentes proteínas de



unión en diferentes insectos lepidópteros: caderina, glicofosfatidil inositol (GPI) anclado a una aminopeptidasa, GPI anclado a una fosfatasa alcalina y un glicoconjugado. Estos receptores varían de acuerdo al tipo de insecto y la unión a cada uno de ellos dependerá del tipo de proteína Cry utilizada. Generalmente el dominio II de la toxina promueve la unión tanto a proteínas caderinas como a aminopeptidasas, mientras que el dominio III promueve la unión a aminopeptidasas. Una vez que se ha unido a estos receptores se da un proceso de oligomerización de la proteína donde el dominio I de la toxina actúa para poder insertarse en la membrana del intestino medio (Bravo et al 2007) causando la formación de un poro, que lleva al desequilibrio osmótico que resulta del influjo del agua y cationes u otras pequeñas moléculas. El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto (Gill et al, 1992). En la Figura 3 se muestra un esquema del ciclo infeccioso de las proteínas Cry de Bt



**Figura 3.** Ciclo infeccioso de proteínas Cry de Bt. **Fuente:** Jurat-Fuentes (2014).

### 1.4.2. PRODUCCIÓN DE Bt

En la producción de Bt comúnmente se utiliza glucosa como fuente de carbono, sin embargo también se utiliza almidón, sacarosa y glicerol. Además de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno es muy importante, las fuentes más habituales de nitrógeno en los medios son proteína de semillas de maíz, harinas de pescado, semilla de algodón y en ocasiones los medios se suplementan con extracto de peptona o levadura. Con respecto a los requerimientos minerales han enfatizado la importancia de  $Mn^{+2}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  (King et al, 1996). Goldberg y colaboradores (1980) describieron un medio de fermentación para la producción del complejo espora- toxina de Bt, dicho medio contenía glucosa (30 g/L), peptona de soya (2.0 g/L), extracto de levadura (4.5 g/L), líquido de remojo de maíz (5.0 mL/L), KCl, (3.0 g/L),  $(NH_4)_2SO_4$  (3.0 g/L),  $H_2PO_4$  (7 mL/L),  $MgSO_4$  (2.0 g/L),  $CaCl_2 \cdot H_2O$  (36 mg/L),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (13.5 mg/L),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (7.5 mg/L),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (7.5 mg/L),  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (40 mg/L). Con él obtuvieron  $4 \times 10^9$  UFC/mL en 60 horas de operación aproximadamente. Bing-Lan y Yew-Min (1998) determinaron las concentraciones óptimas de tapioca, harina de pescado y  $(NH_4)_2SO_4$  para la producción de esporas de Bt, las cuales fueron de 5,01% tapioca; 5,86% de harina de pescado y 0,06%  $(NH_4)_2SO_4$  obteniendo  $8,56 \times 10^8$  esporas/mL. Otro medio propuesto para la producción de las esporas está compuesto de NaCl 5g/L,  $Na_2HPO_4$  2.5 g/L, glucosa 4g/L y milhocina 20g/L con el cual se obtienen rendimientos de  $3 \times 10^8$  UFC/ml para Bt var. israelensis (Ernandes et al, 2013)

La forma de producción de la toxina de Bt es comúnmente por medios líquidos como los descritos por Dulmage y De Barjac (1973) identificados como B-4, B-4b y B-8, todos contenían 0.2% de peptona, 1.5% de glucosa, 0.02% de extracto de levadura y sales minerales, la diferencia era que el primer medio estaba adicionado con 1% semilla de algodón, el segundo medio con 2% semilla de algodón y el tercer medio 2% de semilla de algodón y 1% de líquido de remojo de maíz, bajo estas condiciones se obtiene una actividad de 2,000 UI/L de la toxina.

### 1.5 CULTIVOS SOLIDOS

Los cultivos solidos han generado gran interés debido a que este proceso se ha convertido en una herramienta biotecnológica importante para la producción de diferentes bioproductos como enzimas, ácidos orgánicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, biopesticidas, entre otros (Mitchell et al, 2000).

El uso de cultivos sólidos en la industria de bioinsecticidas ofrece ciertas ventajas en cuanto al cultivo líquido, como abaratar costos, reducir riesgo de contaminación y un posible aumento en rendimiento de los compuestos de interés. López et al, (2010) compararon la producción de biomasa y lacasa de *Pichia pastoris* en cultivo sólido (CMS) y líquido (CML), encontrando que a niveles altos de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) la producción de biomasa es mayor en CMS, ya que esta presenta una relación de área/volumen(A/V) mayor que en CML, lo cual permite una mayor transferencia de oxígeno. En este trabajo se utilizó el mismo medio de cultivo en ambos sistemas, pero en CMS el medio líquido se impregno en un soporte inerte como la espuma de poliuretano (PUF), lo que permitió la comparación de rendimientos sólo en función del tipo de cultivo (CMS o CML).

Con base en estos resultados se podría esperar un comportamiento similar en cultivos sólidos con *Bacillus thuringiensis* y la producción del complejo espora cristal, ofreciendo una alternativa a la industria para la producción de este complejo y su uso en la elaboración de bioinsecticidas. Esto sería particularmente importante en medios con concentraciones altas de fuentes de carbono o nitrógeno, que además sean de costo bajo como los que se mencionaron anteriormente, incluyendo harinas y materia orgánica concentrada (Ernandes et al, 2013; Adams et al. 2002).

## 2. ANTECEDENTES

*Bacillus thuringiensis* es un microorganismo ubicuo con la capacidad de producir un cristal de naturaleza proteica, que es tóxico para algunos insectos plaga y no genera daño a la salud humana. Esta característica se utiliza para la producción de insecticidas biológicos que procuren el medio ambiente. La gran cantidad de variedades de Bt y de proteínas Cry que producen permite la formulación de diferentes bioinsecticidas y disminuir la aparición de mecanismos de resistencia por parte de los insectos.

Los beneficios económicos de la producción de Bt han sido motivo de investigación y su aplicación biotecnológica, proponiendo una gran cantidad de métodos para la mejora en la producción de esporas y proteína Cry. Convencionalmente la producción de toxinas y esporas de Bt se realiza en fermentación líquida en procesos batch, sin embargo estos procesos poseen características que brindan una desventaja frente a otros tipos de cultivo; entre las principales desventajas se encuentran los altos riesgos de contaminación, el uso de altas concentraciones de sustrato pueden afectar el crecimiento debido al aumento de presión osmótica ejercida en los microorganismos generando una alta demanda biológica de oxígeno y limitando la transferencia del mismo en el medio, además de que los altos requerimientos de energía durante los procesos de homogenización y los procesos de separación aumentan los costos de operación, otra desventaja de utilizar este tipo de procesos son los tiempos muertos entre cada lote lo cual disminuye la productividad del proceso. Debido a ello se buscan alternativas de producción de Bt, entre dichas alternativas se encuentra el cultivo en medio sólido. La producción en este sistema de cultivo logra superar algunas de las limitaciones anteriormente mencionadas que se presentan en CML. Una de ventaja de los CMS es la disminución de costos de operación al utilizar residuos agroindustriales como sustrato o lodos de aguas residuales y en otros casos el uso de medios definidos adicionados con algún sustrato sólido, obteniendo con ello altos rendimientos de producción del metabolito analizado.

En los últimos años se han desarrollado metodologías para la producción de esporas y proteína Cry de Bt utilizando CMS en diferentes sustratos o soportes. Investigaciones realizadas por Zhuang y colaboradores (2011) y Adams y colaboradores (2012) utilizaron como sustratos mezclas de lodos de aguas residuales y salvado de trigo; y guano de pollo sometidos a distintas dietas alimenticias respectivamente, bajo dichas metodologías los autores reportan una producción de esporas de  $5.26 \times 10^{10}$  UFC/g (producción de células

vegetativas de  $5.98 \times 10^{10}$  UFC/g) y  $1.5 \times 10^9$  esporas/g de guano respectivamente. Bajo una metodología de cultivo bifásico (CML y CMS) Jisha y colaboradores (2015) utilizaron medio Luria-Bertani (LB) suplementado con harina de soya (30% p/v) con lo cual obtienen 16mg de tóxina/mL de LB-equivalente y  $1.45 \times 10^{10}$  esporas/ mL de LB-equivalente. Por otra parte Wu y colaboradores (2014) utilizaron sustratos como salvado de trigo, cascara de semillas de algodón y aserrín suplementado con extracto de levadura y sales minerales con los cuales obtuvieron  $1.25 \times 10^{11}$  esporas/ g de sustrato.

De acuerdo a lo reportado se observa que el CMS es una alternativa viable para la producción de esporas y toxina de Bt alcanzando valores por encima de los reportados para CML, además de ellos se observa que hay una variedad de sustratos o soportes en los cuales se puede llevar a cabo el proceso, sin embargo, no se puede realizar una comparación justa entre los sistemas líquido y sólido habiendo diferencias notables en la composición de los medios.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El constante uso de insecticidas químicos para el control de plagas ha provocado un deterioro en el medio ambiente, provocando contaminación de suelo, aire y agua, incluyendo la persistencia de los mismos en los sitios contaminados, así como afectaciones en la salud del ser humano. Como alternativa al uso de estos insecticidas tradicionales se encuentra el control biológico, su uso ofrece beneficios tanto al medio ambiente como al ser humano. Para que esta técnica sea más eficiente se necesita que los microorganismos utilizados estén aclimatados al lugar donde se aplicarán.

*Bacillus thuringiensis* Y15 y EA3 son cepas aisladas del estado de Morelos (Alquisira-Ramírez et al, 2014; Fonseca et al, 2013). Esta bacteria es de las más ampliamente estudiadas y utilizadas en el control biológico de plagas, por lo que es necesario desarrollar un sistema de producción adecuado, que incluya una alternativa a un cultivo líquido que es como se produce industrialmente. El presente trabajo aportará estudios comparativos de la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* Y15 y EA3 en cultivo líquido y sólido, utilizando el mismo medio en ambos sistemas de producción, con énfasis en medios con composiciones diferentes o bien con medios concentrados, siendo éstos últimos donde podría presentarse ventajas en CMS. Es importante destacar que hay muy poca literatura acerca de la comparación de ambos sistemas utilizando el mismo medio de cultivo (CMS vs CML), además de aportar alternativas de cultivo a la industria.

### **4. HIPÓTESIS**

El cultivo sólido en medios con altas concentraciones de nutrientes propiciará un aumento en la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), en comparación con un cultivo líquido.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. GENERAL**

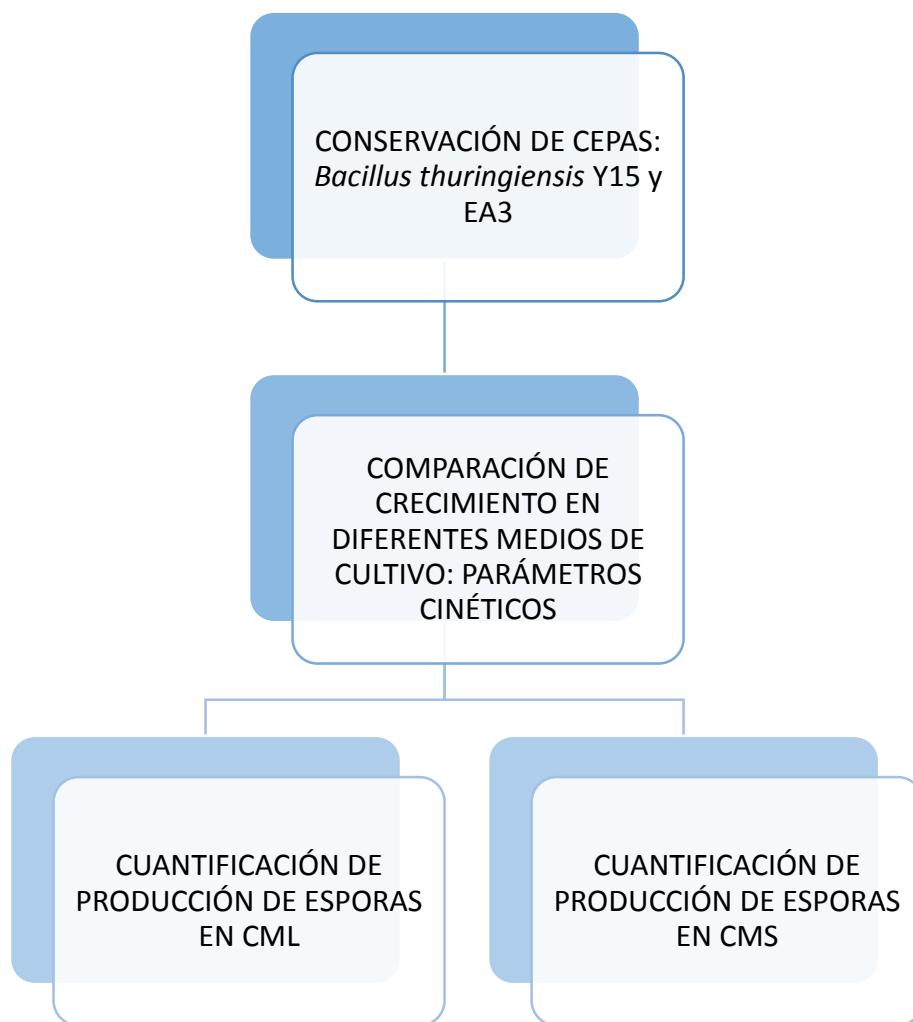
Comparar los rendimientos de producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en cultivo líquido y sólido.

### **5.2. ESPECÍFICOS**

- Conservar a mediano y largo plazo las cepas de Bt a utilizar.
- Comparar medios de distinta composición y concentración de nutrientes para producir esporas de las cepas de Bt.
- Comparar el rendimiento de esporas de Bt obtenidas por cultivo líquido y sólido.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



### 6.2. MICROORGANISMOS

Se utilizaron dos cepas de *Bacillus thuringiensis* identificadas como Y15 y EA3 (Esta última identificada como *B. thuringiensis* serovar tenebrionis). Estas cepas fueron aisladas de una región agrícola del estado de Morelos (Alquisira- Ramírez et al, 2014).

### 6.3 CONSERVACIÓN DE CEPAS

La conservación de cepas se realizó con papel filtro (Whatman 1) estéril el cual se impregnó con una solución de células de cada una de las cepas a utilizar totalmente esporuladas, este se dejó secar al aire en condiciones estériles y una vez secas las tiras se colocaron en



tubos Eppendorf estériles a 4° C hasta su nuevo uso (Sosa-López et al, 2011). Para determinar la viabilidad de los conservados se colocó una tira de papel filtro impregnado con esporas en matraces de 250 mL con medio LB y se realizaron conteos de células viables y esporas. El contenido de células viables en los diferentes tiempos de muestreo se determinó mediante la técnica de conteo en placa, para ellos se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  de cada muestra con solución salina al 0.85% (SSI). De cada muestra se tomaron 100µl y se diluyeron en 900µl de SSI, de las diluciones resultantes se sembró 100µl en placas de LB, estas se incubaron a 30°C de 12 a 18 horas para posteriormente a ello realizar el conteo de las colonias formadas, este conteo osciló entre 30 y 300 colonias por placa (Madigan, Martinko y Parker 2009). Para determinar el contenido de esporas, las diluciones realizadas para el conteo de células viables se sometieron a un tratamiento de choque térmico a 80°C durante 15 min y se enfriado durante 5 min antes de extenderse sobre placas de LB. Estas se incuban a 30°C de 12 a 18 horas para posterior a ello realizar el conteo de las colonias formadas, las colonias contadas en las placas fueron entre 30 y 300 (Zhuang, et al, 2011; Prabakaran y Balaraman .2006).

#### **6.4 MEDIOS DE CULTIVO**

Para la producción del complejo espora-cristal de las cepas utilizadas se utilizaron tres medios de cultivo diferentes: **1)** medio de cultivo LB (Luria- Bertani) el cual contiene (g/L), Bacto-triptona 15, NaCl 15 y Extracto de levadura 5, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 2M; **2)** Medio GYS que contiene (g/L): glucosa 30; extracto de levadura 12;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.12;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.09;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 (Berbert-Molina et al, 2008). **3)** Medio GYS x4 que fue veces más concentrado que el medio GYS. El crecimiento y producción de esporas se monitoreó en un lapso de 72 horas. Todos los medios fueron esterilizados antes de su uso; en el caso de los medios con glucosa se realizó la solución concentrada de está y se esterilizó por separado.

## **6.4.1. PREPACION DE INÓCULO**

### **6.4.1.1. MEDIO LB**

Para los ensayos con medio LB el inóculo se creció en placas de LB-agar hasta su total esporulación, con el asa bacteriológica se inoculó el medio LB líquido dejándolo 12 horas en agitación a 150 rpm a 30°C.

