

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE LA δ-**ENDOTOXINA DE**
*Bacillus thuringiensis***

**INGRID JOHANNA PEÑA VILLAMIL
SANDRA LILIANA QUINCHE FLÓREZ**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D. C. OCTUBRE DE 2001

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
LA ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

INGRID JOHANNA PEÑA VILLAMIL

SANDRA LILIANA QUINCHE FLÓREZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

DIRECTOR

JAIRO CERÓN SALAMANCA

QUÍMICO FARMACÉUTICO, MSc., PHD. BIOTECNOLOGÍA

COORDIRECTOR

FABIO ROLDÁN

MICROBIÓLOGO MSc, PHD (c)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D. C. OCTUBRE DE 2001

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
LA δ-**ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis*****

INGRID JOHANNA PEÑA VILLAMIL
SANDRA LILIANA QUINCHE FLÓREZ

JAIRO CERÓN SALAMANCA

QUÍMICO FARMACÉUTICO, MSc, PhD. BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR

FABIO ROLDAN

MICROBIÓLOGO, MSc, PhD (c)

CODIRECTOR

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D. C. OCTUBRE DE 2001

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
LA δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

INGRID JOHANNA PEÑA VILLAMIL
SANDRA LILIANA QUINCHE FLÓREZ

DR. MARTÍN BAYONA

JURADO

ING. FERNANDO RODRÍGUEZ

JURADO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D. C. OCTUBRE DE 2001

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
LA δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

INGRID JOHANNA PEÑA VILLAMIL
SANDRA LILIANA QUINCHE FLÓREZ

Dr. Carlos Corredor

DECANO FACULTAD CIENCIAS BÁSICAS

Dra. Aura Rosa Manascero

DIRECTORA DE CARRERA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D. C. OCTUBRE DE 2001

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia

Ingrid Johanna

A mis padres y hermano por el
apoyo moral y la confianza brindada
y a Alejandro por el cariño y las
alegrías vividas

Sandra Liliana

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Jairo Cerón Salamanca, por la dirección y ayuda recibida durante la realización del proyecto de grado.

Sonia Ospina, por la orientación recibida en el desarrollo de los procedimientos experimentales.

Victoria Grosso y Wilson Martínez, por su amistad y apoyo incondicional.

Los investigadores del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por el compañerismo expresado en el desarrollo de las investigaciones.

Todos aquellos que colaboraron de una u otra forma para que este proyecto alcanzara las metas propuestas.

La Pontificia Universidad Javeriana por la enseñanza impartida en el ámbito ético y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1 MARCO TEÓRICO	19
1.1 CONTROL BIOLÓGICO.....	19
1.2 GENERALIDADES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
1.3 TOXINAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA δ - ENDOTOXINA.....	24
1.5 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DEL <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
1.5.1 Fermentación sólida	26
1.5.2 Fermentación sumergida.....	27
1.5.3 Fermentación sumergida por lote	28
1.5.4 Fermentación sumergida por lote alimentado.....	30
1.5.5 Fermentación en cultivo continuo	31
1.6 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
1.6.1 Condiciones de operación	43
1.6.2 Requerimientos nutricionales	46
2 OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GENERAL	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 MATERIALES Y MÉTODOS	51

3.1	CEPA DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
3.1.1	Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
3.1.2	Determinación del Perfil Electroforético	52
3.1.3	Conservación de la cepa	52
3.2	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	53
3.2.1	Procesamiento de las fuentes de nitrógeno orgánico.....	54
3.2.2	Fuente de carbono.....	55
3.3	DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO	56
3.3.1	Diseño experimental del medio de cultivo	57
3.3.2	Análisis de resultados	58
3.4	PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO E INÓCULO DEL MEDIO DE CULTIVO.....	58
3.5	CONDICIONES DE OPERACIÓN	59
3.5.1	Fermentaciones a nivel matraz	59
3.5.2	Fermentaciones a nivel laboratorio	59
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	62
3.6.1	Determinación de la densidad óptica.....	62
3.6.2	Determinación de azúcares reductores, método DNS.....	62
3.6.3	Cuantificación de proteína por el método de Lowry	63
3.6.4	Kit glucosa GOD-PAD	64
3.6.5	Recuperación de la espora cristal.....	64
3.6.6	Liofilización	65
3.6.7	Caracterización espora – cristal	65
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67

4.1	AISLAMIENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	67
4.1.1	Características macroscópicas	67
4.1.2	Características microscópicas	68
4.1.3	Análisis electroforético	68
4.2	ESTUDIO PRELIMINAR MEDIO HCO	69
4.3	DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO A NIVEL MATRAZ	70
4.3.1	Selección del medio de cultivo	72
4.3.2	Producción de esporas	73
4.3.3	Biomasa (peso liofilizado)	75
4.3.4	Determinación de proteína asociada al cristal	76
4.3.5	Relación espora cristal	77
4.4	DETERMINACIÓN DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO	79
4.5	FERMENTACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO	81
4.5.1	Resultados de la fermentación	81
5	CONCLUSIONES	85
6	RECOMENDACIONES	86
	BIBLIOGRAFÍA	87
	ANEXOS	97

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamiento de la fuente de carbono	55
Figura 2. Colonia de <i>Bacillus thuringiensis</i> sembrada en medio LB, después de 5 días de incubación	67
Figura 3. Cristal y espora de <i>Bt</i> . Observación microscópica 100X, cristal violeta ..	68
Figura 4. Análisis electroforético de la proteína	69
Figura 5. Fermentación en matraz.....	71
Figura 6. Esporas en los tratamientos evaluados.....	74
Figura 7. Biomasa obtenida en matraz.....	76
Figura 8. Proteína asociada al cristal en los tratamientos evaluados	77
Figura 9. Relación espora – cristal en los tratamientos evaluados	78
Figura 10. Fermentador BIOFLO III utilizado para la fermentación de 3 litros	82
Figura 11. Curva de calibración para determinar glucosa – Método DNS	99
Figura 12. Procedimiento para la curva de calibración de glucosa (DNS).....	100
Figura 13. Curva de calibración para determinar proteína – Método Lowry	103
Figura 14. Procedimiento para la curva de calibración de proteína (Lowry)	104
Figura 15. Cámara de Neubauer	106
Figura 16. Procedimiento para el conteo de esporas en cámara de Neubauer ...	107
Figura 17. Cinética de crecimiento de la fermentación de 3 litros	109
Figura 18. Consumo de sustrato en la fermentación de 3 litros.....	109
Figura 19. Variación de pH durante el tiempo de fermentación de 3 litros	109

TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del Gel.....	52
Tabla 2. Codificación de Sustratos	53
Tabla 3. Cantidad de proteína y volumen de agua utilizado para preparar la solución de las fuentes de nitrógeno orgánico.....	54
Tabla 4. Matriz experimental.....	57
Tabla 5. Codificación de los tratamientos	57
Tabla 6. Condiciones de crecimiento del preinóculo e inóculo	59
Tabla 7 Características generales del fermentador utilizado.....	60
Tabla 8. Condiciones de operación para la fermentación de 5 litros	61
Tabla 9. Velocidades específicas y tiempos de duplicación de los tratamientos evaluados	72
Tabla 10. Preparación de la curva patrón – Método DNS	98
Tabla 11. Determinación de azúcares reductores en la curva patrón.....	98
Tabla 12. Preparación curva patrón – Método Lowry	102
Tabla 13. Determinación de proteína en la curva de calibración.....	102
Tabla 14. Resultados de la fermentación de banco de 3 litros en función del tiempo	108
Tabla 15. Resultados generales de la fermentación de 3 litros	110

RESUMEN

En la mayor parte del mundo se han venido utilizando insecticidas químicos para el control de plagas agrícolas. Sin embargo, debido a que los insectos desarrollan mecanismos de resistencia y tolerancia que les permiten soportar concentraciones cada vez mayores de insecticidas, se ha venido incrementando el empleo de compuestos químicos afectando seriamente la salud del hombre, debido a la contaminación de productos agrícolas, animales benéficos y del medio ambiente en general.

Como una alternativa promisorio para el manejo económico y ecológico de los insectos plaga, surge el control biológico mediante el uso de microorganismos entomopatógenos, garantizando un ecosistema más estable y menos contaminado. La bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es uno de los microorganismos más utilizados para el control de insectos plaga por su alta actividad insecticida y a su alta especificidad.