### **6.4.1.2. MEDIO GYS**

Para los ensayos con medio GYS y GYS x4 se preparó inicialmente un pre-inóculo con medio LB siguiendo la metodología para el inóculo del medio anterior, en este caso el pre-inóculo con medio LB se mantuvo estático a 30°C por 15 horas. Después de este tiempo se inocularon los medios GYS o GYS x4 con 5% v/v del pre-inóculo, este se incubó a 30°C en agitación de 150 rpm por 6 horas.

## **6.5. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN**

### **6.5.1 CULTIVO LÍQUIDO**

Como unidades experimentales se utilizaron 42 matraces de 250 mL a los que se agregaron 22 mL de medio LB y 3 matraces con 23 mL de medio LB para los controles por cepa, estos se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 15 lb de presión. Los matraces estériles se inocularon con 1 mL del cultivo antes descrito. Los matraces fueron incubados en agitación constante a 200 rpm a 30°C por 72 horas. Se colectaron muestras a las 0, 0.5, 1, 1.5, 3, 4, 5, 7, 8, 21, 24, 30, 48, 72 horas de cultivo. Del volumen recuperado se tomaron 2 mL y se colocaron en tubos Eppendorf para realizar el conteo de esporas. Del volumen restante se tomaron 15 mL para determinar el contenido de biomasa por peso seco en los diferentes tiempos de muestreo, considerando el volumen inicial del cultivo de 23 mL. Este procedimiento se siguió para ambas cepas. El mismo procedimiento se siguió para el medio GYS y GYS x4. Para el medio GYS x4 se disminuyó la cantidad de PUF de 1.5 a 1 g con la finalidad de disminuir la altura de lecho, con dicho ajuste se utilizó 14.6 mL de medio y 0.7 mL de inóculo, manteniendo la relación de volumen de medio, PUF e inóculo.

### **6.5.2 CULTIVO SÓLIDO**

Para los cultivos sólidos se empleó la metodología propuesta por López et al, (2010), se utilizó espuma de poliuretano (PUF) como soporte, el cual se impregnó con el mismo medio utilizado en los cultivos líquidos. En 42 matraces de 250 mL que contenían 1.5 g de cubos secos de PUF, de 0.7 cm por lado, se agregaron 22 mL de medio previamente esterilizado. Antes de agregar el medio a la espuma se inoculó con 1 mL del cultivo descrito anteriormente (preparación inóculo LB) para ambas cepas de Bt. Las muestras fueron recolectadas a las 0, 1, 1.5, 3, 4, 5, 7, 8, 15, 21, 24, 30, 48 y 72 horas (por triplicado más tres matraces como controles). Para colectar la muestra se utilizó una jeringa de 60 centímetros cúbicos en la cual se introdujeron los cubos de PUF para ser exprimidos por el embolo de la jeringa. Del volumen recuperado se tomaron 2 mL y se colocaron en tubos Eppendorf para en conteo de esporas. Del volumen restante se tomaron 15 mL para la cuantificación de biomasa en peso seco (Viniegra- González et al, 2003). El mismo procedimiento se siguió para los medios GYS y GYS x4, para este último medio se decidió utilizar 1 g de PUF en lugar de 1.5 g para disminuir el lecho de altura del sistema, debido a ello se ajustaron los volúmenes de medio e inóculo de acuerdo al volumen total original de 23 mL, utilizando para este sistema 14.6 mL de medio y 0.7 mL de inóculo.

### **6.6. DETERMINACION DE BIOMASA**

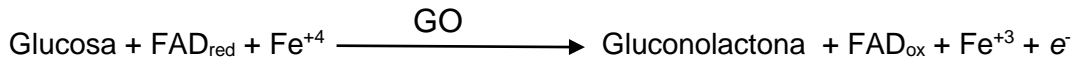
El crecimiento celular durante las 72 horas de cultivo se monitoreó por peso seco, a partir de la biomasa formada para lo cual se colocaron membranas de nylon (47 mm, 0.45  $\mu$ m, LUZEREN) a peso constante en estufa (Felisa) a 60° C. De cada tiempo de muestreo en los diferentes medios de cultivo y sistemas de producción, se tomaron 15 mL para ser filtrados, en el caso del medio GYS x4 se filtraron 10 mL, una vez terminado el proceso de filtrado las membranas se colocaron nuevamente en la estufa por 24 horas para obtener el peso seco de la biomasa.

### **6.7. DETERMINACION DE pH**

Se determinó el cambio de pH en las cinéticas realizadas con un potenciómetro Conductronic pH120 (México) del filtrado obtenido para la cuantificación de biomasa.

## 6.8 CONSUMO DE GLUCOSA

El consumo de glucosa fue monitoreado con un medidor OneTouch Ultra2 (Johnson & Johnson medical, LifeScan, Inc.) (biosensor de glucosa oxidasa) del filtrado recuperado con tiras reactivas OneTouch Ultra. Cada tira reactiva OneTouch Ultra contiene glucosa oxidasa (*Aspergillus niger*)  $\geq 0.08$  UI y ferrocianida  $\geq 22$   $\mu\text{g}$ . Una vez que la muestra entra en contacto con la tira reactiva, la enzima cataliza la oxidación de la glucosa a Gluconolactona mediante la siguiente reacción:



La reacción produce una pequeña corriente eléctrica. El medidor OneTouch Ultra mide esta corriente la cual cambia con la cantidad de glucosa contenida en la muestra. ([http://www.onetouchla.com/sites/default/files/OT\\_ULTRA\\_ESP\\_PORT\\_10.pdf](http://www.onetouchla.com/sites/default/files/OT_ULTRA_ESP_PORT_10.pdf)).

La obtención de parámetros como  $Y_{x/s}$  se determinó mediante el ajuste de los datos al modelo de Pirt (1965);

$$S(t) = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{x/s}} - \frac{mX_M}{\mu_M} \ln \frac{[X_M - X_0]}{[X_M - X]}$$

Donde:

$S_0$ = sustrato inicial

$X_0$ = Biomasa inicial

$X_M$ = Biomasa máxima

$X$ = Biomasa en tiempo  $t_i$

$m$ = coeficiente de mantenimiento celular

$\mu_M$ = tasa máxima de crecimiento específico.

$Y_{x/s}$ = rendimiento de producción de biomasa respecto al consumo de sustrato

## 6.9. CONTEO DE ESPORAS

Para determinar el contenido de esporas se realizaron diluciones seriadas en solución salina al 0.85% y se contaron en cámara de Neubauer en microscopio óptico a 40X (Madigan, Martinko y Parker 2009).

## 6.10. MODELOS DE AJUSTE

### 6.10.1. MODELO LOGÍSTICO

Las cinéticas de producción de biomasa en peso seco fueron ajustadas al modelo logístico de Velhurst- Pearl (Viniegra-González et al, 2003) expresado como;

$$X(t) = \frac{X_{max}}{\left[1 + \frac{X_{max} - X_0}{X_0} e^{-\mu t}\right]}$$

Los parámetros  $X_{max}$ ,  $X_0$  y  $\mu$  fueron calculados minimizando la suma de los mínimos cuadrados de los errores residuales, entre los valores estimados y los valores observados en los diferentes tiempos de muestreo en el programa Solver de Excel.

### 6.10.2. MODELO DE DOS FASES

Se utilizó un segundo modelo para las cinéticas en las cuales se observó lisis celular, este se ajustó por el modelo de Ikasari y Mitchell (1999) expresado como:

#### 1. FASE EXPONENCIAL:

$$X(t) = X_0 e^{\mu t}$$

#### 2. FASE DE DESACELERACIÓN:

$$X(t) = (X_{max} - X_f) e^{-K(t-t_0)} + X_f$$

Donde  $X_0$  es la biomasa al tiempo cero,  $\mu$  tasa específica de crecimiento,  $X_{máx}$  biomasa máxima,  $X_f$  biomasa al final del proceso de lisis celular,  $t_0$  tiempo en que comienza el proceso de lisis celular,  $K$  tasa específica de lisis celular. Los parámetros  $X_{max}$ ,  $X_0$ ,  $\mu$ ,  $X_f$ ,  $t_0$  y  $K$  fueron calculados minimizando la suma de los mínimos cuadrados de los errores residuales, entre los valores estimados y los valores observados en los diferentes tiempos de muestreo en el programa Solver de Excel.

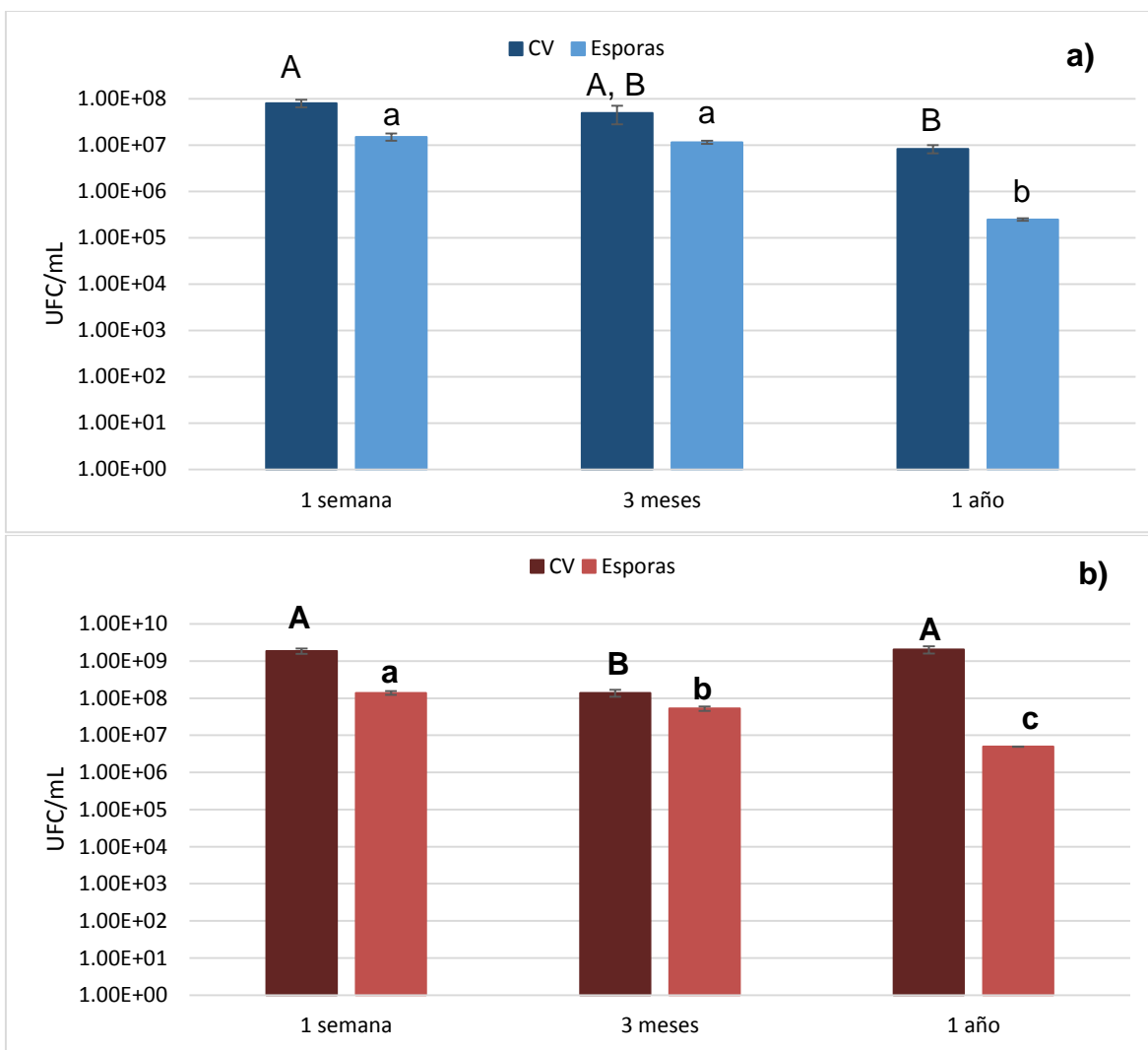
## 6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La comparación de los tiempos de conservación se analizó por la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Los ajustes de producción de biomasa a los modelos ya mencionados y los ajustes de consumo de sustrato se realizaron con el complemento Solver y el analizador de datos para regresión multivariada del programa Excel.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. CONSERVACIÓN DE CEPAS

Para determinar la eficiencia del método de conservación se realizó el conteo de células vegetativas y esporas a las 30 horas de la reactivación de las cepas en medio LB. En la Figura 4 se muestran los perfiles de producción de células vegetativas (CV) y esporas después de 1 semana, 3 meses y un año, a partir del momento de conservación de las cepas de *Bacillus thuringiensis* Y15 y EA3.



**Figura 4.** Conservación de cepas: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 cuenta de células vegetativas (barras azul marino) y esporas (barras azul cielo), b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 cuenta de células vegetativas (barras color vino) y esporas (barras rosa oscuro),

durante el tiempo de conservación. Los valores con letras distintas presentan diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ )

De acuerdo a los resultados, no se encuentra diferencia significativa respecto al conteo de CV de la cepa EA3 en la evaluación de los conservados después de 1 semana y 3 meses, sin embargo, al año de conservación el conteo de CV es 9.69 veces menor significativamente con respecto a la semana de conservación, pero no a los 3 meses de la misma (Figura 4a). La producción de esporas una semana y tres meses después del inicio de conservación son estadísticamente iguales, sin embargo la producción de esporas después de un año de conservación difiere de los tiempos anteriores teniendo una menor producción (60 veces menor).

Los resultados para la evaluación del método de conservación para la cepa Y15 se muestran en la Figura 4b. Se observa que la viabilidad de las células vegetativas de la cepa Y15 después de una semana y un año de conservación son estadísticamente iguales, no así con la conservación a los 3 meses, el cual difiere significativamente de los dos tiempos de conservación ya mencionados. El conteo de esporas en los tres tiempos de evaluación del método de conservación fueron estadísticamente diferentes, los cuales disminuyen alrededor de un orden de magnitud en cada tiempo de evaluación después de una semana de conservación, 2.6 veces después de 3 meses y 27.8 veces después de un año de conservación. De acuerdo a ello, el método utilizado no es adecuado para la conservación a mediano y largo plazo de la cepa Y15.

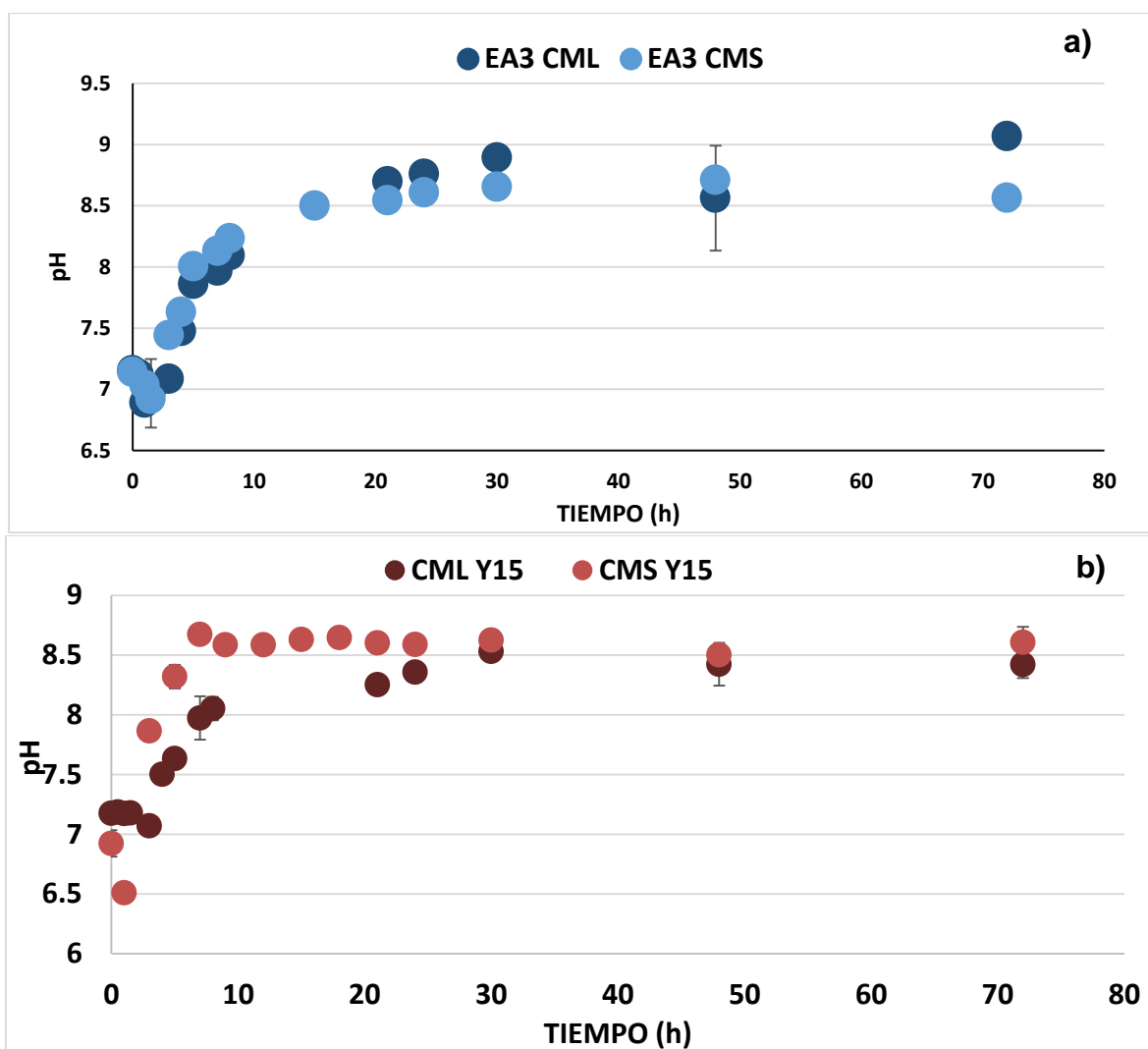
## **7.2 MEDIO LB**

A partir de esta sección se mostrarán los resultados correspondientes a las cinéticas de producción de ambas cepas de Bt en medio LB, mostrando la evolución de pH, biomasa, células vegetativas y esporas en ambos sistemas de producción.

### **7.2.1 EVOLUCIÓN DE pH**

La evolución de pH de las cepas de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en ambos sistemas de cultivo se muestra en la Figura 5. Se observa que al utilizar medio LB la cepa EA3 tiene un comportamiento similar a lo largo del proceso en ambos sistemas de cultivo, donde hay una pequeña etapa de descenso de pH durante las primeras horas de inicio de la cinética, y al mismo tiempo comienza el aumento del mismo en ambos sistemas de cultivo. Al tiempo

final el pH en el CML es ligeramente mayor en comparación al CMS (9 y 8.5 respectivamente) (Figura 5a).



**Figura 5.** Evolución del pH durante el cultivo en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo); b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos rosa oscuro).

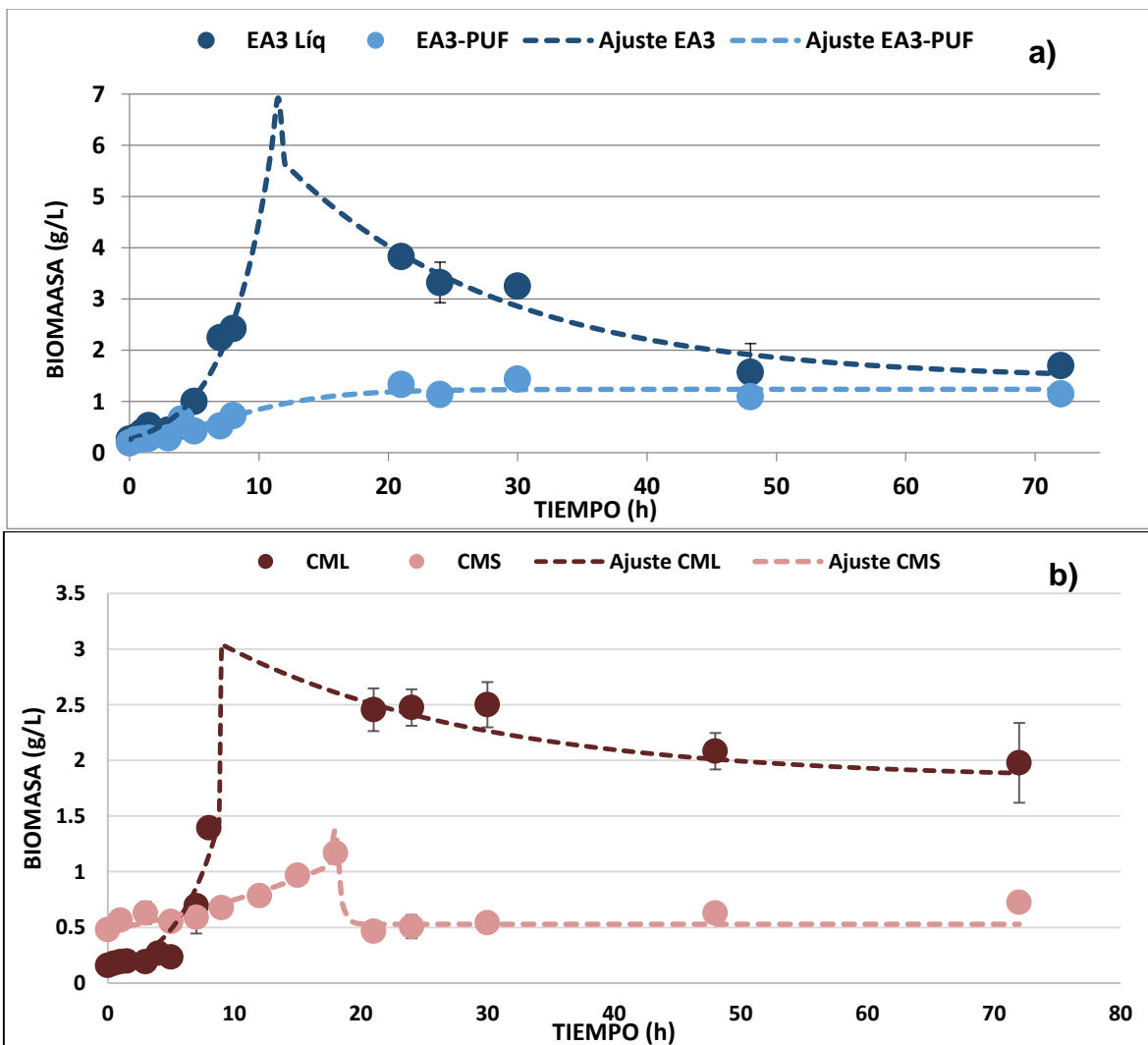
El comportamiento del pH en los cultivos con la cepa Y15 fue similar al observado para la cepa EA3. Se observa que en cultivo líquido (CML) el pH alcanza un valor máximo de aproximadamente 8.4 a partir de la hora 24, después de las cuales dicho valor es prácticamente constante por el resto de la fermentación; más el perfil de pH en cultivo sólido (CMS) alcanza su máximo valor aproximadamente a las 9 horas de cultivo con un valor de



aproximadamente 8.5 y al igual que el cultivo líquido, este valor permanece prácticamente constante por el resto de la fermentación (Figura 5b).

## 7.2.2. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

El crecimiento de biomasa en el medio LB de Bt EA3 en CML es mayor comparativamente con el crecimiento en CMS. Además de la diferencia en la biomasa máxima se observa un proceso de lisis celular en el cultivo líquido que no es apreciable en el cultivo sólido (Figura 6a).



**Figura 6.** Producción de biomasa en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 en Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo) b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en Cultivo en medio líquido (Puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos color rosa oscuro).

Los perfiles de la cepa EA3 también fueron similares para la cepa Y15 producción máxima de biomasa (3.05 g/L) en cultivo líquido es menor a la producida por la cepa EA3 en el mismo sistema (5.682 g/L). A diferencia de los cultivos con la cepa EA3, la cepa Y15 en ambos sistemas de producción muestra un proceso de lisis celular (Figura 6b).

De acuerdo al comportamiento de cada curva se realizaron los ajustes a los modelos ya mencionados, el cultivo líquido se ajustó el modelo de doble exponencial y el cultivo sólido se ajustó con el modelo logístico. Con dichos ajustes se obtuvieron los parámetros que se muestran en Tabla 1, de acuerdo con los cuales la mayor producción de biomasa que se obtiene con medio LB para la cepa EA3 es en cultivo en medio líquido, con una media de 5.68 g/L (4.58 veces mayor que en cultivo en medio sólido). Como se mencionó anteriormente, en este cultivo se observa claramente un proceso de lisis celular, el cual comienza alrededor de las 11.8 horas de cultivo con una tasa de lisis celular de ( $k$ ) 0.059 h<sup>-1</sup>.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de las cepas *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en medio LB.

Parámetros	EA3		Y15	
	CML	CMS	CML	CMS
$X_0$ (g/L)	0.262±0.015	0.21±0.0162	0.113±0.019	0.473±0.214
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	5.682±0.470	1.23±0.053	3.050±0.438	1.428±0.091
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.284±0.0074	0.234±0.012	0.288±0.025	0.045±0.039
$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.059±0.015	NA	0.048±0.028	2.719±1.656
$r^2$	0.968	0.933	0.984	0.870
TD (h)	2.44	2.96	2.400	15.187
P (g/Lh)	0.437	0.059	0.305	0.079

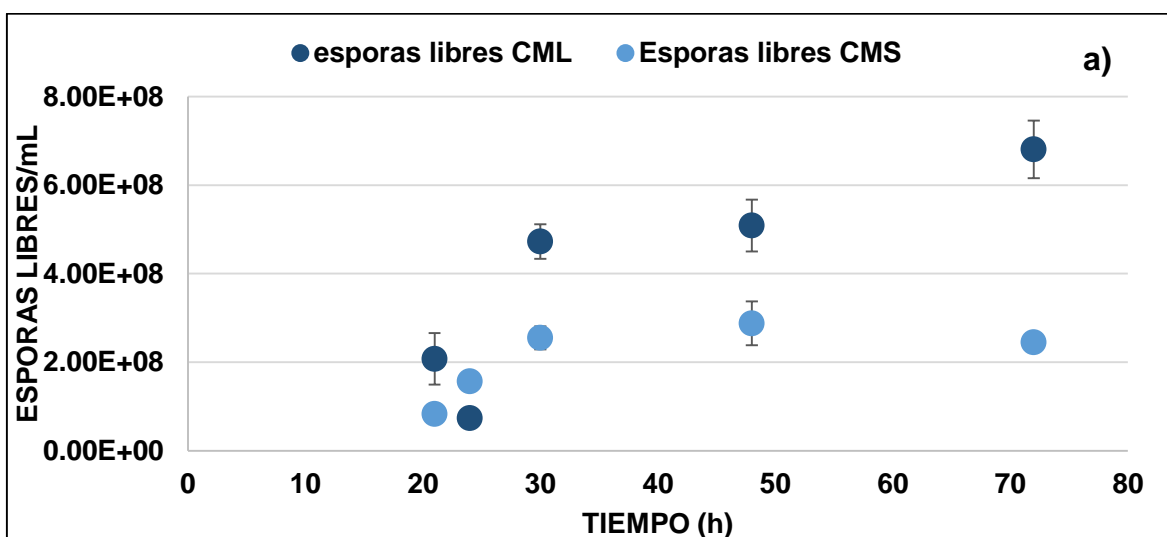
$X_0$  Biomasa inicial,  $X_{m\acute{a}x}$  Biomasa máxima,  $\mu$  tasa específica de crecimiento,  $k$  tasa específica de lisis celular, TD tiempo de duplicación celular, P productividad.

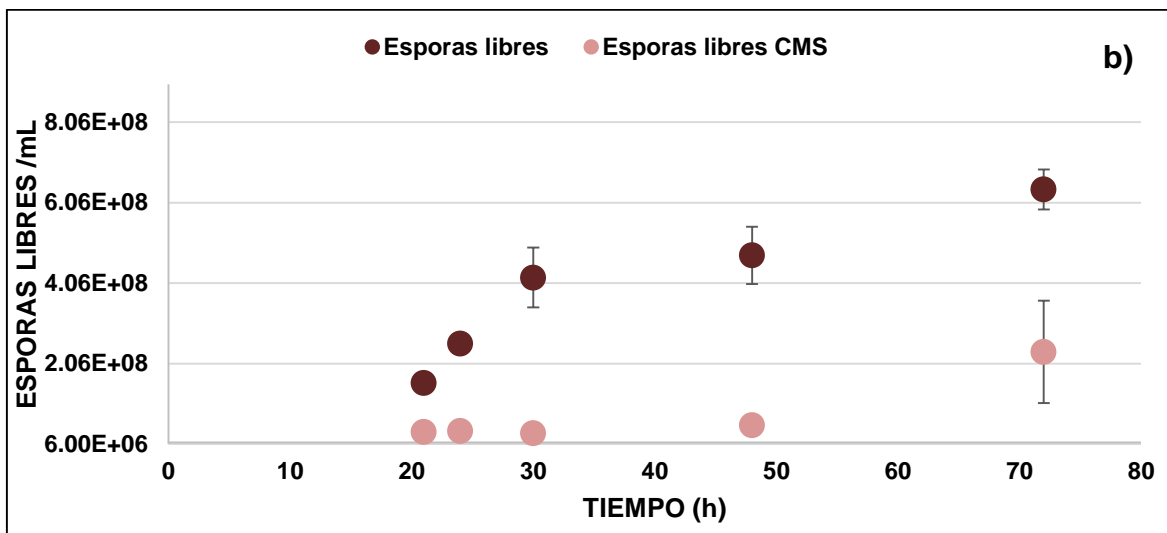
De acuerdo a la Tabla 1 la cepa EA3 aumenta el tiempo que tarda en duplicarse de 2.44 horas en cultivo líquido a 2.96 horas en cultivo sólido (31 minutos), este aumento en el tiempo de duplicación repercute en el tiempo en el que se alcanza la biomasa máxima; en cultivo líquido este tiempo es menor (aproximadamente 13 horas) respecto al tiempo en el que se alcanza la producción máxima de biomasa en cultivo sólido (18-20 horas aproximadamente) siendo el cultivo líquido 7.4 veces más productivo que el cultivo sólido

en cuanto a la producción de biomasa. Por otra parte la cepa Y15 tiene un tiempo de duplicación de 2.40 horas en CML, tiempo similar al de la cepa EA3 (2.44 h) en el mismo sistema de cultivo, mientras que el tiempo de duplicación en CMS es 6.32 veces mayor, como se mencionó el tiempo de duplicación tiene efecto en la producción de biomasa, motivo por el cual puede aumentar o disminuir la productividad del medio y del sistema de cultivo, resultado de ello se obtiene una productividad 3.86 veces mayor en cultivo líquido de la cepa Y15 en comparación con el cultivo sólido.

### 7.2.3 PRODUCCION DE ESPORAS

En la Figura 7a se muestra las cinéticas de producción de esporas para la cepa EA3 en ambos sistemas de cultivo con medio LB. Se observa que la cantidad de esporas por mL en medio líquido ( $6.81 \times 10^8 \pm 6.53 \times 10^7$ ) es mayor a las presentes en medio sólido ( $2.88 \times 10^8 \pm 4.95 \times 10^7$ ), alcanzando su máximo nivel a las 72 horas de cultivo mientras en CMS se alcanza la máxima producción a las 48 horas.





**Figura 7.** Producción de esporas en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo); b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en medio LB, Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos color rosa oscuro).