Desde hace algunos años, como parte del proceso de desarrollo de la biotecnología en el país se han desarrollado investigaciones tendientes a producir Biopesticidas a nivel industrial a partir de aislamiento de cepas nativas promisorias y el conocimiento de algunas variables del proceso de esporulación del *Bt*.

En este trabajo se diseñó un medio de cultivo para la producción del ingrediente activo de *Bt.* empleando una cepa nativa aislada de la Plantación Palmar de Oriente en Villanueva Casanare. Para mejorar las condiciones de producción en bioreactor del ingrediente activo *Bacillus thuringiensis* se estandarizó la preparación del inóculo y se definió la composición del medio de cultivo en matraz utilizando una fuente de carbono (A) y probando tres fuentes de nitrógeno orgánico (B, C y D) y nitrógeno inorgánico (E).

Este trabajo se desarrolló en dos etapas las cuales consistieron en:

En la primera etapa se utilizaron matraces de 250 mL de volumen total con 50 mL de volumen de fermentación, el medio de cultivo fue inoculado con el 10% del preinóculo bacteriano, incubado a una temperatura de 29°C, a una velocidad de agitación de 200 rpm y se seleccionó el medio de cultivo más promisorio para la producción masiva del complejo espora/cristal. Se obtuvo los mayores rendimientos con el medio 31 con una relación carbono:nitrógeno de 6.2:1

En la segunda y última etapa se verificaron los resultados en un volumen de fermentación de 3L, encontrándose que controlando el pH y la aireación aumenta los rendimientos de UFC y esporas/mL.

Introducción

La industria agrícola Colombiana busca el desarrollo de nuevas técnicas de producción sostenibles que garanticen la explotación eficiente de los productos agrícolas y de esta manera se mantenga un ecosistema menos contaminado. Sin embargo los cultivos están siendo afectados por diferentes problemas entre los que sobresalen los insectos plaga (Abarca, 1992).

Para el control de dichas plagas se encuentran los pesticidas químicos, cuyo uso representan a los agricultores elevados costos de producción (Abarca, 1992). El empleo de altas concentraciones en los compuestos tóxicos afecta el medio ambiente y ocasiona problemas en la salud humana. En búsqueda de una solución al uso indiscriminado de insecticidas químicos se ha planteado el empleo de un método que involucra el control biológico como una alternativa dentro de la cual *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) juega un papel importante como controlador de plagas que dañan los cultivos agrícolas (Crickmore, 1998).

La producción de bioinsecticidas a base de *Bt*. requiere el diseño de un medio adecuado para el crecimiento, esporulación y formación de la δ -endotoxina. Es importante conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo a producir. La glucosa es la mejor fuente de carbono, aunque otros compuestos pueden ser utilizados tales como almidón, sacarosa, glicerol y melazas (Smith, 1982).

Además es esencial una adecuada fuente de nitrógeno para el crecimiento de la bacteria. La literatura reporta que la triptona es la fuente preferida de nitrógeno durante la fase exponencial de crecimiento; otros compuestos pueden ser utilizados, tales como harina de soya, puré de tomate, harina de pescado y licor de maíz (Smith 1982).

En la región Oriental del país la Palma de Aceite es cultivada en grandes extensiones de tierra (100.000 ha); la homogeneidad y las características del cultivo inducen o facilitan a la adaptación, evolución y distribución en poblaciones de insectos del orden Lepidoptera y Coleóptera. Una de las principales plagas de importancia económica es el *Loxotoma elegans seller*, el cual consume entre un 50 a 60% el cultivo, afectando el peso y tamaño del fruto causando pérdidas anuales que superan a un 80% en la producción (García, 1994).

Conscientes en el impacto ambiental y en la reducción de costos del cultivo de palma, surgió el interés de encontrar formas alternas para el control de *Loxotoma elegans*. En búsqueda de una solución la empresa Palmar del Oriente quiere producir el ingrediente de *Bacillus thuringiensis* como insumo agrícola, utilizando sustratos de bajo costo en el cual se obtenga una buena producción de la δ -endotoxina.

En este trabajo se estudio el efecto de la fuente de carbono (A), fuentes diferentes de nitrógeno orgánico (B, C y D) y una fuente de nitrógeno inorgánico (E) de bajo costo, para producción del ingrediente activo de *Bacillus thuringiensis*.

Marco teórico

1.1 CONTROL BIOLÓGICO

Desde la segunda guerra mundial se hizo extensivo el uso de plaguicidas especialmente los plaguicidas orgánicos, los cuales ofrecieron ventajas tales como: I. rango amplio de acción sobre casi todas las plagas, II. la acción rápida para prevenir daños. Ambas ventajas reflejaron ingresos económicos rápidos (Cerón, 1991). Sin embargo, pronto emergieron problemas tales como: I. resistencia de las plagas a los productos químicos, II. problemas de residuos, III. retorno de las plagas principales, IV. incremento de las plagas de importancia secundaria, V. destrucción de los enemigos naturales, VI. contaminación ambiental y VII. aumento de costos (Badii, 1994).

Como solución a los problemas generados por el uso indiscriminado de plaguicidas, surgió el control biológico definido como el uso de algunos organismos o su producto para controlar una plaga en particular (Bambara, 1997). Los organismos entomopatógenos utilizados para el control de plagas son diversos; hay un amplio número de virus, hongos, bacterias y protozoarios que se han empleado en la protección de bosques, cosechas y en la preservación de granos almacenados (Cerón, 1991).

El control biológico es una importante alternativa para evitar los problemas antes mencionados, ya que presenta las siguientes ventajas: I. alta especificidad para el

insecto blanco, II. ausencia de toxicidad para plantas, animales y hombre., III. ausencia de contaminación en el medio ambiente y IV. son biodegradables. Entre las desventajas de los bioinsecticidas se encuentran I. una marcada especificidad que limita la efectividad a una sola especie de insectos y II. los costos de producción son altos si se comparan con los de los insecticidas químicos. (Bambara, 1997).

1.2 GENERALIDADES DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt.*), es una bacteria del suelo, Gram positiva, que se caracteriza por la producción de un cuerpo paraesporal durante la esporulación, el cual tiene actividad biocida contra larvas de diferentes insectos. Taxonómicamente el organismo es un miembro del grupo I del género *Bacillus*, de la familia *Bacillaceae*, del orden *Eurobacterial*, *phyllum* Procariota, del reino monera (Bulla, 1980) (Manual Bergey's, 1997), (Faloci, 1990; Cerón, 1995; Rowe y Margaritis 1987; Rodríguez, 1991, Galán 1996).

En la naturaleza *Bt.* puede ser aislado de diferentes hábitats entre los que se incluye al suelo, el follaje de las plantas, los almacenes de granos y desde luego los insectos blanco enfermos o muertos (Manasherob, 1998).

Las células vegetativas de *Bt.* son cilíndricas de dos a cinco μm de largo por un μm de ancho, rodeados por flagelos peritricos. Se divide por fisión binaria que

ocurre frecuentemente en cadenas, forma esporas generalmente ovaladas y un cristal paraesporal. Las esporas son subterminales y el cuerpo paraesporal generalmente aparece afuera de la membrana de la espora, pero dentro del esporangio (Manual Bergey's, 1997).

El *Bacillus thuringiensis* fue aislado en 1902 por Iskiwata a partir de gusanos de seda enfermos, quien establece que sólo la forma esporulada es la que posee toxicidad contra larvas (Rowe y Margaritis, 1987). Posteriormente Berliner en 1911 lo aisló de una larva de una polilla muerta, denominándolo así en honor a Thuringia Alemania, observó la formación de la espora y de una inclusión que estaba formada por un material no usado en el proceso de esporulación, que primero tiene forma de esférica y luego romboidal (Galán, 1996).

El uso comercial de *Bt.* para el control de insectos comenzó en los años 60^S, después del descubrimiento de la cepa HD-1 por Howard Dulmage (subespecie *kurstaki*), resulto especialmente activa contra importantes especies del orden Lepidoptera. En 1977 dos zoólogos israelitas, aislaron un bacilo de larvas del mosquito *Culex* sp, el cual fue identificado y clasificado por De Barjac como *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. La bacteria presentaba un nuevo antígeno flagelar al que se le denominó H-14. Esta variedad se caracterizo por presentar cristales de diferentes tamaños y formas y sobre todo por su patogenicidad hacia larvas del mosquito *Aedes aegypti* (De barjac, 1990).