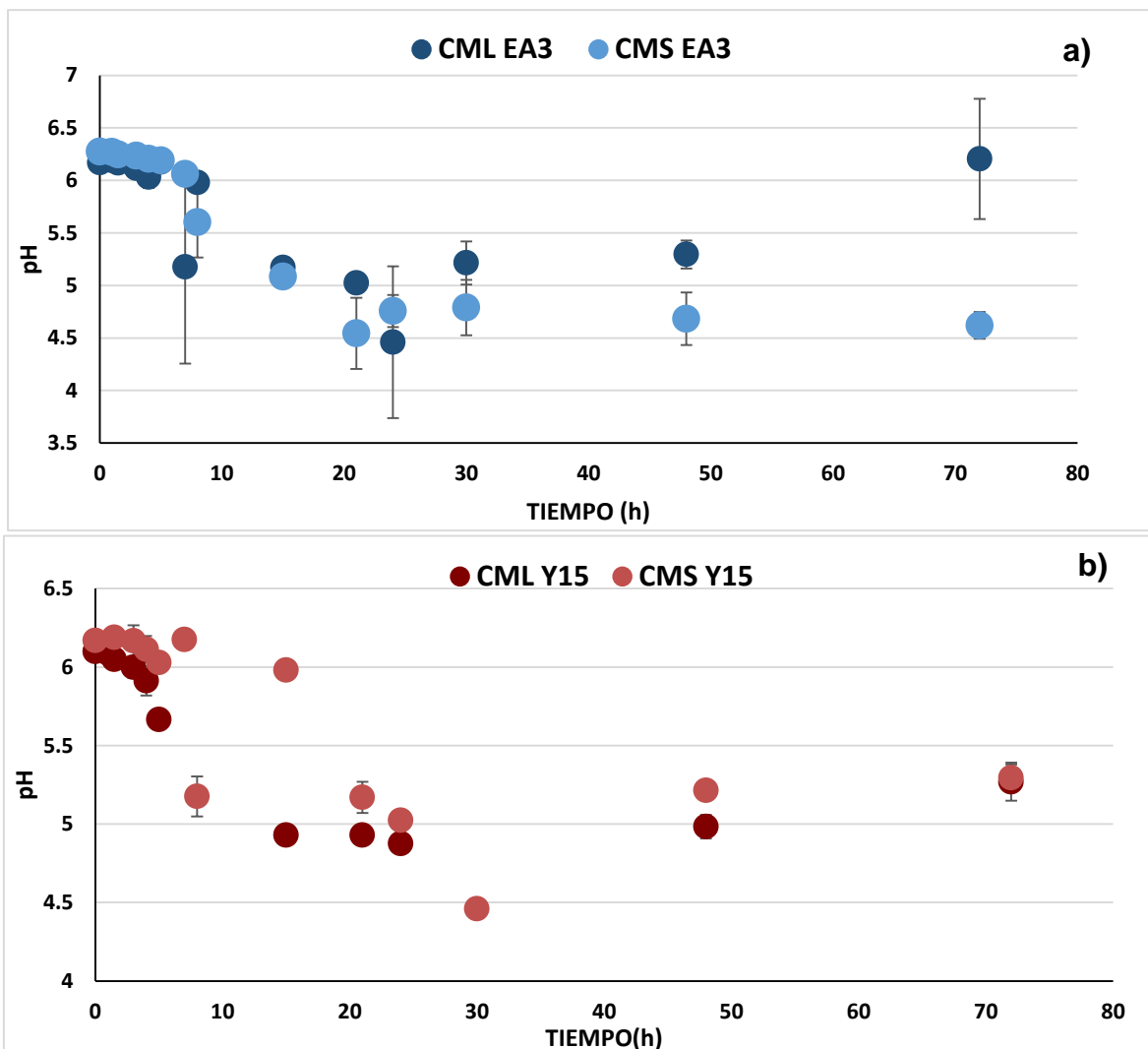
Utilizando medio LB, la cepa Y15 muestra la máxima producción de esporas por mL en cultivo líquido aproximadamente a las 48 horas ( $4.75 \times 10^8 \pm 7.12 \times 10^7$ ), mientras que en cultivo sólido la máxima producción se alcanza a las 72 horas ( $2.35 \times 10^8 \pm 1.27 \times 10^8$ ) siendo 2.7 veces menor la cantidad presente en CML (Figura 7b).

### 7.3 MEDIO GYS

A partir de esta sección se mostrarán los resultados correspondientes a las cinéticas de producción de ambas cepas de Bt en medio GYS, mostrando la evolución de pH, consumo de glucosa, producción de biomasa, células vegetativas y esporas en ambos sistemas de producción.

### 7.3.1 EVOLUCIÓN DE pH

Los cultivos de las cepas Y15 y EA3 en medio GYS muestran un descenso en los valores iniciales de pH de hasta 2 unidades, mientras en medio LB el descenso de pH en las primeras horas de cultivo era prácticamente imperceptible en medio GYS es claramente notable, dicho descenso llega a durar hasta 30 horas y prácticamente en los cuatro cultivos los valores de pH se mantienen constantes después de alcanzar el mínimo valor de dicho factor (Figura 8a).



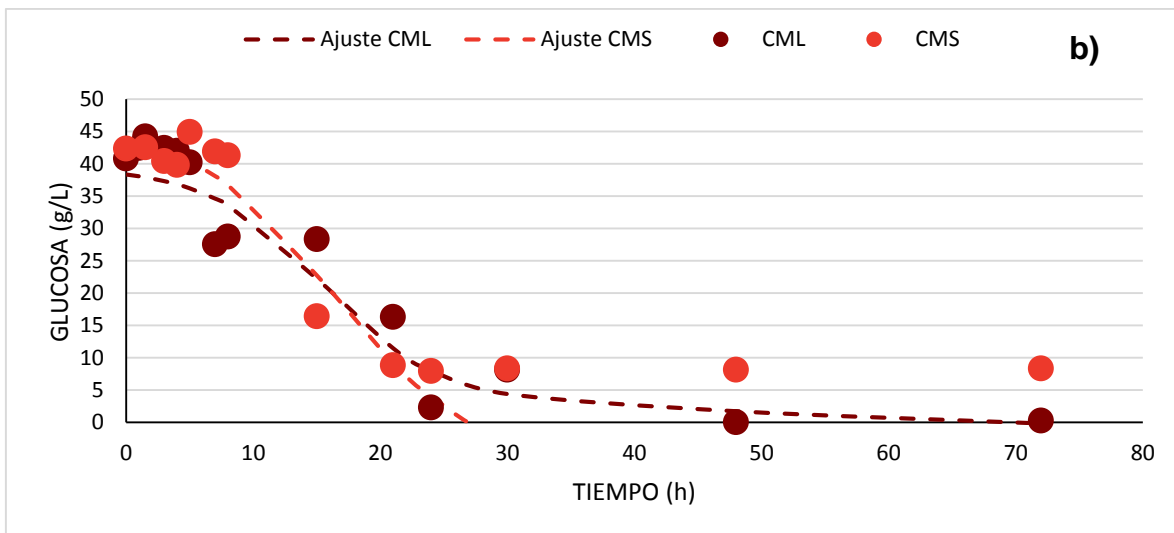
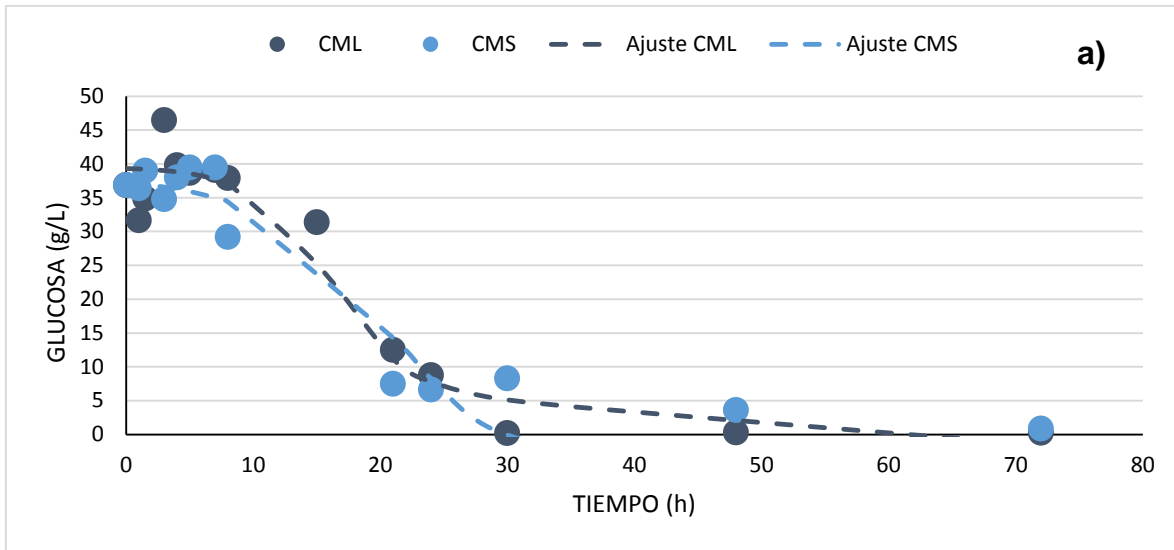
**Figura 8.** Evolución del pH durante el de cultivo en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 Cultivo en medio líquido ML (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo); b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos rosa oscuro).

Durante la cinética de crecimiento en medio LB para Bt EA3 se alcanzaban valores mínimos de pH de aproximadamente 6.8; en el caso del medio GYS la misma cepa alcanza niveles de pH de hasta 4.5 en ambos sistemas de cultivo. Además de ello con el medio LB se observó que en ambos sistemas de producción lograban recuperarse de la disminución del pH, alcanzando valores de 8.5 o 9; sin embargo, en el caso del medio GYS se observa que el comportamiento es diferente en ambos sistemas de cultivo, una vez que comienza el aumento del pH el CML alcanza valores de aproximadamente 6.5, mientras que el CMS alcanza valores de 4.9 conservándose alrededor de este valor durante el resto de la fermentación.

Al igual que la cepa EA3 en medio GYS, la cepa Y15 muestra una caída de pH más pronunciada en comparación con el perfil de pH observado en el medio LB, además de que una vez alcanzado el mínimo valor de pH no hay un incremento en este valor manteniéndose por el resto del tiempo de cultivo por debajo del pH inicial del cultivo. En ambos sistemas de cultivo, cultivo sólido y cultivo líquido, el valor mínimo de pH se alcanza alrededor de las 30 horas de cultivo de aproximadamente 4.5; después de este tiempo de cultivo se observa un incremento en dicho valor alcanzando valores de aproximadamente 5.3 al final del cultivo en ambos sistemas (Figura 8b).

### **7.3.2 CONSUMO DE GLUCOSA**

En esta sección se mostrarán los resultados correspondientes al consumo de glucosa del medio GYS. Durante las cinéticas de crecimiento de microorganismos un parámetro importante de medir es el consumo de sustrato, pues muchas veces este puede ser el que limite el proceso de producción. En la siguiente Figura se muestra el perfil de consumo de glucosa durante la cinética de crecimiento de la cepa EA3, a partir de los cuales se calcularon los parámetros a través del modelo de Pirt (1965).



**Figura 9.** Cinética del consumo de sustrato durante el cultivo en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, CML (puntos azul marino) y CMS (puntos azul cielo): b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 GYS, CML (puntos color vino) y CMS (puntos rosa oscuro).

En la Figura 9a se observa que el consumo de glucosa por la cepa EA3 es similar en ambos sistemas de cultivo, aunque el sustrato se agota totalmente en el cultivo líquido a partir de las 30 horas, mientras que en cultivo sólido el sustrato se agota hasta las 72 horas. Para la cepa Y15 se observa un comportamiento similar en las primeras 24 horas, más en cultivo líquido hay un consumo total de glucosa mientras que en el cultivo sólido hay aproximadamente 8 g/L de glucosa residual a las 72 horas de cultivo (Figura 9b).

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos del consumo de glucosa de la cepa de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en Cultivo en medio líquido y Cultivo en medio sólido obtenidos en medio GYS.

PARÁMETROS	EA3		Y15	
	CML	CMS	CML	CMS
$Y_{x/s}$	0.261	0.167	0.271	0.100
$m$	0.018	0.018	0.0081	0.0469

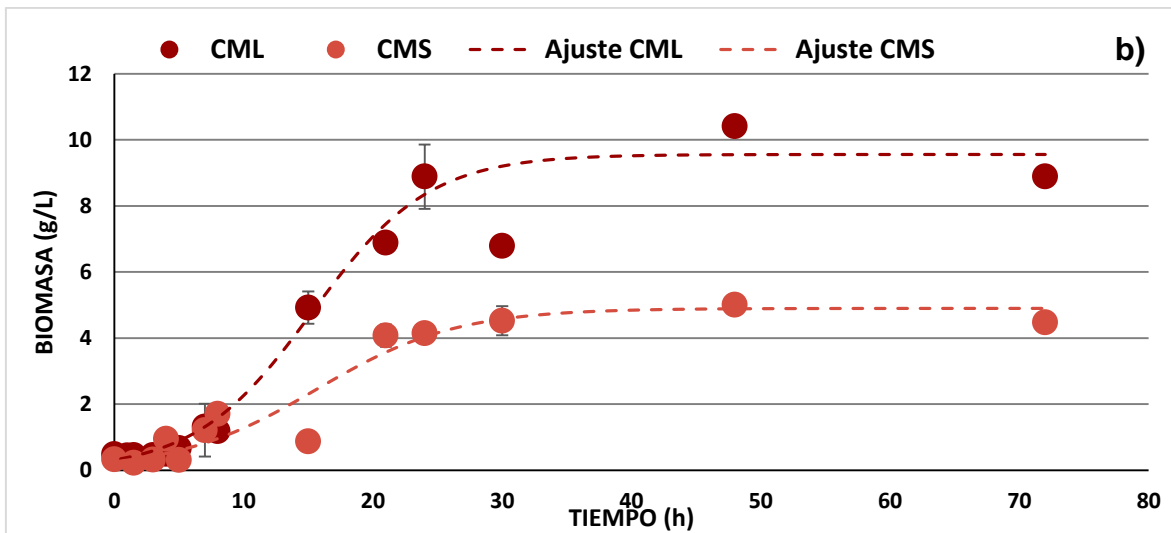
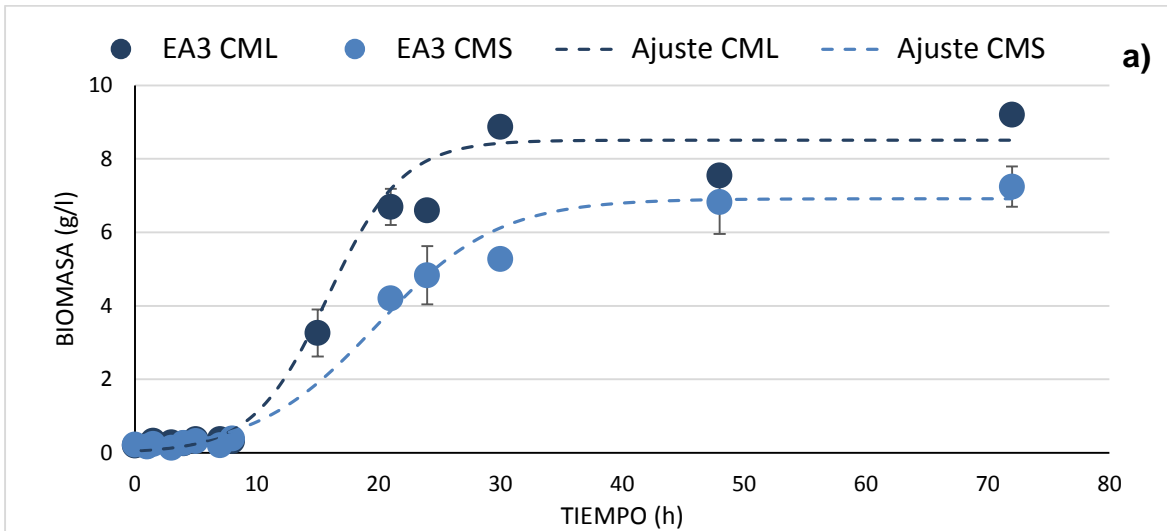
$Y_{x/s}$  rendimiento de biomasa por gramo de sustrato,  $m$  coeficiente de mantenimiento.

En ambos sistemas se observa que una pequeña parte del consumo de glucosa se destina a energía de mantenimiento, lo que significa que el consumo de glucosa no se ocupa para la síntesis de biomasa. Los parámetros (Tabla 2) muestran que el coeficiente de mantenimiento es el mismo en ambos sistemas de cultivo; no obstante, el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato es 1.5 veces mayor en el cultivo líquido en comparación con el cultivo sólido, esto concuerda con la producción de biomasa, bajo la misma concentración de sustrato inicial se obtienen cantidades diferentes de biomasa, como se describe más adelante. De acuerdo a los parámetros obtenidos para la cepa Y15, se observa que el CMS el coeficiente de mantenimiento es 5.7 veces mayor con respecto al CML, esto se refleja en el coeficiente de rendimiento en ambos sistemas, en CML se produce 0.271 g de biomasa por cada gramo de glucosa consumida, mientras que en CMS sólo hay producción de 0.1 gramos de biomasa por cada gramo de glucosa. Los valores de biomasa se presentan en la siguiente sección.

### 7.3.3 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

En la Figura 10a se muestra la cinética de producción de biomasa de la cepa de Bt EA3 en ambos sistemas de cultivo. Al igual que en medio LB se observa una mayor producción de biomasa en CML, pero en medio GYS no se observa el proceso de lisis celular que había en medio LB en el mismo sistema, continuando con esta máxima producción de biomasa por el resto de la fermentación, proceso similar en CMS.





**Figura 10.** Producción de biomasa en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 en Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo) b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en Cultivo en medio líquido (Puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos color rosa oscuro).