En 1989, Ohba y Aizawa reportaron 2 nuevas serovariedades pertenecientes al grupo serológico 3, por lo que los subfactores antigénicos para *alesti* y *kurstaki* (De Barjac y Frachon 1990) cambiaron. Las dos nuevas serovariedades fueron tóxicas para tres especies de lepidópteros y no para mosquitos y mosca doméstica. En 1990 se describió la variedad *neoleonensis* como el serotipo H-24, la primera cepa internacional reportada en México.. También se reportaron los serotipos H-27 var *mexinanensis* y el serotipo H-28a:H-28b var *monterrey*. En 1994, Juárez – Perez y *et al.* reportaron el serotipo H-32, aislado de muestras de suelo de Cameroon; en este mismo año, Lee y *et al.* Describieron las variedades coreanensis (H-25), leesis (H-33) y Konkukian (H-34), todas basándose en sus antígenos flagelares.

1.3 TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis se caracteriza por producir una gran variedad de toxinas con diversas propiedades, se han descrito 7 diferentes toxinas para este microorganismo:

- α -EXOTOXINA (Fosfolipasa C o lecitinasa):

Esta toxina ha sido estudiada en relación con la patogenicidad de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*. Es una enzima termolábil, capaz de lisar diversos tipos de células, dado que afecta los fosfolípidos de la membrana, causando acción lítica o necrosante. Estudios sobre la biosíntesis de la lecitinasa producida

por *Bt.*, se demostró que ésta, aparece en la fase logarítmica de crecimiento; su biosíntesis y acumulación ocurre en un rango de pH entre 6.0 – 9.0. Es una proteína termolábil, estable en un rango amplio de pH (3.0 – 9.0) y estable en presencia de tripsina y de urea 8M (Faust, 1982).

- β - EXOTOXINA (Factor mosca):

Es un producto extracelular, dializable, soluble en agua y termoestable, a 120°C por 15 minutos, el cual es producido durante la fase de crecimiento exponencial por algunas variedades de *Bacillus thuringiensis*. Esta toxina afecta insectos tales como *Mamestra brassicae*, *Pieris brassicae*, *Gallería.mellonela*, *Aedes aegypti* y *Musca doméstica* entre otras. (Farrera, 1993).

- δ - ENDOTOXINA:

Es la toxina mas estudiada de *Bacillus thuringiensis*, esta contenida en un cristal paraesporal proteico, el cual es termolábil y soluble en soluciones alcalinas. El cristal se produce después que la bacteria comienza la esporulación y la síntesis es detectada primero en el estado II del ciclo de esporulación, pero el mayor crecimiento ocurre durante las fases III y IV (Faust, 1982).

Generalmente la forma del cristal es bipiramidal, pero se ha encontrado cristales de diversas formas y tamaños, así los cristales de diferentes serotipos difieren de composición y cantidad de cadenas polipeptídicas. La estructura molecular del cristal y su origen exacto en la célula no se conoce, sin embargo, se sabe que la

toxina está presente como una protoxina, la cual es hidrolizada a una forma activa por enzimas proteolíticas del hospedero (Crickmore, 1998).

- Otras toxinas expresadas por *Bt.*:

Una enzima no identificada que puede ser tóxica, denominada λ -endotoxina producida por las variedades *subtoxicus* y *entomocidus*.

Una toxina lábil producida por la variedad *thuringiensis*.

Una toxina soluble en agua producida por la variedad *alesti*.

Una exotoxina conocida como factor ratón producida por las variedades *thuringiensis*, *alesti* y *galleriae* (Crickmore, 1998)

1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA δ -ENDOTOXINA

El mecanismo de infección requiere de la ingestión activa del microorganismo por la larva. Estas larvas poseen en su sistema digestivo una combinación de pH, sales y enzimas necesarias para activar los cristales altamente insolubles. Así que el insecto debe ingerir el complejo espora-cristal, para ser afectado y debe hacerlo en dosis suficientes para que el efecto sea mortal.

La toxina de este microorganismo se sintetiza durante la esporulación. El peso molecular aproximado de esta proteína es de 130 a 140 KDa y se le denomina protoxina, la protoxina es digerida en el intestino medio del insecto por las

condiciones alcalinas y proteasas presentes, liberándose un péptido tóxico de 60 a 70 KDa haciendo que el insecto tenga parálisis en el tracto digestivo y suspenda la ingestión. La toxina primero reconoce y se une a sitios específicos (receptores) localizados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio, induciendo a la formación de poros de membrana. Tal alteración resulta en un flujo bidireccional de iones acompañado por una entrada de agua; Dando como resultado que las células del intestino de la larva se inflamen y terminen lisándose (Cerón, 1991).

La citólisis, se produce por el ingreso de agua en la célula inducida por la toxina, en algunos casos el ambiente creado por la δ -endotoxina puede ser suficiente para la germinación de la espora de *Bt.* y subsecuentemente septicemia (English y Slatin, 1992).

1.5 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DEL *Bacillus thuringiensis*

El fermentador más utilizado es el matraz agitado, debido a su tamaño, operación simple, bajo costo y versatilidad de procesos, como: selección de cepas, desarrollo y optimización de medios de cultivo, establecimiento preliminar de condiciones de cultivo (pH, temperatura), así como en estudios de cinética de crecimiento y de formación de productos (Quintero, 1991).

Existen tres formas para producir *Bt.*, cultivo por lote, cultivo por lote alimentado y cultivo continuo, la más empleada en la producción comercial de *Bt.* es la fermentación por lote (Krieg y Miltenburger, 1984). El *Bacillus thuringiensis* se cultiva por dos métodos: Cultivo estacionario o fermentación sólida y cultivo agitado o fermentación sumergida (Rowe, 1987).

1.5.1 Fermentación sólida

La técnica de fermentación que inicialmente se utilizó para la producción de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* fue la fermentación sólida, en ésta el bacilo se cultiva en una solución nutritiva líquida adsorbida en pequeñas partículas de un acarreador sólido. Esto permite obtener un área interfacial muy alta. Generalmente se utiliza un acarreador de salvado de trigo, maíz molido, cacahuate picado, alfalfa, cascarillas de arroz y de avena y semilla de algodón. Se hace necesario la presencia de aditivos inorgánicos que eviten la formación de grumos y que faciliten la posterior operación de molienda (Rodríguez, 1991).

Ventajas:

- El proceso es barato pues no requiere de equipos sofisticados ni de control riguroso. Además, como el proceso no se lleva cabo en condiciones de esterilidad, resulta muy barato comparativamente a otros métodos de fermentación en lo que se refiere a costos de operación.

- El manejo de la fermentación es relativamente sencillo una vez que se encuentran los parámetros adecuados para la fermentación.
- La obtención del producto final requiere solamente secar, moler la mezcla y adicionar algunos aditivos.

Desventajas:

- Es muy difícil realizar controles adecuados de las condiciones de operación como es el caso del oxígeno transferido, la temperatura y pH.
- La naturaleza no estéril del proceso provoca contaminaciones en las porciones más bajas de la mezcla que son las que están en contacto con el aire.
- Los rendimientos en volumen son relativamente bajos, comparados con la fermentación sumergida.

1.5.2 Fermentación sumergida

El cultivo agitado o fermentación sumergida para la producción de *Bt.* es el método que hasta ahora permite obtener altos rendimientos, calidad homogénea del producto y tiempos de fermentación relativamente cortos. Está consiste esencialmente en inocular en un medio de cultivo líquido, controlando condiciones de crecimiento tales como: temperatura, aireación, pH.

1.5.3 Fermentación sumergida por lote

Un cultivo por lote puede considerarse como un sistema cerrado, en el que todos los nutrientes son colocados en el fermentador antes de la siembra del microorganismo, que crece a expensas de éstos hasta que por lo general uno de ellos es limitante y se agota, cosechándose el mosto al término del proceso. La producción de *Bt.* se realiza actualmente por este sistema (Dulmage, 1981); (Rodríguez, 1991).

Ventajas:

- La fermentación es sencilla desde el punto de vista de operación del fermentador: se esteriliza y se carga el fermentador, se hace la fermentación y posteriormente se descarga el equipo. Todos en una secuencia de operaciones consecutivas.
- Es posible esterilizar el medio de cultivo en el propio fermentador y utilizar este mismo como tanque de sostenimiento de caldo de cultivo con producto mientras éste se procesa. Esto disminuye el número de equipos necesarios si no se tiene un programa de producción muy ajustado.
- El control de proceso es simple ya que se fijan al inicio de la fermentación; se mantienen constantes la temperatura, agitación y alimentación de oxígeno. El tiempo de fermentación se fija hasta alcanzar el porcentaje de esporulación deseado. Para el caso de *B.t* es normalmente de 90 a 95%.

- Es posible efectuar fermentaciones utilizando una cepa diferente *Bacillus thuringiensis* para cada lote, de acuerdo a la demanda del mercado. Esto es una ventaja ya que los requerimientos nutricionales y condiciones de operación de las diferentes variedades de *Bacillus thuringiensis* son lo suficientemente parecidos como para proporcionarlos con un solo equipo y con una flexibilidad intermedia.
- El escalamiento del proceso es simple. Se ha sugerido que el mejor criterio de escalamiento es el de mantener constante la razón de transferencia de oxígeno (OTR) (Razo, 1991).
- Es fácil sincronizar la esporulación del microorganismo debido a que está es espontánea y no es necesario ningún otro manejo tecnológico para lograrlo. Por lo tanto, si el tiempo de fermentación es óptimo se pueden obtener porcentajes muy elevados de esporulación.

Desventajas:

- Requiere habilidad de operación para obtener calidades iguales de lote a lote de producción, a veces empleando el procedimiento de modificar las condiciones de operación para cada lote, que deben seleccionarse sobre la marcha dependiendo de cómo se comporta la fermentación.
- Escalas de producción grandes requieren fermentadores y equipos de almacenamiento con volúmenes mayores que los empleados para un cultivo continuo (Rodríguez, 1991).

- El cultivo por lotes es menos productivo cuando se compara con los otros métodos basándose en el volumen de mosto empleado y al tiempo de fermentación. Esto se debe a que se alcanzan concentraciones celulares menores que con el lote alimentado y además, un porcentaje grande del tiempo de fermentación se pierde en la fase lag y en el inicio del crecimiento logarítmico. Sólo en las últimas horas de fermentación se produce la mayoría de la biomasa y la formación del cristal.

1.5.4 Fermentación sumergida por lote alimentado

El cultivo por alimentado es un sistema abierto, en el cual se adiciona uno o más nutrientes al bioreactor durante el cultivo, existiendo una acumulación de producto y cosechando la suma total al final de la corrida (Quintero, 1991).

El cultivo por lote alimentado ha resultado adecuado para los siguientes tipos de procesos: I. en sistemas con inhibición por sustrato (metanol, etanol, ácido acético, etc); II. para alcanzar altas concentraciones celulares; III. para minimizar el efecto de la glucosa (Rodríguez, 1991).

El propósito principal de la operación en lote alimentado es de controlar la concentración de sustrato limitante en el mosto de la fermentación. Para lograr establecer: I. Los nutrientes a adicionar y II. El modo de adición.

Ventajas:

- Se obtienen concentraciones celulares y productividades mayores a las del cultivo por lote. Los primero debido a que se permite un crecimiento adicional con un menor incremento de volumen y lo segundo por que una porción mucho mayor del tiempo de fermentación se emplea en la producción de biomasa (Rodríguez et al., 1991).

Desventajas:

- Puede tener problemas de efectos de inhibición del crecimiento ya sea por concentración de metabolitos excretados al medio o por inhibición por sustrato, si la alimentación no se hace al régimen adecuado.
- Este método requiere de una determinación más exacta de los nutrientes que se deben adicionar para controlar el crecimiento.
- Es necesario el uso de métodos y equipos sofisticados de control del proceso y de la adición del nutriente limitado, sobre todo si el control es por retroalimentación (Rodríguez, 1991).

1.5.5 Fermentación en cultivo continuo

Un sistema de cultivo continuo es un sistema abierto en el que existe simultáneamente una entrada de medio fresco y una salida de mosto fermentado (Wang, 1979) demostraron que el operar la fermentación de manera continua se

puede obtener una mayor productividad en el proceso si se le compara con el proceso por lote.

Ventajas:

- Es posible tener un control de la velocidad de crecimiento del microorganismo y al menos teóricamente esta velocidad puede mantenerse por un tiempo indefinido.
- En el interior del fermentador, tanto la concentración celular como las condiciones de operación pueden mantenerse constantes y dependen de la velocidad de dilución, que pueden manipularse con facilidad. Esto permite una investigación más adecuada de la respuesta fisiológica del microorganismo a cambios ambientales, ya que estos pueden fijarse con bastante exactitud. De manera similar, permite una determinación más precisa de las constantes cinéticas de la bacteria (Dawson, 1985).
- Este método pueden utilizarse para optimizar la composición del medio de cultivo empleando una técnica de pulsos (Mateles y Battat, 1975), (Goldberg, 1981).
- Se necesitan equipos comparativamente más pequeños para emplearse en escalas de producción bastante mayores.

Desventajas:

- El crecimiento sostenido de una cepa por períodos prolongados tiende a favorecer competitivamente a las cepas o a generar mutantes, estos no

siempre son superproductores cristales (Harder et al., 1977), provocando pérdidas en la capacidad productiva de la cepa original.

- El prolongado periodo de operación, con inyección continua de nutrientes y de aire que requieren estar estériles, produce mayores posibilidades de contaminación.
- Se puede presentar asincronías en la esporulación, dependiendo de la velocidad de dilución.
- Si aparecen problemas de concentraciones celulares en espumas, agregación de células o depósito en las paredes de acumulaciones celulares la fermentación puede desestabilizarse, llegándose a un eventual lavado del recipiente (Rodríguez, 1991).

1.6 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE *Bacillus thuringiensis*

Para la producción del bioinsecticida a partir de *Bt.* es necesario un medio de cultivo que estimule al microorganismo a producir el complejo espora-cristal de manera rápida y permita que la δ -endotoxina conserve la actividad biológica.

El Instituto Pasteur en 1956 publicó un procedimiento para la producción de esporas y cristal en un medio líquido con glucosa como fuente de carbono. En 1968, Dubois Normano estudió un medio que relaciona los requerimientos para el

crecimiento y la esporulación, en el cual se observó la letalidad de la proteína (Tzeng, 1998).

Dulmage en 1970 comparó la producción de esporas y δ -endotoxina, utilizando varios medios complejos apropiados para la producción industrial, determinó que la actividad insecticida no depende de la cantidad de microorganismos empleados para el crecimiento, ésta depende de la especie y del medio para la producción de la toxina. Como las concentraciones de carbohidrato juegan un papel importante en la producción de la δ -endotoxina, se determinó que las condiciones óptimas para la formación de cristal del *Bt.* son de 6 a 8 g de glucosa por litro de medio semisintético, ya que las adiciones mayores de glucosa no incrementan la producción de la toxina. Posteriormente en 1971, recuperó complejos espora - δ -endotoxina de 16 aislados de *Bt.* var *alesti* (serotipo 3 a) y de 2 cepas de *Bt.* var *kurstaki*, cultivadas en 3 diferentes medios de fermentación a base de sales minerales, utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, tales como triptona, harina de semilla de algodón, harina de soya, etc. Demostró que la cantidad δ - endotoxina producida por las diferentes cepas varía ampliamente en relación con el serotipo y medio de cultivo (Dulmage Y Rodees, 1971; Dulmage, 1971).

Sherrer y col. (1973) investigaron el efecto de la concentración de glucosa y la aireación en un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y sales, encontrando que la concentración de glucosa no afecta el tamaño de la espora ni

el grado de toxicidad; sin embargo, si afecta la longitud del cristal, el cual presentó una longitud promedio de 0.2 a 0.5 m, cuando se incrementa la glucosa de 0.1 a 0.6 %.

Uno de los estudios más completos sobre los requerimientos mínimos nutricionales para el crecimiento, esporulación y formación del cristal es el realizado por (Nickerson 1974), utilizando 18 especies de *Bt*, en donde se comprueba que el microorganismo no crece en cantidades mínimas de glucosa y sales, pero al adicionar citrato, aspartato o glutamato, se produce un efecto contrario en todas las especies empleadas. Se recalca la importancia de los requerimientos minerales, especialmente de los iones manganeso, potasio, calcio y zinc y en algunos casos de los iones hierro y cobre, para el crecimiento o la esporulación, sin que se requiera de vitaminas en las especies ensayadas.