El cambio en el medio de producción resultó en un aumento en los niveles de producción de biomasa respecto a los obtenidos en el medio de cultivo LB. Con medio GYS, la cepa EA3 alcanzó una máxima producción de biomasa de 8.5 g/L en CML y de 6.9 g/L en CMS ambos aproximadamente a las 30 horas de cultivo (Figura 10a). En la Tabla 3 se muestra un resumen de los parámetros obtenidos por los ajustes al modelo logístico para cada sistema de producción de la cepa EA3 en medio GYS.

Las cinéticas de crecimiento de la cepa Y15 en ambos sistemas de cultivo muestran un comportamiento similar al de la cepa EA3. En ambos casos no hay proceso de lisis celular observado en medio LB, por lo que los máximos niveles de producción de biomasa permanecen constantes por el resto de la cinética una vez alcanzados estos valores (Figura 10b). Además de evitar el proceso de lisis celular al utilizar medio GYS, se observa un aumento en la producción de biomasa en ambos sistemas de cultivo, alcanzando una máxima producción de biomasa de 9.56 g/L en CML y de 4.9 g/L en CMS entre las 21 y 30 horas de cultivo respectivamente (Figura 10b). Al igual que la cepa EA3 el cultivo líquido sigue siendo el sistema en el que se obtiene mayor producción de biomasa. Un resumen de los parámetros obtenidos por los ajustes se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de las cepas de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en medio GYS.

PARAMETRO	EA3		Y15	
	CML	CMS	CML	CMS
$X_0$ (g/L)	0.048±0.038	0.126±0.0175	0.313±0.101	0.259±0.043
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	8.51±0.532	6.91±0.513	9.563±0.266	4.91±0.159
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.326±0.051	0.201±0.013	0.222±0.029	0.185±0.016
$r^2$	0.980	0.989	0.963	0.923
TD (h)	2.123	3.450	3.129	3.755
P (g/Lh)	0.283	0.230	0.45	0.16

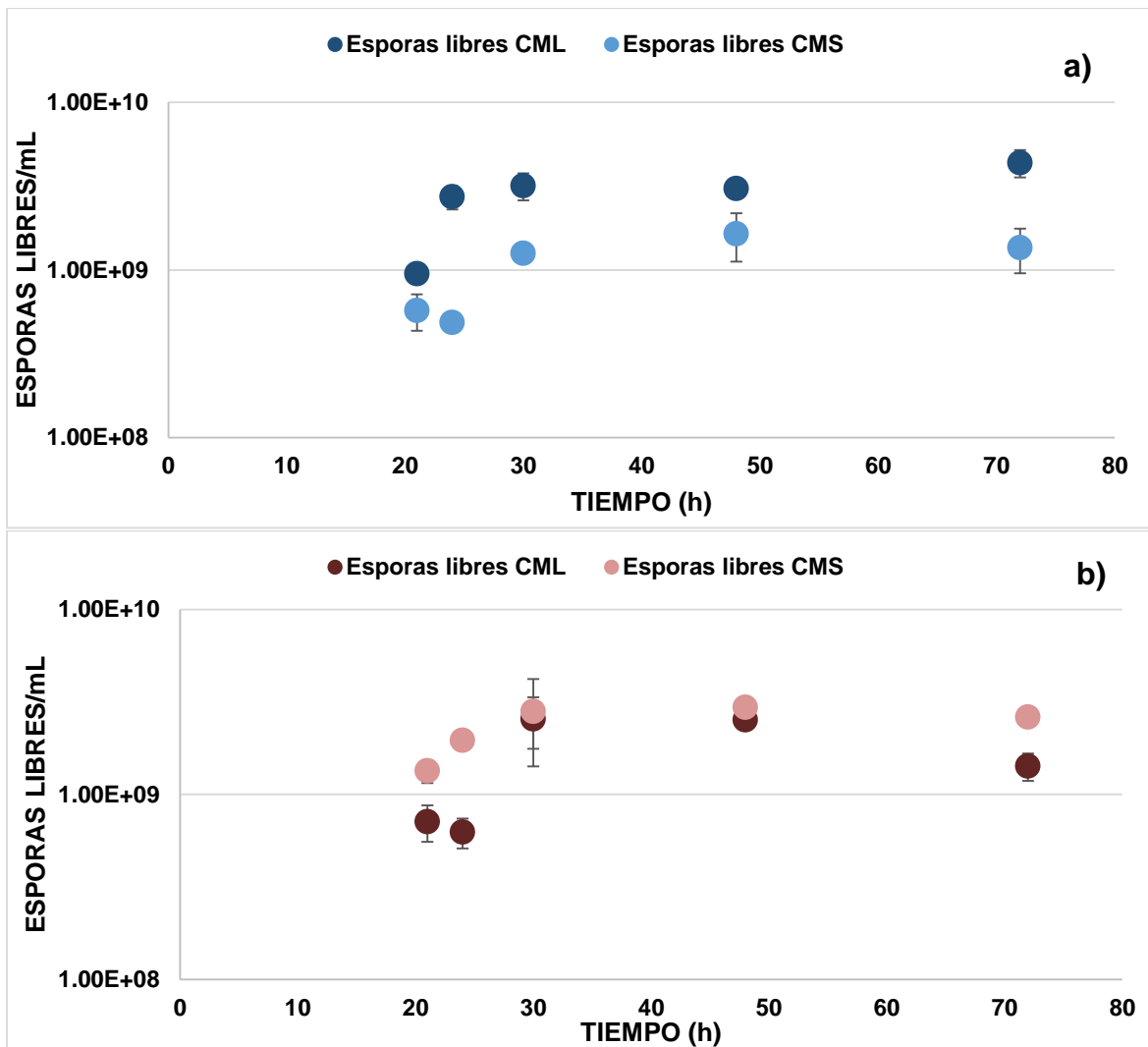
$X_0$  Biomasa inicial,  $X_{m\acute{a}x}$  Biomasa máxima,  $\mu$  tasa específica de crecimiento, TD tiempo de duplicación celular, P productividad

Los parámetros obtenidos para estas cinéticas de crecimiento para la cepa EA3 muestran que el cambio de medio de cultivo no sólo modifica los niveles de producción de biomasa, sino también factores como la tasa específica de crecimiento sobre todo en el sistema sólido, pues aumenta el tiempo de duplicación, de 2.96 h en medio LB, a 3.45 h en medio GYS. Mientras que en el cultivo líquido sucede lo contrario, el cambio de medio produce en este sistema una disminución del tiempo de duplicación, de 2.44 en medio LB, a 2.12 horas, siendo el CML 0.05 veces más productivo que el CMS. Los parámetros cinéticos para la cepa Y15 muestran que el cambio de medio de cultivo para esta cepa también afectó la tasa específica de crecimiento, pues provocó un aumento en el tiempo de duplicación en cultivo líquido, de 2.40 h en medio LB, a 3.12 h en medio GYS. A pesar de ello, el tiempo de duplicación aún es mayor en cultivo sólido (1.2 veces) respecto al cultivo líquido al usar

medio GYS (Tabla 3) afectando así las productividades de ambos sistemas, siendo en el CML 2.8 veces mayor que en CMS.

### 7.3.4. PRODUCCIÓN DE ESPORAS

Al igual que en medio LB, la cepa EA3 en medio GYS alcanza la máxima producción de esporas por mL en cultivo líquido ( $4.38 \times 10^9 \pm 8.13 \times 10^8$ ) a las 72 horas de cultivo, mientras en cultivo sólido la máxima producción se alcanza a las 48 ( $1.65 \times 10^9 \pm 5.30 \times 10^8$ ) siendo 2.6 veces menor la cantidad respecto al CML. El cambio de medio produjo un aumento en al menos un orden de magnitud en la cantidad de esporas libres en ambos sistemas de cultivo (Figura 11a).



**Figura 11.** Producción de esporas en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo); b) cepa

de *B. thuringiensis* Y15 en medio LB, Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos color rosa oscuro).

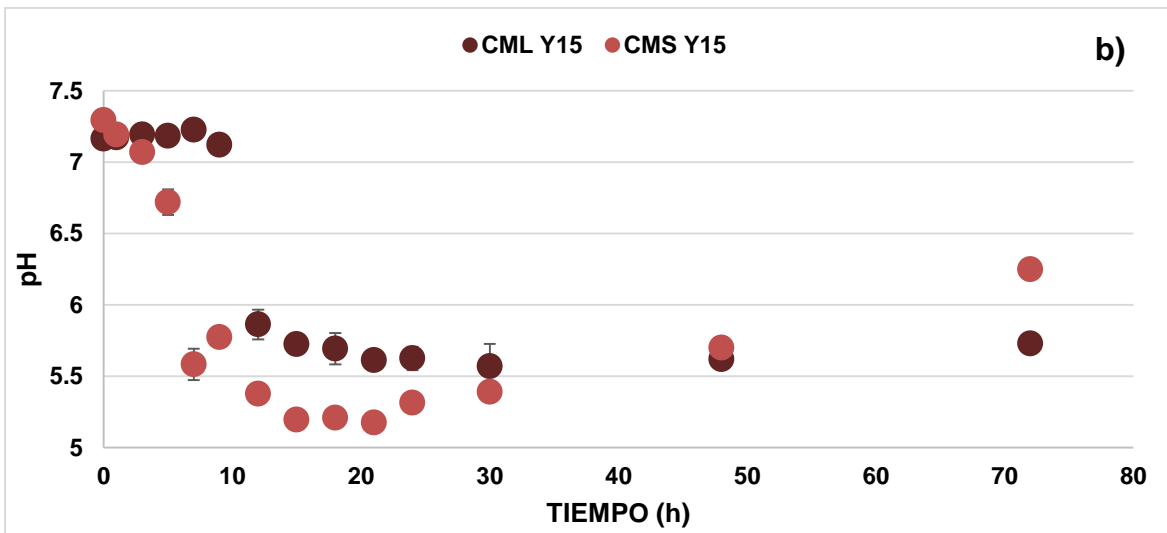
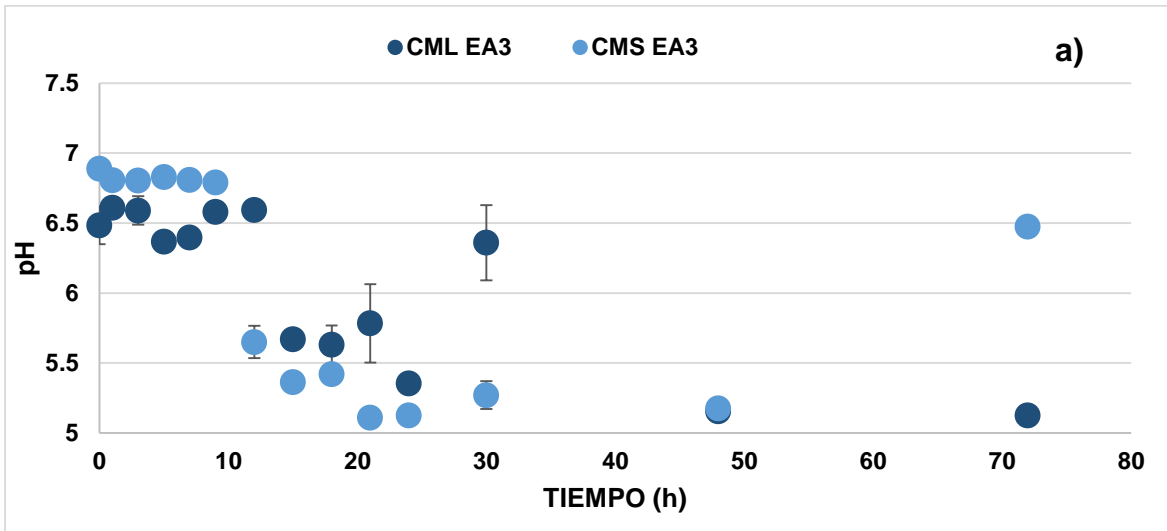
En la Figura 11b se observa la producción de esporas libres en ambos sistemas de cultivo para la cepa Y15. A diferencia de la producción en medio LB, la cepa Y15 en medio GYS tiene una producción similar de esporas libres por mL en ambos sistemas de cultivo por ejemplo a las 30 horas en cultivo sólido hay  $2.81 \times 10^9 \pm 1.40 \times 10^9$  esporas libres mientras en cultivo líquido hay  $2.56 \times 10^9 \pm 7.95 \times 10^8$  esporas libres, siendo ligeramente mayor en CMS en algunos tiempos. Estos resultados muestran que existen diferencias intrínsecas en cada cepa para responder al cambio en la formulación del medio, así como en el sistema de cultivo, por ejemplo, sólo la cepa Y15 fue capaz de producir esporas al mismo nivel en el medio GYS, tanto en cultivo líquido como en cultivo sólido.

#### **7.4 MEDIO GYS x4**

A partir de esta sección se mostrarán los resultados correspondientes a las cinéticas de producción de ambas cepas de Bt en medio GYS x4, mostrando la evolución de pH, consumo de glucosa, producción de biomasa, células vegetativas y esporas en ambos sistemas de producción.

##### **7.4.1 EVOLUCIÓN DE pH**

Se puede observar que la evolución de pH es similar en ambos sistemas de cultivo, durante las primeras 9 horas de cultivo en ambos sistemas el pH permanece prácticamente constante, en CML alrededor de 6.6 y en CMS alrededor de 6.8. Después de este periodo la cinética de evolución de pH comienza a descender hasta aproximadamente 5.1 en ambos sistemas permaneciendo constante por el resto del cultivo (Figura 12a).



**Figura 12.** Evolución del pH durante el cultivo en medio GYS x4: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo): b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos rosa oscuro).

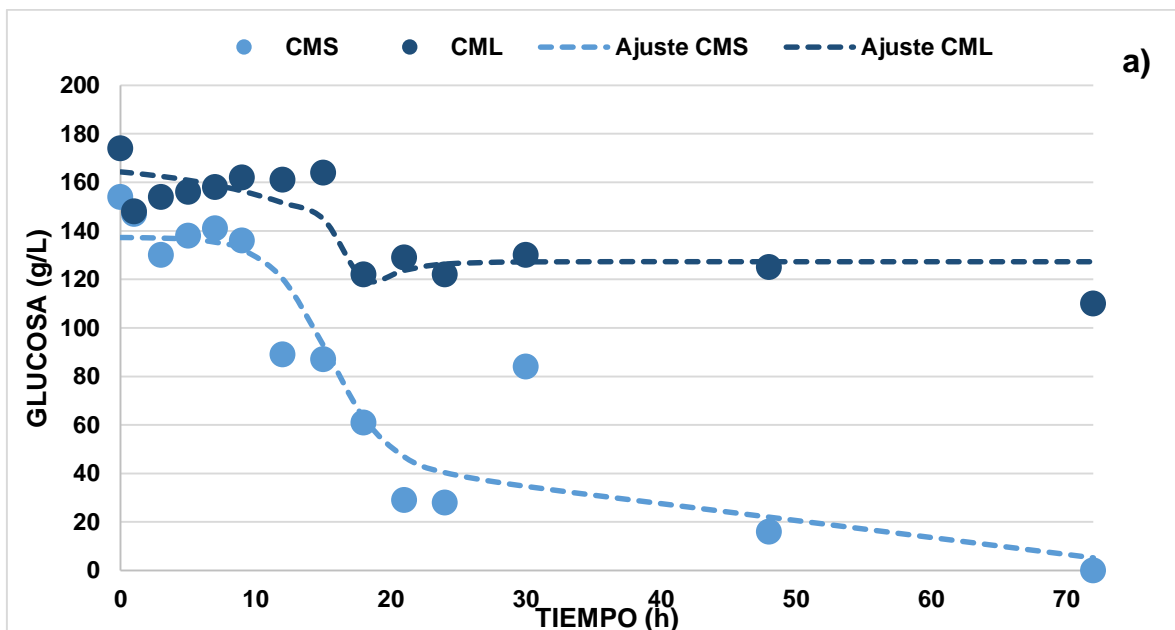
El comportamiento de Bt EA3 en medio GYS x4 es similar al usar el medio no concentrado, sin embargo, los valores mínimos en este medio son de aproximadamente 5.3, mientras que en el mismo medio no concentrado los valores mínimos de pH se mostraban alrededor de 4-4.5. En ninguno de los dos sistemas se observa un aumento en los valores de pH como se observó en CML del medio GYS con la cepa EA3.