Goldberg y col. (1980) describieron un medio complejo espóra - δ -endotoxina de *Bt*. a escala piloto, con fermentadores de 500 L de capacidad y glucosa 30.0 g; Peptona de soya 20.0 g; Extracto de levadura 4.5 g; líquido de remojo de maíz 5.0 ml; KCl 3.0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g; H_2PO_4 7 mL; MgSO_4 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 36.0 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.5 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 40.0 mg; por cada 1000 mL de agua destilada a 32°C con aireación de 0.3 VVM, agitación de 120 a 160 rpm., pH 6.2 a 7.4 con una producción de 4×10^9 UFC/ mL en 60 h de operación aproximadamente.

Couch y Ross (1980), trabajaron con *Bt*. propagándolo en diversos productos naturales como fuentes de nitrógeno, tales como harina de pescado, harina de

semilla de algodón, líquido de remojo de maíz, harina de soya, levadura autolizada y caseína. Las fuentes de carbono incluyen productos de maíz hidrolizados, almidón y dextrosa, los cuales son adecuados para disminuir los costos de producción.

Al evaluar cuatro fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, glicerol y aceite de soya), Smith 1982 obtuvo mayor eficiencia en cuanto a la producción de la toxina con la glucosa, pero un menor efecto tóxico, comparada con la toxina producida utilizando como sustrato glicerol. La glucosa parece ser la más apropiada (Smith, 1982) aunque se ha usado almidón, la sacarosa, el glicerol y lactosa (Ertola, 1985) siendo esta más fácilmente asimilable por el microorganismo. Hay resultados que muestran que el cambio en la fuente de carbono provoca variaciones en la actividad biológica y en la morfología de los cristales a las alteraciones en la velocidad de síntesis de las δ -endotoxinas contenidas en los cristales (Smith, 1982; Yudina, 1992).

Arcas y colaboradores (1984) consideraron la influencia de los componentes del medio en la producción espora-cristal, concluyen que la adición de micronutrientes (iones manganeso, magnesio y calcio) incrementa la productividad; al utilizar 20g/L de glucosa obtienen 5.4 g de células/L (peso seco) y 1.75×10^9 esporas/mL. Encuentran la necesidad de usar una fuente adecuada de nitrógeno orgánico, de las cuales el extracto de levadura es la más conveniente, generalmente debe usarse en combinación con la fuente inorgánica (sulfato de amonio). El aporte más importante radicó en proponer el uso de una combinación de fuente de nitrógeno

orgánico (debido a que la bacteria requiere de algunos aminoácidos o péptidos esenciales para el crecimiento) e inorgánico.

Del trabajo de Sakharova (1987), se concluye que la reducción en el número de células y en la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial, afecta la formación de esporas sin inhibirla, debido al exceso de glucosa en el medio; este efecto no se observó en altas concentraciones de extracto de levadura (20 g/L).

Se ha podido demostrar que la fuente de carbono más apropiada, tanto para el crecimiento como para la esporulación, es la glucosa (Smith, 1982; De Urquijo, 1987). Según indican Dulmage y colaboradores, los niveles de azúcar deben seleccionarse con cuidado, debido a que su metabolismo produce compuestos ácidos que pueden disminuir demasiado el pH y detener la fermentación (Foda, 1985). La glucosa tiene gran relevancia sobre el proceso de producción de biomasa y la esporulación obteniéndose una mayor cantidad de esporas que cristales, lo cual es inconveniente para la obtención de las toxinas, (Acosta y Navarro, 1994; Berdugo, Zamora, 1995) obteniendo un producto con baja actividad.

Algunos autores reportan que existe una fuerte correlación entre el nivel de glucosa inicial y la aireación, dado que al incrementar la glucosa es necesario incrementar la aireación para que haya un rendimiento significativo (Foda, 1985), (Arcas, 1987).

Pearson y Ward (1988) estudian la composición del medio en el inóculo y la fermentación que incluyó dos etapas: en la primera se inhibía la esporulación de las células al utilizar medios ricos en proteínas y en la segunda se producía la esporulación del mas del 90% de las células en 48 horas de fermentación, debido al alto contenido de carbohidrato en relación con la proteína.

Determinaron que un inóculo en estado vegetativo produce mayor eficiencia en la esporulación y liberación del cristal en la etapa de producción del bioinsecticida. En el trabajo a nivel de planta piloto se determino la importancia de la aireación en el crecimiento y su efectividad en el proceso de esporulación. Al escalar el proceso se realizan dos etapas de inoculación por la necesidad de una mayor número de células viables (Pearson y Ward, 1988).

Faloci y col. (1989) observaron los efectos de la composición de los parámetros de crecimiento, producción total de proteína y la relación de las propiedades biológicas del *Bt.* con varios medios de cultivo, utilizando como fuente de carbono glucosa o glicerol (8 g /L), junto con una de las seis fuentes de nitrógeno. Al reemplazar la glucosa con el glicerol se aumento la biomasa, la proteína total y el rendimiento de proteína, siempre y cuando utilizaran una fuente de nitrógeno distinta de ácido casamino y extracto de levadura. Con glucosa como fuente de carbono, encontraron mejores resultados; empleando extracto de levadura o peptona de caseína para producir un mayor número de esporas.

Los medios ricos en proteína pueden inhibir la esporulación, Pearson y Ward recomiendan estos medios para el desarrollo de inóculos en donde la esporulación no sea deseable, caso opuesto a la producción de δ -endotoxina. Estos autores indican que la formación de spora y la producción de proteasas por varias cepas del bacilo, están reguladas por la represión catabólica del nitrógeno (Pearson, 1988). Lo cual esta relacionado con la relación de carbono - nitrógeno.

Avignone (1989) realizó investigaciones con el objeto de estudiar la influencia de las combinaciones de nitrógeno orgánico (extracto de levadura) e inorgánico $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ y la relación C:N sobre el crecimiento y producción de proteína en la variedad *israelensis*. A relaciones C:N en el intervalo 0.66 - 1 el microorganismo encuentra nueva fuente de carbono en el extracto de levadura, luego que la glucosa ha sido totalmente metabolizada. El extracto sólo no garantiza una buena producción de toxina, entonces es combinado con sulfato de amonio, mostrando que tienen más influencia la combinación de las fuentes de nitrógeno que la relación C:N.

El balance entre C y N debe existir para obtener una buena producción. Anderson encontró que a bajas relaciones de carbono: nitrógeno, el rendimiento con base a glucosa Y^X/s está muy por arriba de 1, esto demuestra un extenso uso de aminoácidos como fuente de carbono y energía, por lo que se recomienda utilizar relaciones C:N mayores a 1. En relaciones muy altas de carbono nitrógeno, la glucosa no se agota y el número de células y la biomasa disminuyen.

Con medios de cultivo balanceados, el rendimiento es máximo con una utilización de glucosa máxima. El rendimiento de biomasa es mayor en un medio balanceado, disminuye en uno con una relación C:N baja y disminuye aún más en una relación C:N alta.

En 1992, Abarca y colaboradores, trabajando en la optimización del medio de cultivo y condiciones de operación, utilizan puré de tomate y harina de soya como sustitutos de la fuente de nitrógeno, evalúan niveles altos y bajos de ellos y glucosa; producen esporas en 24 horas de fermentación, luego de optimizar las condiciones de operación a nivel planta piloto pasan de producir 5×10^5 esporas/mL a $5,5 \times 10^9$ esporas/mL.

Acosta y Navarro (1994), en el IBUN, realizaron un estudio de tres fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y glicerol) con el fin de determinar cual permite mayor producción, evaluaron el efecto del extracto de levadura y sulfato de amonio sobre la producción de la toxina. Concluyeron que la mejor fuente de carbono es la glucosa, empleando como parámetro de evaluación el conteo de esporas. El medio recomendado contiene 6g/L de glucosa, 2 g/L de sulfato de amonio y 2 g/L, de extracto de levadura. En un trabajo posterior del IBUN, se desarrolló una metodología de evaluación de factores nutricionales a diferentes niveles en la producción del bioinsecticida (Berdugo y Zamora 1995). Este trabajo recomendó la utilización de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , en niveles donde se encuentre una mayor capacidad amortiguadora. Se concluyó que la biomasa no guarda una relación directa con la producción de esporas y proteína.

Se considera que *Bt.* requiere de cinco iones metálicos para su crecimiento, esporulación y liberación del cristal: magnesio, manganeso, hierro, zinc y calcio. Estos están normalmente presentes en las fuentes de carbono y nitrógeno regularmente empleadas, no siendo por lo general necesario incorporarlos al medio (Acosta y Navarro, 1994). Verdugo y Zamora (1995), y Beltrán y Díaz (1997) encontraron que los componentes minerales del medio de cultivo afectan la producción de biomasa, el proceso de esporulación y la cantidad de proteína obtenida.

En resumen, *B. thuringiensis* puede crecer en medios definidos como agar nutritivo, leche peptonizada, GYS, etc. (Ibarra, 1993) o en medios industriales con diversas fuentes de carbono y nitrógeno, como: glucosa (dextrosa grado técnico), fructosa, almidón, maltosa, ribosa, glicerol, glutamato, sacarosa, lactosa, suero de leche, aceite de soya, melazas de cana o remolacha, harina de maíz, ácidos orgánicos y aminoácidos; pero no con todas se puede obtener un cristal grande, bipyramidal y tóxico, por ejemplo la falta de un carbohidrato fácilmente metabolizable produce una esporulación defectuosa (Nickerson, 1974 y Farrera, 1992). La lactosa se reporta como estudiada pero no se reportan los resultados obtenidos con su utilización en el medio aunque es muy fácil de conseguir o puede ser remplazada por sustancias que la contengan como el suero de leche. Los otros como el glicerol, glutamato y fructosa son costosos y de difícil consecución (Galán, 1996).

Para *Bt.* es esencial en el crecimiento una adecuada fuente orgánica de nitrógeno, se han utilizado como fuentes de nitrógeno materiales de alto contenido proteico: varios tipos de peptonas, maíz remojado, harina de soya, harina de pescado, harina de sangre, caseína hidrolizada, extracto de levadura, peptona de soya, gluten de maíz, levadura de cerveza, lactoalbúmina, caseína, harina de semilla de algodón, bactopectona, triptona y otros materiales (De Urquijo, 1987), (Heredia-Segura y Pulido-Vega, 1992), el extracto de levadura parece ser el más conveniente (Ertola, 1985).

Los requerimientos de nitrógeno pueden satisfacerse también con nutrientes orgánicos que contengan este elemento como aminoácidos o productos más complejos de la degradación de las proteínas (aminoácidos libres) como las peptonas o el extracto de levadura, que resultan costosas (Dulmage, 1987). En caso contrario, es necesario aplicar tratamientos de hidrólisis parcialmente las proteínas y péptidos presentes para que el rendimiento de producción de toxina sea adecuado (Egorov, 1982; Sakharova, 1984; Sakharova, 1985; Stanier, 1988).

Se concluye que en la producción de proteína y por ende de δ -endotoxina, las interacciones más importantes de los componentes del medio de cultivo son: K_2HPO_4 - $MnSO_4$, K_2HPO_4 - $MgSO_4$, K_2HPO_4 - $((NH_4)_2SO_4)$. K_2HPO_4 - $MgSO_4$. De manera que un medio de cultivo apropiado para la formación de cristal debe contener fosfatos ácido y diácido de potasio y también ha de poseer sulfato de magnesio, ya que resultan ser las interacciones más relevantes en la formación de espora y cristal.

1.6.1 Condiciones de operación

Las variables de proceso importantes en la fermentación de *Bt* son la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, el pH y velocidad de aireación (Ertola 1985; Holmber et. al. 1980; Arcas et. al., 1984).

pH:

Al inicio de la fermentación el pH disminuye a valores cercanos a 5.8 debido a la glicólisis y a la acumulación de lactato, piruvato y acetato. En la esporulación la glicólisis cesa por completo y toda la producción de energía depende del PHB acumulado y del empleo de aminoácidos (Valina, isoleucina, leucina, etc.). Estos últimos entran al catabolismo vía reacciones de transaminación y a través de las tres rutas de los aminoácidos de cadena ramificada. Un efecto externo de esto es el incremento del pH del medio de cultivo, que puede llegar a valores cercanos de pH 8. Este incremento debe controlarse, ya que el cristal paraesporal es soluble a pH de 9, lo que reduciría la efectividad del bioinsecticida.

Los estudios realizados por diferentes investigadores con respecto al pH, han arrojado resultados contradictorios. Así Smith (1982) y Holmberg (1980) determinaron que la concentración de δ -endotoxina no varía en el intervalo de pH entre 5.7 y 8.1, aunque el conteo de esporas presenta variaciones en ese intervalo. Holmberg y colaboradores (1980) confirmó que la concentración de δ -

endotoxina no tuvo variación en el intervalo de pH 6.5 a 8. El pH inicial del medio es generalmente de 6,8 a 7,2 (Abarca, 1991). Sin embargo se ha observado que hay baja producción de toxina si el pH del medio no se controla cerca a la neutralidad (Sikdar, 1991). El pH óptimo para el crecimiento de *Bt.* está muy cerca del valor de la neutralidad (6.8-7.2) (Kenney, 1981).

Aireación:

El crecimiento de *Bt.* se realiza mediante una fermentación aerobia y su éxito depende de la capacidad del reactor para transferir oxígeno del aire al medio de cultivo (Aiba y Yamada, 1961; Calderbank, 1958; Mancy y Okun, 1963).

El consumo de oxígeno por parte del bacilo es variable durante la fermentación: durante la fase de crecimiento vegetativo, se incrementa el consumo de manera proporcional al incremento de la biomasa, mientras que en la fase de transición disminuye, incrementándose de nuevo hasta un valor menor al primer máximo en la fase de esporulación. Arca y colaboradores (1987) indicaron que el uso del oxígeno es mayor al aumentarse la disponibilidad de la glucosa y el resto de los componentes del medio.

Se ha establecido que las altas velocidades de aireación son esenciales para la formación de la spora y la toxina (Scherrel, 1973), (Dulmage, 1981), (Zamola, 1981), (Lüthy, 1982), (Ignatenko, 1983), (Arcas, 1985), (Anderson, 1990). La aireación elevada (mínimo 20% del valor de la saturación) presenta alta productividad de esporas (7.36×10^9 esporas/mL). El efecto de esta aireación es

impedir la excesiva acumulación de ácidos orgánicos resultantes de la glicólisis, acelerando su uso como sustratos de la primera parte del CAT y evitando así la inhibición del crecimiento por bajo pH (Arcas, 1987).

Agitación:

El impulsor más usado en procesos de fermentación y operaciones de contacto gas líquido es la turbina “Rushton” ya que produce los valores de K_{La} más altos y simultáneamente proporciona altas velocidades de corte o turbulencia (Vardar y Sukan, 1985).

La agitación tiene las siguientes funciones básicas: I. asegura la homogeneidad del cultivo a través de macromezclado; II. provee una área superficial grande para la transferencia de masa; III. provee la transferencia de calor y IV. provee transferencia de masa interfacial por medio de micromezclado. Estas funciones requieren de gasto de energía mecánica, la cual es suministrada por el movimiento de uno o varios impulsores (Brawer 1987).

Temperatura:

El bacilo puede crecer en un rango de temperaturas entre 24 y 42 °C. Las altas temperaturas impiden la producción de la δ -endotoxina y favorecen la selección de cepas acristalíferas y asporogénicas por pérdida de plásmidos (Dulmage, 1971). La producción de δ -endotoxinas es óptima entre 28 °C y 32°C, pero se presenta

mejor crecimiento alrededor de 30°C, temperatura recomendada para la fermentación (Ignatenko, 1983), (Rowe, 1987).

1.6.2 Requerimientos nutricionales

La producción del bioinsecticida del *Bt.* exige un diseño adecuado del medio de cultivo para el crecimiento, esporulación y formación de endotoxina; por esta razón, es importante conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo (Rodríguez, 1991).

El fósforo y el magnesio son constituyentes particularmente importantes en el medio, puesto que éstos intervienen en las reacciones que involucran el Adenosin Difosfato en la transferencia de energía. El calcio, potasio, azufre y sodio se encuentran en significativa proporción en la célula.

La presencia de manganeso Mn^{+2} , puede considerarse esencial para la formación de la endoespora para las distintas especies de bacilos. El potasio también es fundamental para el crecimiento, esporulación y formación de endotoxina. La limitación del crecimiento por calcio produce esporas menos resistentes al calor. La importancia del cinc, puede relacionarse con el alto contenido de este elemento en las esporas del *Bacillus cereus*, especie que está estrechamente relacionada con el *Bt.* (Ertola, 1985).