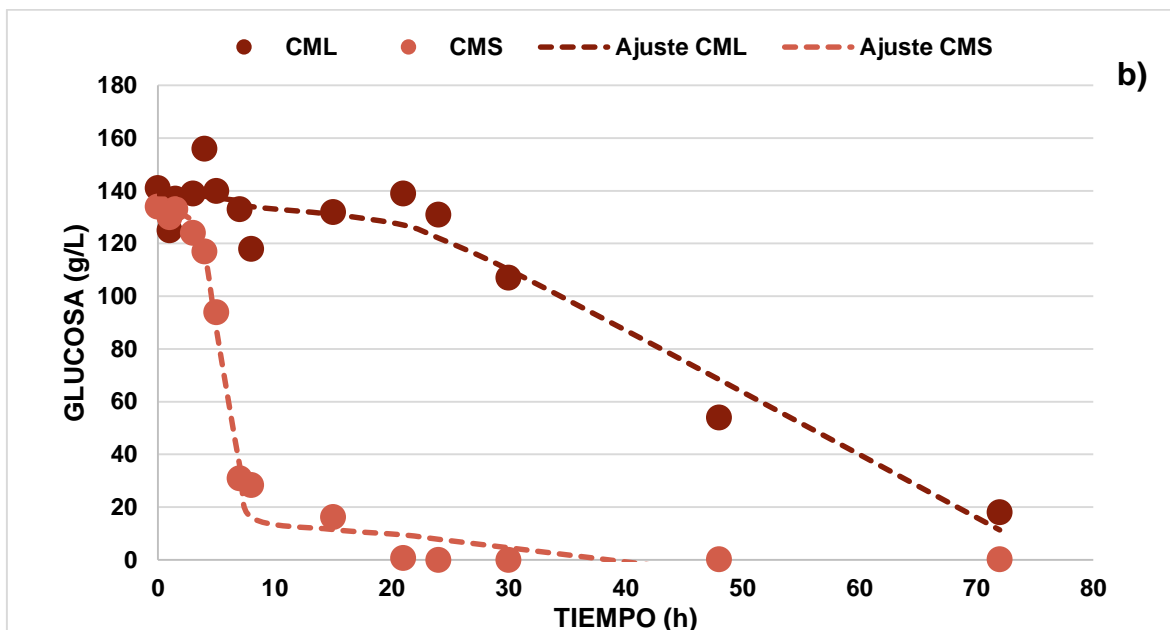
En el caso de la cepa Bt Y15 los cambios de pH son diferentes en ambos sistemas, mientras en CMS el descenso de pH comienza prácticamente al inicio de la fermentación, en CML

tarda alrededor de 7 horas comenzar con el proceso de descenso (Figura 12b). Después de comenzar el descenso de pH se alcanza un valor mínimo de aproximadamente 5.2 en cultivo sólido y de 5.6 en cultivo líquido manteniéndose dicho valor en este último sistema de cultivo, mientras que en CMS después de 24 horas comienza un aumento en el valor de pH alcanzando valores de aproximadamente 6.3 al final del cultivo.

#### 7.4.2 CONSUMO DE GLUCOSA

En la Figura 13a se muestra la cinética de consumo de glucosa en ambos sistemas de cultivo para la cepa de Bt EA3. En ambos casos se observa que hay un tiempo de retardo en el consumo de glucosa, siendo más acentuadas en cultivo en medio líquido. Durante aproximadamente 15 horas la concentración de sustrato en dicho sistema es similar, entre este tiempo y las 18 horas hay un consumo de aproximadamente 40 g/L del sustrato, pero después de este tiempo la concentración del mismo permanece constante hasta las 48 horas. En contraste, en cultivo en medio sólido a las 15 horas se consumió más de la mitad de la concentración inicial de glucosa, continuando su consumo por el resto del cultivo hasta agotar el sustrato a las 72 horas.





**Figura 13.** Cinética del consumo de sustrato durante el cultivo en medio GYS: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo): b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 GYS, Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos rosa oscuro).

El consumo de sustrato por la cepa de Bt Y15 en CMS inicia inmediatamente después de la inoculación al medio observándose un agotamiento del mismo a partir de las 30 horas de cultivo. Por el contrario, en CML el consumo de sustrato es más lento y no se agota totalmente, pero a diferencia de la cepa EA3 en el mismo sistema de cultivo y con el mismo medio, el consumo de sustrato es mayor (Figura 13b).

Al usar un medio como el GYS 4x y de acuerdo a los parámetros obtenidos por el ajuste al modelo de Pirt (Tabla 4), el coeficiente de mantenimiento 5.8 veces mayor en cultivo líquido para la cepa EA3. Para la cepa Y15 los parámetros muestran que se obtiene un mayor rendimiento de biomasa por gramo de sustrato en cultivo sólido ( $Y_{x/s} = 0.137$ ), mientras que en CML este valor fue  $Y_{x/s} = 0.075$ , es decir, menos de la mitad que en CMS. De igual forma se observa que el consumo de sustrato en CML es mayormente destinado a energía de mantenimiento celular, pues el valor de dicho coeficiente es 2.1 veces mayor que en cultivo sólido. Lo anterior sugiere que las bacterias están en una condición de estrés en el cultivo líquido y desvían parte de la energía para responder a esta condición por la concentración de nutrientes.

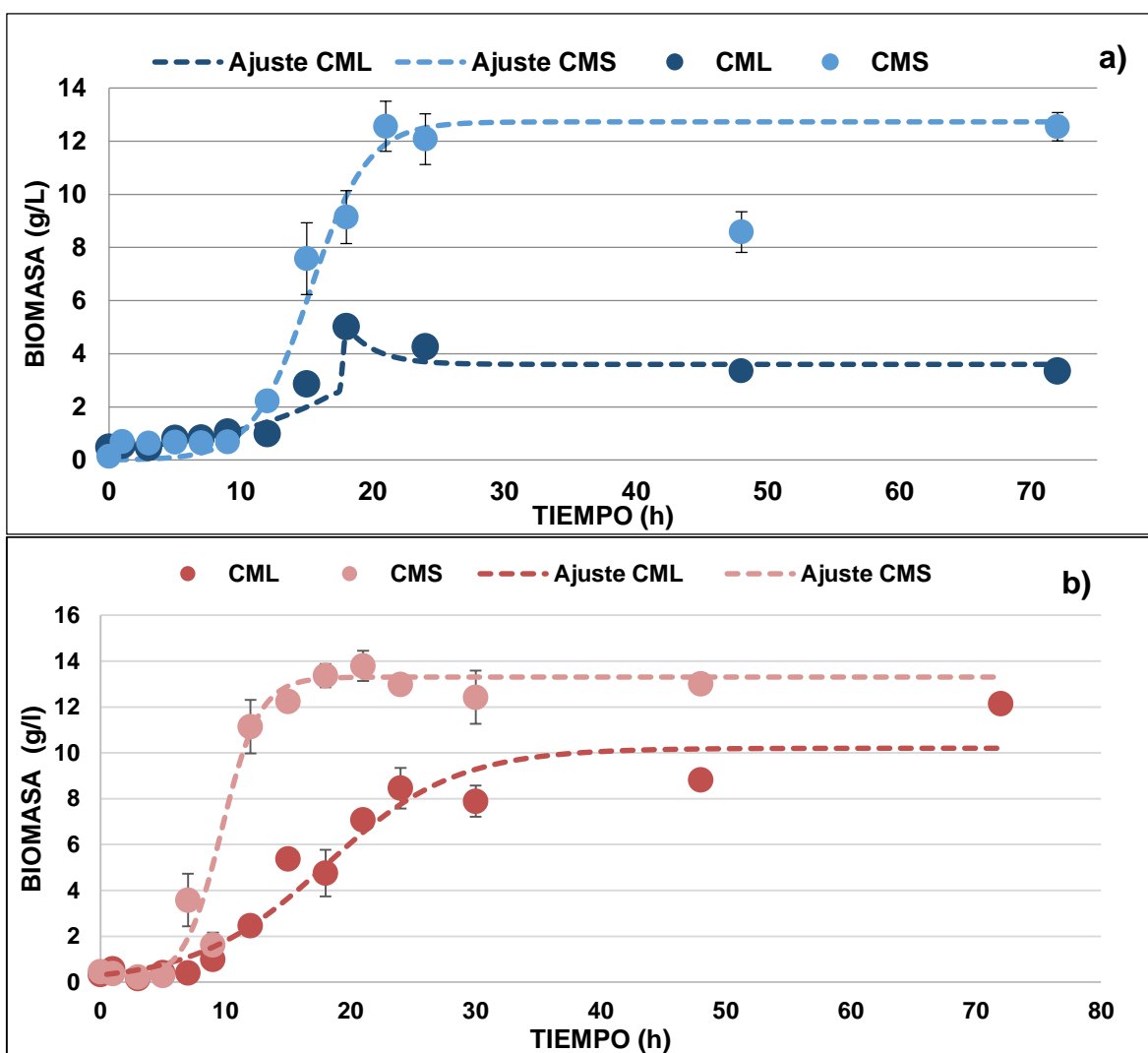
**Tabla 4.** Parámetros cinéticos del consumo de glucosa de la cepa de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en Cultivo en medio líquido y Cultivo en medio sólido obtenidos en medio GYS x4.

PARÁMETROS	EA3		Y15	
	CML	CMS	CML	CMS
$Y_{x/s}$	0.075	0.137	0.076	0.113
$m$	0.114	0.054	0.233	0.040

$Y_{x/s}$  rendimiento de biomasa por gramo de sustrato,  $m$  coeficiente de mantenimiento.

### 7.4.3 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

En contraste al medio GYS no concentrado, donde la cantidad de biomasa producida por la cepa EA3 era mayor en CML, en medio GYS x4 la mayor producción de biomasa se alcanza en CMS con 12.73 g/L, 2.4 veces mayor que en CML (Figura 14a).





**Figura 14.** Producción de biomasa en medio GYS x4: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3 en Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo) b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en Cultivo en medio líquido (Puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos color rosa oscuro).

La producción de biomasa de Bt EA3 en CMS se mantiene constante después de alcanzar el valor máximo, aunque este fenómeno no se repite en CML, donde se observa un ligero proceso de lisis celular. En ambos casos se observa un prolongado tiempo de fase lag (8.7 horas en cultivo sólido y 9.9 horas en cultivo líquido) y la diferencia más notable es la velocidad de crecimiento reflejado en el tiempo de duplicación, pues mientras en CMS el tiempo de duplicación es de 1.5 horas, en CML el tiempo de duplicación es de 6.2 horas, 4 veces más tiempo que en CMS (Tabla 5). Los máximos valores de biomasa se obtienen a las 18 y 21 horas en CML y CMS, respectivamente, resultando en una productividad 2.1 veces mayor en CMS.

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de las cepas de *B. thuringiensis* Y15 y EA3 en medio GYS x4.

Parámetros	EA3		Y15	
	CML	CMS	CML	CMS
$X_0$ (g/L)	0.380±0.051	0.011±0.003	0.307±0.058	0.022±0.033
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	5.199±0.307	12.73±0.925	10.199±0.127	13.313±0.291
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.110±0.007	0.462±0.041	0.193±0.026	0.658±0.105
$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.446±0.585	NA	NA	NA
$r^2$	0.946	0.964	0.942	0.958
TD	6.262	1.50	3.597	1.054
P (g/Lh)	0.28	0.6	0.33	0.88

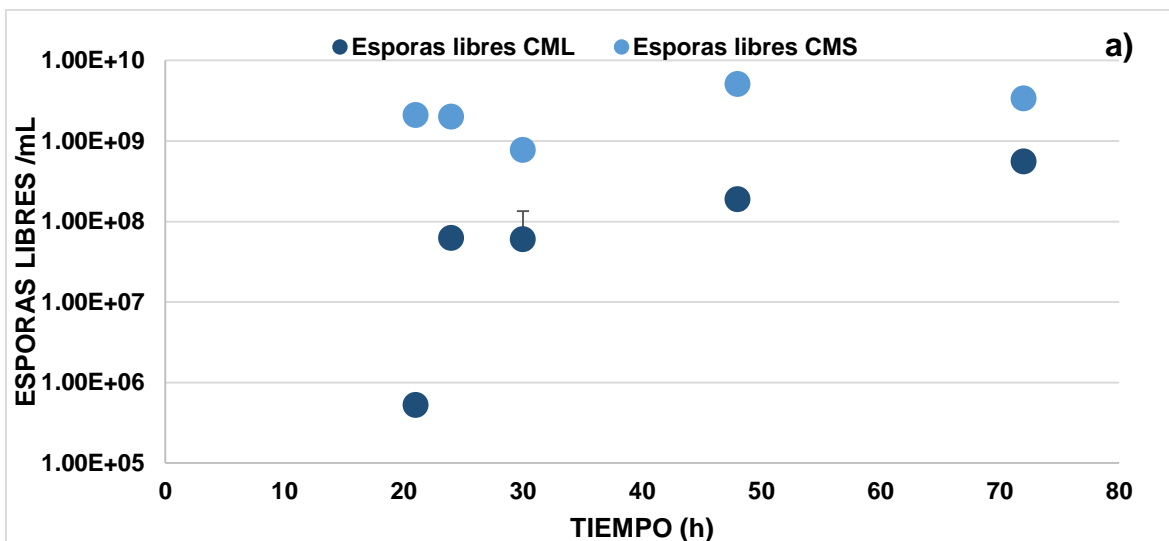
$X_0$  Biomasa inicial,  $X_{m\acute{a}x}$  Biomasa máxima,  $\mu$  tasa específica de crecimiento,  $k$  tasa específica de lisis celular, TD tiempo de duplicación celular, P productividad.

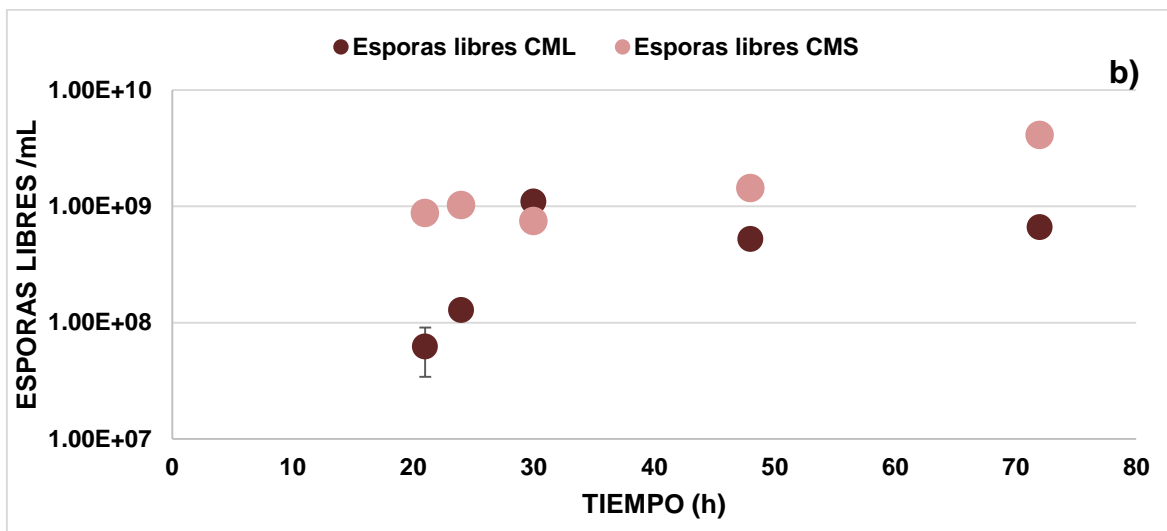
El uso de medio GYS concentrado 4 veces mantiene el comportamiento observado para la cepa Y15 en ambos sistemas de cultivo en medio GYS, donde no se observan procesos de lisis celular. Sin embargo, a diferencia del medio de cultivo GYS, la máxima producción de biomasa, se obtiene en CMS al utilizar el mismo medio concentrado 4 veces. En dicho sistema se observa que la máxima producción de biomasa se logra alrededor de las 15 horas, mientras la máxima producción de biomasa en CML se alcanza hasta las 30 horas de cultivo (Figura 13b).

En términos de productividad de la cepa Y15 el CMS es 2.6 veces mayor que el CML, con una producción de biomasa máxima de 13.3 g/L en CMS y de 10.19 g/L en CML. De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 3 y 5, el tiempo de duplicación en CML aumenta, de 3.12 horas en medio GYS, a 3.59 horas en medio GYS x4; mientras en CMS el tiempo de duplicación disminuye, de 3.75 horas en medio GYS, a 1.05 horas en medio GYS x4.