Se considera también que *Bt.* requiere de iones metálicos para su crecimiento, esporulación y producción del cristal, como son: calcio, potasio, manganeso, magnesio, zinc, hierro y cobre. La razón por la que deben utilizarse dichos iones es la siguiente:

- Ca^{2+} : Es importante en la esporulación puesto que forma con el ácido dipicolínico el dipicolinato de calcio, constituyente importante de la pared de la espora que resulta un compuesto estabilizador especialmente para el calor y rayos UV.
- K^+ : Es fundamental para el crecimiento, esporulación y producción de endotoxinas (Wakisaka, 1982). Se sabe además que la capacidad para degradar PBH (compuesto intermediario en el ciclo metabólico de *Bacillus thuringiensis*) depende entre otros factores de la presencia de potasio.
- Mn^{2+} : Esencial para la formación de endosporas en las diferentes especies de *Bacillus*, su deficiencia afecta la actividad de fosfoglicerato-fosfomutasa, porque esta enzima requiere de Mn^{2+} como cofactor.
- Mg^{2+} : Junto con el fósforo intervienen en la reacción que involucra Adenosín Difosfato (ADP) en la transferencia de energía.

Se incluyen también Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} en menor grado ya que su ausencia podría limitar el crecimiento (Berdugo, 1995). El orden adición de los iones puede afectar la cantidad de sólidos en suspensión o precipitados en el medio. Para la preparación de la solución de sales que contiene dichos iones, en el orden de adición que menor precipitado genere, se utilizó el principio que la absorbancia de

una mezcla de soluciones ideales es la suma de las absorbancias individuales de cada solución inicial (Marón, 1994).

1.6.2.1 Fuente de carbono

Un gran número de microorganismos obtienen el carbono principalmente a partir de nutrientes orgánicos. Además de sufragar las necesidades biosintéticas de carbono a la célula, los substratos orgánicos deben aportar los requerimientos energéticos de la célula. Por consiguiente, mucho del carbono presente en el substrato orgánico entra en la ruta del metabolismo que proporciona energía y posteriormente es excretado de la célula como CO₂, o como una mezcla de CO₂ y productos orgánicos (los productos finales típicos del metabolismo fermentativo). Así, los substratos orgánicos tienen un doble papel nutritivo, sirven a la vez de fuente de carbono y de fuente de energía (Rodríguez, 1991).

Como ejemplos de fuentes de carbono se encuentran glucosa, sacarosa, melazas, etc. La glucosa puede usarse comúnmente como fuente de carbono y energía para el crecimiento aeróbico. Para el caso del *Bt.*, ésta parece ser una de las mejores fuentes de carbono, aunque algunos prefieren el almidón, la sacarosa o el glicerol (Ertola, 1985).

1.6.2.2 Fuente de nitrógeno

El nitrógeno se encuentra en la célula principalmente como grupo amino. La bacteria asimila este elemento en estado inorgánico oxidado como nitrato, por lo tanto su utilización implica una reducción preliminar. El requerimiento de la fuente de nitrógeno reducido puede satisfacerse mediante la provisión de nitrógeno en forma de sales de amonio.

Los requerimientos de nitrógeno pueden satisfacerse también con nutrientes orgánicos que contengan este elemento como aminoácidos o productos más complejos de la degradación de las proteínas como las peptonas. Tales compuestos pueden ser también fuentes de carbono y energía, que satisfagan simultáneamente los requerimientos celulares de carbono, nitrógeno, azufre y energía (Stanier, 1988).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes sustratos como fuente de carbono y nitrógeno para la producción de cristal proteico de *Bacillus thuringiensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar los parámetros cinéticos asociados con el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, producción de Biomasa y δ -endotoxina en los diferentes medios.

Determinar la mejor relación de Carbono/Nitrógeno de las fuentes empleadas con respecto a la producción de Biomasa y δ -endotoxina.

Evaluar el medio de cultivo seleccionado bajo condiciones de fermentador de 5L.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CEPA DE *Bacillus thuringiensis*

En el desarrollo de este proyecto se utilizó una cepa aislada de *Bacillus thuringiensis* (Bt), de larvas de *Loxotoma elegans* (Lepidóptero), recolectadas al azar del lote D de la Plantación Palmar del Oriente ubicada en Villanueva Casanare.

3.1.1 Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*

El aislamiento de *Bacillus thuringiensis* se llevó a cabo por el método reportado por Travers en 1987. En cual las larvas recolectadas de *Loxotoma elegans*, se colocaron en cajas de petri, se lavaron con hipoclorito de sodio 2.5% y con 10 ml de agua destilada, por dos a tres minutos, se sumergieron en agua destilada por dos minutos, este procedimiento se repitió tres veces; posteriormente se maceraron y se colocaron en caldo nutritivo con y sin acetato para inhibir la germinación de esporas; se incubaron a 29°C por 12 horas. Luego se realizo diluciones seriadas hasta 10^4 y se sembró en cajas de petri con agar nutritivo; se le realizo tinciones simples con Cristal Violeta por dos minutos para luego ser observadas al microscopio.

3.1.2 Determinación del Perfil Electroforético

Se utilizó el método de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 9% de acuerdo con lo reportado por Cerón en 1991.

La electroforesis es un método de separación de las fracciones celulares especialmente de proteínas y ácidos nucleicos. El principio de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su carga neta, tamaño y forma.

El gel de se elaboró de acuerdo a la siguiente composición:

	Gel separador (5mL)	Gel concentrador (2 mL)
Agua destilada desionizada	2250 μ l	1210 μ l
Poliacrilamida	1500 μ l	250 μ l
Tris-HCl pH 8.8 (1.5M)	1250 μ l	-----
Tris HCl pH 6.8 (0.5M)	-----	500 μ l
SDS 10%	-----	20 μ l
PSA 10%	30 μ l	20 μ l
TEMED	3 μ l	2 μ l

Tabla 1. Composición del Gel

3.1.3 Conservación de la cepa

La cepa aislada de *Bacillus thuringiensis* se conservo en cajas de petri con agar Luria Bertani (LB), el medio se esterilizo a 15 psi por 20 min. En cada caja de petri se colocaron 25 ml del medio y luego de gelificado se hizo la siembra, al termino de la esporulación se conservó a 4°C por 2 meses.

3.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la preparación de los medios de cultivo se tuvo en cuenta las concentraciones utilizadas por Cerón en 1991 de fuente de carbono, nitrógeno y sales del medio HCO (Cerón, 1991) y se utilizó como medio control (HCO) cuya composición es:

	g/L
KH ₂ P0 ₄	6.8
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12
MnSO ₄ 4 H ₂ O	0.0022
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.014
CaCl ₂	0.2343
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278
Triptona (Fuente de nitrógeno)	7
Glucosa (Fuente de Carbono)	3

El pH de los medios de cultivo diseñados y el medio control se ajustaron a 7.2 con la adición de NaOH 2N o HCl y se esterilizaron por 20 min a 15 psi .

Se utilizaron 5 sustratos para el diseño de los medios de cultivo, los cuales fueron designados con las siguientes letras:

Fuente de Carbono	A
Fuente de Nitrógeno Orgánico	B
Fuente de Nitrógeno Orgánico	C
Fuente de Nitrógeno Orgánico	D
Fuente de Nitrógeno Inorgánico	E

Tabla 2. Codificación de Sustratos

3.2.1 Procesamiento de las fuentes de nitrógeno orgánico

Durante la parte preliminar del experimento se evaluaron dos formas de extraer la proteína: 1. Colocando la fuente de proteína (B, C y D) sobre un papel de filtro, pasándole agua caliente; 2. Dejando la fuente de proteína (B, C y D) dentro de agua y calentándola hasta ebullición (Tabla 3) (Lozano y Gómez, 1998).

Se estableció que este último método era el más adecuado y que el tiempo de ebullición dependía del volumen a preparar.

Dado que la solución de proteína a adicionar al medio, dependía de la concentración de proteína en la solución y esta a su vez dependía del lote y de la calidad de las materias primas, cada vez que esta se preparó se realizó el procedimiento de cuantificación de la cantidad de proteína por el método de Lowry.

Fuente de proteína	Estado de la fuente de proteína	Cantidad de la fuente de proteína	Volumen de agua	Método de separación
B.	Grano molido.	45.34 g	1000 mL.	Centrifugación a 5000 rpm por 20 min. – Filtración.
C.	Grano molido.	203 g	1000 mL.	Filtración en caliente. – Centrifugación
D.	Grano molido.	211.58 g	1000 mL.	Filtración en caliente. – Centrifugación.