#### 7.4.4. PRODUCCIÓN DE ESPORAS

Continuando con la tendencia de la producción de biomasa, la producción de esporas en CMS de la cepa de Bt EA3 es mayor en todos los tiempos de evaluación respecto al CML, alcanzando una máxima producción de esporas por mL a las 48 horas en cultivo sólido ( $5.09 \times 10^9 \pm 5.83 \times 10^8$ ) y a las 72 horas en cultivo líquido ( $5.55 \times 10^8 \pm 2.63 \times 10^7$ ) siendo hasta un orden de magnitud mayor en CMS (Figura 15a). Con relación al medio GYS que se muestra en la sección anterior, esta cepa mejoró 3.1 veces la producción de esporas en CMS usando el medio GYS x4, aunque en CML cae un orden de magnitud la producción, lo cual se relaciona con el mayor gasto energético como lo sugiere el coeficiente de mantenimiento.





**Figura 15.** Producción de esporas en medio LB: a) cepa de *B. thuringiensis* EA3, Cultivo en medio líquido (puntos azul marino) y Cultivo en medio sólido (puntos azul cielo); b) cepa de *B. thuringiensis* Y15 en medio LB, Cultivo en medio líquido (puntos color vino) y Cultivo en medio sólido (puntos color rosa oscuro).

En la Figura 15b se observa que para la cepa Y15, como sucede con la cepa EA3 en medio GYS x4, la máxima producción de esporas libres por mL se alcanza en el cultivo sólido, alcanzando su máximo valor a las 72 horas de cultivo ( $4.11 \times 10^9 \pm 1.46 \times 10^8$ ), siendo 3.7 veces mayor que la producción en cultivo líquido a las 30 horas (tiempo en alcanzar la máxima producción de  $1.1 \times 10^9 \pm 1.41 \times 10^8$ ). Es decir, para la cepa Y15 en el medio GYS x4, con respecto al medio GYS, sí hubo una diferencia entre el CMS y CML, también relacionado probablemente a la condición adversa que representa el cultivo líquido con una concentración alta de nutrientes. Sin embargo, en cuanto al rendimiento de esporas, la cepa de Bt Y15 es menos sensible al cambio del sistema de cultivo, en comparación con Bt EA3.

## 8. DISCUSIÓN

Se ha mencionado que *Bacillus thuringiensis* es una alternativa importante en el campo del control biológico, por ello la continua búsqueda del mejoramiento en la producción de proteína Cry y esporas del mismo; además de conseguir el mejor método de producción para dicha bacteria, es necesario tener métodos efectivos de preservación a mediano y largo plazo. La preservación de Bt en tiras de papel filtro es una técnica sencilla y de bajo costo, útil para la preservación de microorganismos como bacterias, no obstante, mostró ser efectiva sólo a mediano plazo, manteniendo la viabilidad y producción de esporas al menos 3 meses después de la fecha de inicio de los conservados en la cepa EA3, después de un año de conservación la viabilidad de esporas disminuye de  $1 \times 10^7$  UFC/mL a  $2.4 \times 10^5$  UFC/mL (Figura 4a). Mientras que para la cepa Y15 no se logra preservar la producción de esporas, después de una semana de conservación, la viabilidad de las esporas disminuye aproximadamente en un orden de magnitud a los tres meses de  $1.3 \times 10^8$  UFC/mL a  $5.27 \times 10^7$  UFC/mL y dos órdenes de magnitud después de un año de conservación respectivamente  $1.3 \times 10^8$  UFC/mL a  $4.9 \times 10^6$  UFC/mL (Figura 4b). Sosa-López y colaboradores (2011) determinaron la eficiencia del método de conservación en tiras de papel filtro para dos cepas de *Bacillus subtilis*, mostrando que este método de conservación es eficiente hasta por 3 años, pues después de este tiempo ambas cepas conservaron la viabilidad de sus células, así como las características morfológicas y la actividad antagónica contra *Rhizoctonia solani*. A diferencia de estos autores, la conservación a largo plazo, 3 años como lo indican, no se logró a pesar de que ambas bacterias pertenecen al mismo género. *Bacillus thuringiensis* es susceptible a este método de conservación por lo que es necesario evaluar otro método para así aumentar el tiempo de vida en almacenamiento, sin afectar los niveles de producción de esporas y proteína Cry. Prabakaran y Hoti (2007) desarrollaron un método de conservación basado en la inmovilización de Bt var. israelensis en una matriz de alginato almacenada a 4° C, con el cual logran un periodo de conservación de hasta 10 años sin mostrar diferencia significativa en la producción de esporas y proteína Cry.

Las cinéticas de producción de Bt se realizaron en tres medios distintos: LB, GYS y GYS x4 (medio concentrado). A diferencia de los medios que contenían glucosa como fuente de carbono y energía, el medio LB contenía bacto-triptona. Además de probar dos fuentes de carbono y energía para el crecimiento de Bt, también se evaluaron dos valores de relación C/N, de 3.43 en medio LB y de 8.61 en medio GYS y medio GYS x4, pues en este último a pesar de estar 4 veces concentrado, la relación entre todos los componentes del medio se

conservó. A través de los años se han realizado diversas investigaciones del efecto que tiene cada nutriente en los procesos de crecimiento de microorganismos, determinando que cada tipo de microorganismo tiene preferencias hacia uno u otro sustrato y las cantidades en las que cada nutriente debe estar presente en el medio de cultivo, para obtener los mayores rendimientos de productos, ya sea biomasa, esporas o metabolitos. Además de los factores nutricionales, los factores ambientales también forman parte importante durante el proceso del crecimiento de microorganismos y la formación de productos. Los factores como pH, temperatura y concentración de oxígeno tienen efecto tanto en el crecimiento del microorganismo como en los productos del mismo. En el caso de *Bacillus thuringiensis* se ha realizado una extensa investigación acerca de los requerimientos nutricionales y ambientales para obtener la mayor producción tanto de esporas como de proteínas Cry

Durante las cinéticas de crecimiento de Bt realizadas en este estudio se ajustó el pH de los medios entre 7 y 7.5 antes del proceso de esterilización; en este sentido Morris y colaboradores (1996) mostraron que a valores iniciales de pH de 7 y 8 se produce una mayor cantidad de biomasa y toxicidad de la proteína Cry, en comparación con los cultivos en los cuales el pH inicial fue 5 y 6. Durante la evaluación de este factor en dichas cinéticas se observó un comportamiento en el cual en las primeras horas de cultivo el pH disminuía hasta llegar a un valor mínimo, posteriormente había un aumento en ocasiones mayor al valor inicial (Figura 5), y en otros casos el aumento de pH se mostró mínimo (Figura 8). En el caso del medio con mayor concentración de nutrientes los valores de pH permanecieron constantes una vez que se alcanzó el valor mínimo (Figuras 12). El descenso en el pH observado en las cinéticas de crecimiento puede ser un indicador de la producción de ácidos orgánicos, que posteriormente podrán metabolizarse y mineralizarse, provocando un aumento de los valores de pH (Saksinchai et al, 2001). Este descenso observado puede interferir en el crecimiento de Bt, de hecho, Akiba y colaboradores (1979, 1980) encontraron que Bt tiene un crecimiento limitado en suelos y extractos de suelo con un rango de pH entre 4.8 y 5.4. Los altos tiempos de duplicación y los bajos rendimientos de producción de biomasa pueden ser una consecuencia de la disminución del pH más allá del óptimo de crecimiento.

Al evaluarse los cambios de pH en el medio se observa que ambas cepas tienen un comportamiento similar en los cambios de dicho factor, no obstante los perfiles de pH son diferentes en cada medio ensayado. En medio LB la cepa EA3 alcanza un pH máximo de 9.06 y la cepa Y15 un máximo de 8.42 en cultivos líquidos, sugiriendo que al producir menor

cantidad de biomasa (Tabla 1) la producción de posibles ácidos orgánicos por la cepa Y15 es menor regulando mejor los cambios de pH. Al hacer el cambio de sistema de cultivo para la cepa EA3 se sigue observando el mismo comportamiento, pero en este cultivo sólo alcanza un máximo de 8.56, indicando que el crecimiento en cultivo sólido modera los cambios de pH. Al realizar el cambio de medio de cultivo los resultados en cuanto a la evolución de pH son diferentes como ya se describieron anteriormente, esto puede deberse no sólo a la presencia de ácidos orgánicos producidos por el mismo microorganismo, sino por especies iónicas presentes en el mismo medio los cuales favorecen la brusca disminución del pH ( $\text{NH}_4\text{SO}_2$ ). Khanh y colaboradores (2009) ensayaron cuatro compuestos como agentes de control de pH, mostrando que los compuestos que contienen amonio tienen un impacto negativo sobre el crecimiento, esporulación y síntesis de  $\delta$ -endotoxina, mientras que los compuestos de acetato proveen de una fuente de carbono adicional para el crecimiento, esporulación y síntesis de la toxina además de mejorar la entomotoxicidad de la misma. Los medios denominados GYS y GYS x4 tienen dentro de su composición sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y, como se menciona en el artículo de Khan y colaboradores (2009), como agente de control de pH, sin embargo, a diferencia de lo mencionado anteriormente, estos medios mejoran la producción de biomasa en ambas cepas de Bt utilizadas en este trabajo (Figuras 10 y 14). Como se mencionó, en estos medios se observa la mayor caída de pH (hasta aproximadamente 4.5 en medio GYS para ambas cepas y hasta 5-5.5 en medio GYS x4), por lo que la utilización del sulfato de amonio en estos medios no puede considerarse como agente de control de pH, de echo la disolución de dicha sal puede ser causante de la acidificación del medio durante el tiempo de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, los factores nutricionales son muy importantes en la producción de esporas de Bt, así como para la producción de toxina, cada microorganismo tiene diferentes requerimientos nutricionales, aunque en cada cultivo se necesita una fuente de carbono y energía, incluyendo compuestos que contengan los elementos necesarios para el óptimo crecimiento del microorganismo. Bt es capaz de consumir glucosa como fuente de carbono, mientras que como fuente de nitrógeno se han propuesto compuestos como extracto de levadura, peptonas, sulfato de amonio y vitaminas, siendo el extracto de levadura el más utilizado en los medios de cultivo para la producción de esporas y toxina de Bt. Además de las fuentes de C y N necesarios para el crecimiento, se requieren elementos traza como cofactores de crecimiento, tales como hierro, manganeso y

magnesio. La falta de algún compuesto en el medio de cultivo puede afectar los rendimientos finales tanto en la producción de biomasa, esporas y toxina. En el presente trabajo, los ensayos con medio LB muestran bajas producciones de biomasa en comparación con las producciones alcanzadas al utilizar el medio GYS o GYS x4, sugiriendo que la fuente de carbono y energía de dicho medio no es adecuado para el crecimiento de ambas cepas de Bt, además de ello al utilizar medio LB las producciones de biomasa en CMS (1.2 g/L con Bt EA3 y 1.4 g/L con Bt Y15) son las más bajas en comparación con los resultados obtenidos para los medios GYS (6.9 g/L con Bt EA3 y 4.9 g/L con Bt Y15) y GYS x4 (12.73 g/L con Bt EA3 y 13.31 g/L con Bt Y15) en el mismo sistema.

Además del cambio en la fuente de carbono y energía, el cambio de medio de cultivo se reflejó también en un cambio en la relación C/N del medio, como se mencionó anteriormente, al utilizar medio LB la relación C/N del medio fue de 3.43 mientras en los medios restantes la C/N fue de 8.61. Bajo dichas relaciones de C/N la producción de esporas en los tres medios sigue una tendencia similar a la observada en la producción de biomasa. Respecto al medio LB, al utilizar el medio GYS la producción de esporas por mL de medio para la cepa EA3 aumenta 5.7 veces en CMS y 6.4 veces en CML, y para la cepa Y15 aumenta 11.9 veces en CMS y 5.3 veces en CML. Por otra parte, con respecto al medio LB, en el medio GYS x4 la cepa EA3 aumenta 17.6 veces en CMS y disminuye 1.2 en CML; la cepa Y15 aumenta 17.4 veces en CMS y 2.3 veces en CML, también con respecto al medio LB. Ahora, con respecto al medio GYS, al utilizar medio GYS x4 la producción de esporas de la cepa EA3 aumenta 3.08 veces en CMS y disminuye 7.9 veces en CML; también la cepa Y15 aumenta 1.46 veces en CMS y disminuye 2.3 veces en CML. Farrera y colaboradores (1998) sugieren que la relación C/N inicial del medio y la concentración de sólidos totales, tiene un efecto directo en cuanto a la producción de esporas, de acuerdo a ello al tener una concentración de sólidos totales de 150 g/L se requiere una relación C/N de 4 para el crecimiento, mientras que al tener una concentración de sólidos totales de 60 g/L, la relación C/N óptima de crecimiento oscila entre 4 y 9. Al tener una concentración de sólidos totales aproximadamente de 150 g/L en medio GYS x4 y una relación C/N de 8.61, se observa que la producción tanto de biomasa como de esporas aumenta respecto a los medios restantes, sobre todo en CMS. Posiblemente la razón por la que las producciones de biomasa y esporas en CML con medio GYS x4 son menores, respecto al medio GYS, se deban a un proceso de inhibición por sustrato, la tasa específica de crecimiento sufre

una disminución provocando un aumento en el tiempo de duplicación del microorganismo, lo que genera que el sustrato consumido se utilice para cuestiones de mantenimiento celular y no de crecimiento, en contraste, las ventajas que ofrece el CMS contrarresta los efectos del incremento de osmolaridad del medio superando la inhibición por sustrato que se sufre en CML, dirigiendo el metabolismo a producción de biomasa.

Berbert-Molina y colaboradores (2008) caracterizaron cinéticas de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis en concentraciones de glucosa entre 10 y 150 g/L, en un medio denominado GYS. En cultivos con una concentración de glucosa de 10 g/L los autores reportan una biomasa máxima de 8.5 g/L. En el presente estudio al utilizar el mismo medio (GYS) con una concentración de glucosa de 30 g/L, la máxima producción de biomasa fue de 8.5 g/L en CML con Bt EA 3 y de 9.5 g/L en CML con Bt Y15, en ambos sistemas de cultivo y con ambas cepas la biomasa obtenida es menor a la reportada por Berbert-Molina y colaboradores (2008) para la misma concentración de 30 g/L en la cual ellos obtienen 15.6 g/L de biomasa. Esto puede ser causa de las diferencias entre las cepas, como se muestra en este trabajo con Bt EA 3 y Bt Y15, a pesar de provenir de una misma región geográfica. En el caso de la concentración de glucosa de 124 g/L, Berbert-Molina et al. (2008) obtienen 15.4 g/L, en este ensayo a una concentración de glucosa de 120 g/L (medio GYS x4), la máxima producción de biomasa fue de 12.73 g/L con Bt EA3 y 13.31 g/L con Bt Y15, cabe mencionar que en dicho artículo la concentración de glucosa fue el único factor variante en el medio, desbalanceando dicho medio al incrementar este sustrato y no los demás, en nuestro estudio se mantuvo la concentración de cada compuesto ya que en el medio GYS x4 se aumentó de forma proporcional cada compuesto. López et al. (2010) obtienen resultados similares al utilizar la levadura *Pichia pastoris* en cultivo sólido y cultivo líquido, a bajas concentraciones de sustrato no se encuentra diferencia significativa en la producción de biomasa o de la enzima recombinante lacasa, sin embargo, al aumentar la concentración de sustrato se produce mayor densidad celular en CMS comparativamente al CML. Dichas diferencias pueden ser atribuidas a utilizar cepas distintas a Bt var israelensis, pues entre las mismas cepas Y15 y EA3 hay diferencias en cuanto a producción de biomasa y esporas en cada uno de los medios utilizados ya sea cultivo líquido o sólido, como se mencionó anteriormente la composición del medio debe proveer al microorganismo de todos los componentes necesarios para su óptimo crecimiento, por lo tanto diferentes microorganismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y en diferentes cantidades (Madigan, Martinko y Parker 2009).



Además del factor C/N la transferencia de oxígeno es un factor importante, la limitante del proceso de difusión de oxígeno en CML es superada en CMS en especial a concentraciones elevadas de sustratos, donde la demanda bioquímica de oxígeno es mayor. Uno de los factores que influyen en el proceso de difusión es el área específica que está en contacto con la fase gaseosa donde se transporta el oxígeno, de hecho Viniegra-González et al. (2003) mencionan que la relación área/volumen de un cultivo sólido es mayor a la que se encuentra en un cultivo líquido, la relación área volumen para un medio líquido impregnado en PUF es de  $1.67 \times 10^2 \text{ cm}^{-1}$ , esto proporcionaría una mejor transferencia de oxígeno en el cultivo sólido en comparación con el cultivo líquido, donde el área específica en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio sería de  $2 \text{ cm}^{-1}$ , es decir habría aproximadamente 10 veces más área para que el oxígeno se transfiera a la fase líquida en un CMS usando PUF embebido con el medio. De acuerdo con Dulmage (1981), el crecimiento y la esporulación de Bt pueden ser optimizados usando altas tasa de aireación, por lo tanto esto explicaría el aumento en la producción de esporas en el cultivo sólido de este trabajo, en comparación con el cultivo líquido usando el medio GYS x4. A pesar de las ventajas que ofrece el cultivo sólido las producciones de esporas reportadas en este trabajo son inferiores a las reportadas por otros autores para el sistema de cultivo sólido, Zhuang et al. (2011) reportan alrededor de  $9.17 \times 10^9$  a  $5.26 \times 10^{10}$  UFC/g. Las producciones alcanzadas para CMS utilizando medio GYS y GYS x4 en este trabajo son similares a otros, Adams et al. (2002) reportan de 1 a  $5 \times 10^9$  esporas/g. Las producciones de esporas máximas en ambos sistemas de cultivo, con ambas cepas y en los medios utilizados son semejantes a las reportadas para cultivos líquidos, que reportan desde  $1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^9$  UFC esporas/mL (Golberg et al, 1980; Bing-Lan y Yew-Min, 1998; Ernandes et al, 2013).

La diferencia entre las cepas, muestra que tienen distinto grado de tolerancia al estrés por la concentración de nutrientes, pero ambas cepas mejoran la producción de esporas en cultivo sólido en el medio más concentrado, lo que pone en perspectiva que en el CMS usando PUF se pueden utilizar medios concentrados basados en harinas de bajo costo (maíz, tapioca, pescado), o bien en sólidos de maceración de granos o incluso lodos de aguas residuales (Zhuang et al. 2011), con la ventaja de evitar el gasto de agitación, aprovechando la relación área/volumen que facilita la transferencia de oxígeno para el crecimiento de Bt.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

El método de conservación con papel filtro garantiza una viabilidad, y rendimiento apropiado de esporas, hasta por 3 meses para la cepa EA3 y de 1 semana para la cepa Y15, por lo que no se recomienda conservar las cepas por más de 3 meses con esta técnica.

Al utilizar medio LB, ambas cepas de Bt muestran perfiles de pH similares observando una ligera disminución respecto al valor inicial, alcanzando valores de hasta 9 con la cepa EA3 y de 8.6 con la cepa Y15 al final del cultivo.

Al realizar el cambio de medio de cultivo el descenso en pH es más marcado durante las primeras 24 horas y alcanzando valores de 2 unidades menores a los valores iniciales en medio GYS y GYS x4 y para ambas cepas.

Se observa un agotamiento de sustrato en los cultivos de la cepa EA3 utilizando medio GYS, agotándose desde las 30 horas en CML y hasta las 72 horas en CMS. Respecto a la cepa Y15, el agotamiento de sustrato se observa solamente en CML a partir de las 24 hora de cultivo, mientras de en CMS hay aproximadamente 8 g/L de glucosa residual al final del cultivo. En el caso del medio GYS x4 el consumo total del sustrato inicial sólo se logra en los CMS en ambas cepas, pues en los CML se mantiene una cantidad de sustrato residual.

Existen diferencias en cuanto a producción de biomasa, en los tres medios de cultivo utilizados; en medio LB la mayor producción de biomasa se obtiene en CML (5.6 g/L para la cepa EA3 y 3.05 g/L para la cepa Y15) en comparación con CMS (1.2 g/L para la cepa EA3 y 1.4 g/L para la cepa Y15). No obstante, en medio GYS la producción de biomasa aumenta respecto al medio LB, aunque la mayor producción de biomasa de ambas cepas se obtiene en CML (8.5 g/L de la cepa EA3 y 9.5 g/L de la cepa Y15). Al utilizar medio GYS x4, la mayor producción de biomasa se obtiene en CMS en ambas cepas (12.7g/L para la cepa EA3 y 13.31g/L para la cepa Y15).

Una variación similar a la observada en la producción de biomasa se aprecia en la producción de esporas, en medio LB y medio GYS la mayor producción de esporas se obtiene en CML ( $6.81 \times 10^8$  esporas/mL y  $4.38 \times 10^9$  esporas /mL respectivamente para la cepa EA3;  $6.39 \times 10^8$  esporas /mL y  $2.53 \times 10^9$  esporas /m). La cepa Y15 no mostró diferencia significativa entre el CML y CMS con medio GYS. Al igual que la producción de biomasa en medio GYS x4, la producción de esporas en dicho medio es mayor en CMS ( $5.09 \times 10^9$

esporas /mL para la cepa EA3 y  $4.11 \times 10^9$  esporas /mL para la cepa Y15) respecto a CML ( $5.5 \times 10^8$  esporas /mL y  $1.1 \times 10^9$  esporas /mL para la cepa Y15).

## **10. CONCLUSIONES**

El método de conservación utilizado es adecuado para mantener la cepa de Bt EA3 por un plazo máximo de tres meses, no obstante, la cepa Y15 es susceptible a este método de conservación pues después de una semana de conservación la viabilidad de las esporas producidas comienza a disminuir en al menos un orden de magnitud.

La composición de cada medio utilizado tuvo un efecto en los parámetros evaluados durante las cinéticas de crecimiento, en medio LB y GYS la producción de biomasa y esporas se ve favorecida en CML.

Existen diferencias intrínsecas en cada cepa para responder al cambio en la formulación del medio, así como en el sistema de cultivo (CML vs. CMS), por ejemplo, sólo la cepa Y15 fue capaz de producir esporas en cantidades similares en el medio GYS, tanto en CML como en CMS. También las diferencias en rendimientos fueron menores entre CMS y CML para esta cepa, en comparación con la cepa EA3. A pesar de tener teóricamente mayor disponibilidad de oxígeno en CMS las producciones de biomasa y esporas no reflejan dicha ventaja en concentraciones bajas de sustrato, probablemente porque la demanda bioquímica de oxígeno está cubierta en medios con concentraciones bajas de nutrientes (medios LB y GYS).

El cultivo sólido podría actuar como un cultivo de lote alimentado en medios con concentración alta de nutrientes (medio GYS x4), reduciendo el estrés osmótico que sufren las células en un cultivo líquido, por lo cual se logra observar un aumento en la producción de biomasa y esporas libres en dicho sistema.

## **11. PERSPECTIVAS**

Como perspectiva del presente trabajo se sugiere comprobar la posible retención de biomasa retenida en la espuma de poliuretano después del proceso de extracción, lo que podría corregir las diferencias entre la producción de biomasa y esporas.

Es necesario determinar la calidad de las esporas que se producen en ambos sistemas de cultivo, por ejemplo, la viabilidad o entomotoxicidad. Es decir, corroborar el efecto que tiene el uso de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción y calidad de esporas y toxina, sobre todo determinar si el CMS produce esporas y toxinas con distinta calidad.

Es conveniente determinar la variedad de *B. thuringiensis* de ambas cepas utilizadas, así como el tipo de proteína Cry sintetizada y la cantidad producida en ambos sistemas de cultivo (CML y CMS), así como determinar si la producción de dicha toxina es dependiente o independiente del proceso de esporulación.

Sería interesante demostrar si existe un proceso de *Quorum sensing* y si éste se favorece en CMS debido al cambio del estado de agregación de los cúmulos de células.

Al corroborar que la cepa Y15 es menos sensible al sistema de cultivo (CML vs CMS), con respecto a la cepa EA3, por ejemplo, en medio GYS x4, se puede usar esta cepa como referencia en un estudio molecular (expresión génica) y bioquímico (solutos compatibles que ayuden a contener el estrés osmótico) para determinar cuáles factores favorecen el crecimiento de una cepa en CMS, donde se usen medios con concentración elevada de materia orgánica. Esto tendría una repercusión práctica para la mejora de cepas aptas para producir esporas y toxinas en cultivos sólidos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Adams, T.T., Eiteman, M.A., Hanel, B.M. (2002). Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresour. Technol.* 82, 33–41.

Aïkpon, Rock; Sèzonlin, Michel; Ossè, Razaki y Akogbéto, Martin. (2014). Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. *Parasit Vectors*, 7:568

Akiba Y., Sekijima Y., Aizawa K. y Fujiyoshi N. (1979) Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. III. Effect of pH on the growth of *Bacillus thuringiensis* in soil extracts. *Jpn J Appl Entomol Z* 23, 220-223.

Akiba Y., Sekijima Y., Aizawa K. y Fujiyoshi N. (1980) Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. IV. The growth of *Bacillus thuringiensis* in soils of mulberry plantations. *Jnp J Appl Entomol Z* 24, 13-17.

Alquisira-Ramírez, E. V.; Paredes- González, J. R.; Hernandez- Velazquez, V. M.; Ramirez-Trujillo, J. A.; Peña- Chora, G. (2014) In vitro susceptibility of *Varroa destructor* y *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie.* 45:707–718.

Araujo, FF; Henning, A; Hungria, M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J Microb biot.* 21 (8-9); 1639-1645.

Berbert-Molina M. A; Prata A. M. R.; Pessanha L.G.; Silveira M.M. (2008) Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis growth on high glucose concentrations. *J Ind Microbiol Biot*, 35: 1397-1404.

Bing-Lan, Liu y Yew-Min, Tzeng. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Eng*, 16: 413-418.

Bravo A., Gill SS y Soberón M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control *Toxicon.*49(4): 423–435.

Cisneros, F. V. (1995). Control de Plagas Agrícolas. 2da ed. Editorial Full Print s.r.l. Lima, Perú. 313 pp. Recuperado de: [http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/cpa\\_toc.htm](http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/cpa_toc.htm)

Dulmage, T. H. (1981). Production of bacteria for biological control of insects, p. 129-139. In Papavizas, G. C. (ed.), Biological control of crop production. Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun and Co., Totowa, N. J.

Dulmage, H.T. y H. De Barjac. (1973). HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of 8-endotoxin. J. Invert Path. 22:273-277.

Dulmage, H.T. y K. Aizawa. (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. pp. 209-237. En E. Kurstak (ed.), Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York.

Ernandes, S., Moraes, I.O. y Del Bianchi, V. (2013) Evaluation of Two Different Culture Media for the Development of Biopesticides Based on *Bacillus thuringiensis* and Their Application in Larvae of *Aedesaegypti*. *Acta Sci Technol*, 35, 11-18. 10.

Farrera R. R., Pérez-Guevara F. y de la Torre M. (1998) Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73 *Appl Microbiol Biotechnol*. 49: 758-765

Fonseca, G. A.; Peña-Chora, G.; Trejo, L. A. G.; Lina, G. L. P.; Rodríguez, B. L. Á. y Hernández, V. V. M. (2013). Patogenicidad y virulencia de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos sobre *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 29(3): 534-544.

Food and Agriculture Organization (FAO) (2001). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001*. Recuperado el 16 de febrero del 2015 de <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s00.htm#TopOfPage>

Gill, Sarjeet S.; Cowles, Elizabeth A. y Pietrantonio, Patricia V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*. 37; 615-36.

Goldberg, I., B. Sneh, E. Battat y D. Klein. 1980. Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *B. thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Bois. *Biotechnol. Lett.* 2:419-426.

Gomma, E.Z. 2012. Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol, *J Microbiol* 50(1); 103-111

Hire RS; Hadapad AB; Vijayalakshmi N y Dongre TK. (2010) Characterization of highly toxic indigenous strains of mosquitocidal organism *Bacillus sphaericus*. *FEMS Microbiol Lett*, 305(2): 155–161.

Horowitz AR; Kontsedalov S.; Khasdan, V. e Ishaaya I. (2005). Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and Their Relevance to Neonicotinoid and Pyriproxyfen Resistance. *Arch Insect Biochem Physiol*, 58: 216-225.

Ikasari L. y Mitchell D.A. (1999). Two-Phase Model of the Kinetics of Growth of *Rhizopus oligosporus* in Membrane Culture. *Biotechnol Bioeng*, 68 (6): 619-627.

Jisha VN, Babysarojam Smitha R, Priji P, Sajith S, Benjamin S. (2015). Biphasic Fermentation Is an Efficient Strategy for the Overproduction of  $\delta$ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Biochem Biotechnol*; 175(3):1519-1535.

Jurat-Fuentes, J.L (2014). Characterization of Cry toxin mode of action. Recuperado el 16 de marzo del 2015, del sitio web del departamento de Entomology and Plant Pathology de la Universidad de Tennessee: <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>

Khanh Dang Vu, Tyagi R. D., Valéro J. R y Surampalli R. Y. (2009) Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:511–519

King E.; Galán W. L.J; Rodríguez P. C.; Luna-Olvera H. H. (1996). Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado el 9 de febrero de 2015 de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yvbxR3qgYnQC&oi=fnd&pg=PA139&dq=hongos+entomopatogenos+en+fermentacion+solida+medicacion+de+dioxido+de+carbono&ots=1zaqYlIpeL&sig=6x8UllKs\\_TxbpZXRJt4t6mmN1UU#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yvbxR3qgYnQC&oi=fnd&pg=PA139&dq=hongos+entomopatogenos+en+fermentacion+solida+medicacion+de+dioxido+de+carbono&ots=1zaqYlIpeL&sig=6x8UllKs_TxbpZXRJt4t6mmN1UU#v=onepage&q&f=false)



Lambert, B. y M. Perferoen. (1992). Insecticide promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* 42: 112-122.

Li J, Carrol J y Ellar DJ. (1991) Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. 353: 815–821.

López M.; Loera O.; Guerrero-Olazarán M.; Viader-Salvadó J. M.; Gallegos-López J. A.; J. Fernández F.; Favela-Torres E. y Viniegra-González G. (2010). Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. *J Chem Technol Biot*; 85: 435–440.

López, O.; Hernández, AF.; Rodrigo, L.; Gil, F.; Pena, G.; Serrano, JL.; Parrón, T.; Villanueva, E. y Pla, A. (2007). Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicol Lett*, 171: 146–153.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2009.

Manual de uso One Touche Ultra recuperado de: [http://www.onetouchla.com/sites/default/files/OT\\_ULTRA\\_ESP\\_PORT\\_10.pdf](http://www.onetouchla.com/sites/default/files/OT_ULTRA_ESP_PORT_10.pdf) el 18 de mayo del 2016.

Martin, P y Travers R. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 55(10); 2437-2442.

Mitchell, D.A.; Berovic, M. y Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Adv Biocheml Eng Biot* (68): 65-135.

Morris O. N, Converse V., Kanagaratnam P. y Davies J. S. (1996) Effect of Cultural Conditions on Spore–Crystal Yield and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai (HD133). *J Invertebr Pathol* 67, 129–136.

Nicholls, Clara I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque Agroecológico. Colombia, Universidad de Antioquia.

Palma L, Muñoz D, Berry C., Murillo J. y Caballero P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*. 6; 3296-3325.

Pirt S. J. (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 163(991): 224–231.

Prabakaran G. y Balaraman K. (2006) Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var israelensis. *Biol Control*, 36: 288–292

Prabakaran G. y Hoti S.L. (2008) Immobilization in alginate as a technique for the preservation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for long-term preservation. *J Microbiol Methods* 72; 91–94

Saksinchai S., Suphantharika M. y Verduyn C. (2001) Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki: a physiological study. *World J Microb biot.* 17; 307-316

Sauka, Diego H y; Benintende Graciela B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el control de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*: 40: 124-140.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR y Dean DH. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.*; 62(3):775-806.

Secretaria de salud. (2014). Informes de morbilidad. Reportes mensuales de la notificación seminal. Recuperado el 16 de marzo del 2015 de [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/inf\\_morbilidad\\_hist.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/inf_morbilidad_hist.html)

Smith, R. A. y Couche, G. A. (1991): The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl Environ Microbiol.* 57, 311-315.

Sosa-López, A. I; Álvarez-Rivera, V. Pazos; Borges, M. G.; González, Garcia M. y Ponce, G. E. (2011). Evaluación Del Método De Conservación En Papel De Filtro En Dos Cepas De *Bacillus subtilis* Cohn, Mediante La Actividad Antagónica Frente A *Rhizoctonia solani* Kühn. *Fitosanidad*, 15: 45-49.

Theunis, W. y Aloali'l, I. (1999). Susceptibility of the Taro Beetle, *Papuana uninodis* (Coleoptera, Scarabaeidae) to Two New *Bacillus popilliae* Isolates from *Papuana spp* *J Invertebr Pathol*, 73, 255–259.

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G y Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 13:157–167.

Zhuang, Li; Zhou, Shungui; Wang, Yueqiang; Liu, Zhi y Xu, Rongxian (2011). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresour Technol*, 102, pages: 4820- 4826.