Tabla 3. Cantidad de proteína y volumen de agua utilizado para preparar la solución de las fuentes de nitrógeno orgánico¹

¹ Fuente: Lozano y Gómez 1998

3.2.2 Fuente de carbono

A la fuente de carbono A utilizada se le realizó el tratamiento (Figura 1) se peso A manteniendo una relación 1:1 con agua destilada, se adiciono H_2SO_4 al 97% para disminuir el pH a 3.5 el cual ayudo a flocular las partículas presentes en esta fuente. Como A presentaba residuos que con la adición de H_2SO_4 no flocularon se centrifugo a 5000 rpm por 20 min. Al cabo de este tiempo se coloco en baño maría para hidrolizar por 15 min; se neutralizo con NaOH 5N para poder determinar azúcares reductores por el método DNS reportado por Miller 1959

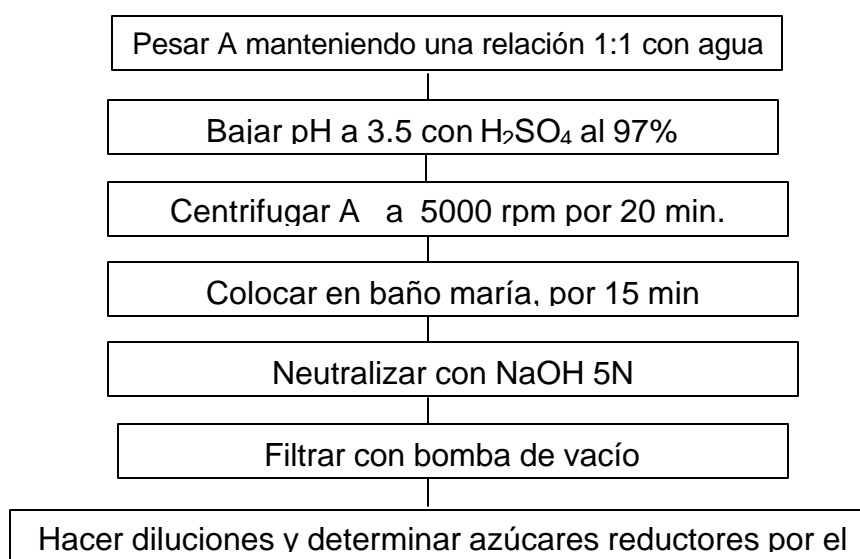


Figura 1. Tratamiento de la fuente de carbono²

² Fuente: Carvajal 2000

3.3 DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

La producción masiva de un microorganismo involucra el estudio de todos los nutrientes que el microorganismo requiere para su crecimiento, debe suministrarse una fuente de energía y fuentes de materia que contengan todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas para la composición interna del microorganismo (Quintero, 1981).

Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon fuentes de carbono y nitrógeno reportados en la literatura (Galán 1996), de fácil adquisición y de bajo costo.

Después de varios ensayos variando las fuentes de nitrógeno, dejando estable la fuente de carbono y utilizando las sales que intervienen en el proceso de esporulación y producción del cristal, se formuló un medio base empleando sustratos designados con letras debido a que se diseñó un medio de cultivo que posteriormente será registrado y utilizado en la industria.

3.3.1 Diseño experimental del medio de cultivo

El objetivo del diseño experimental fue determinar los factores relevantes en el medio de cultivo; se utilizó un diseño que permitió estudiar un grupo de variables que pueden o no interactuar entre sí. Así se puede llegar a conocerse el efecto de un gran número de factores sobre una variable respuesta.

De acuerdo a esto se propuso la siguiente matriz experimental:

Substratos	Nivel bajo	Nivel intermedio	Nivel alto
A	+ 1.	1	-1
B	+ 1.	1	-1

Tabla 4. Matriz experimental

De acuerdo a esta matriz experimental se obtuvo 9 medios de cultivo los cuales fueron designados con números, estos medios presentaron la siguientes relaciones carbono:nitrógeno Tabla 5.

MEDIOS DE CULTIVO	RELACIÓN C:N
11	4.5:1
12	4:1
13	5.6:1
21	3.5:1
22	3:1
23	1.8:1
31	6.2:1
32	2.5:1
33	2:1
HCO Medio Control	7.4:1

Tabla 5. Codificación de los tratamientos

3.3.2 Análisis de resultados

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de un diseño de Análisis de Varianza Unifactorial. La selección del mejor medio de cultivo se realizó con base en la interacción de 4 variables respuestas (Biomasa, conteo de esporas, relación espora:cristal y proteína total). Cada ensayo se realizó por triplicado. Para esto se planteó la Prueba de *SCHEFFE* de comparaciones múltiples (Montgomery, 1991).

3.4 PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO E INÓCULO DEL MEDIO DE CULTIVO

Para el preinóculo, se tomó una asada de Bt en agar nutritivo y se colocó en un volumen de 5 a 20 ml del medio de cultivo respectivo en un matraz de 50 mL. Los inóculos y preinóculos se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital en un cuarto temperado a 29°C durante el tiempo necesario hasta alcanzar el crecimiento deseado. A todos los inóculos y Preinóculos se les realizó una tinción con cristal violeta, con el fin de verificar microscópicamente la morfología del bacilo. En la Tabla 6 se describen los volúmenes de preinóculo e inóculo.

Fermentación	50 ml.		300 ml.		3 L.	
	Preinóculo	Inóculo	Preinóculo	Inóculo	Preinóculo	Inóculo
Volumen del medio, mL.	2	5	10	27	30	270
Volumen erlenmeyer, mL.	10	20	50	100	200	1000

Tabla 6. Condiciones de crecimiento del preinóculo e inóculo

3.5 CONDICIONES DE OPERACIÓN

3.5.1 Fermentaciones a nivel matraz

Los experimentos para los nueve medios ensayados (nueve de la matriz y el medio de referencia) se realizaron en matraz de 250 mL con 50 mL de volumen de trabajo. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un cuarto temperado a 29°C y a 200 rpm. Cada 48 h se tomó 1 mL de muestra de los erlenmeyers para realizar un control microscópico del crecimiento y morfología del bacilo y de los cristales formados, así como el porcentaje de esporulación, para lo cual se hizo una tinción simple de Cristal Violeta.

3.5.2 Fermentaciones a nivel laboratorio

Para realizar la fermentación de 3L se utilizó un fermentador modelo BIOFLO III, tiene un suministro de aire 15 psi, el cual pasa por un medidor de flujo de área

variable (rotámetro) y luego por dos filtros en serie con el fin de esterilizarlo y evitar la contaminación de la fermentación. El primero de estos filtros es tubo de acero inoxidable empacado en lana de vidrio y el segundo es un filtro marca Gelman tipo Airbacterial Vent de 320 mm y 0.4 μm Tabla 7.

El fermentador, BIOFLO III está compuesto por una chaqueta en la base del tanque la cual regula temperatura del caldo de fermentación de acuerdo con el valor ajustado en el set con un controlador proporcional integral.

El pH es controlado en un rango de 2.0 - 12.0 (± 0.01); es medido por un electrodo, el cual es calibrado con un patrón 4.0 y 7.0; para el control del pH se utilizo Ácido Clorhídrico y Hidróxido de Sodio 1 N.

Características	Fermentador de 5 L.
Marca	New Brunswick Scientific Co.
Modelo	BIOFLO III
Volumen total (mL)	4750
Volumen de trabajo (mL)	3000
Diámetro del tanque (cm)	17.5
Altura del tanque (cm)	31.1
Clase de impulsores	Rushton
Número de impulsores	2
Número de baffles	4
Rotámetro	SI
Aspersor de aire	SI
Condensador de gas de salida	SI
Controlador de temperatura	SI
Toma de muestra	SI
Electrodo de pH	SI
Electrodo de oxígeno disuelto	SI
Registrador de oxígeno disuelto	SI
Sensor de espuma	SI
Sistema de controlador de espuma	SI

Tabla 7 Características generales del fermentador utilizado³

³ Fuente: BIOFLO III (1993)

Se empleó como antiespumante silicona emulsionada, al inicio del proceso incluso antes de la esterilización. La cantidad de silicona utilizada debe ser apenas la requerida ya que tiene efectos de inhibitorios (Tabla 8) (Galán, 1996).

El final de la fermentación se estableció cuando se alcanzó 95-100% de esporulación comprobado mediante tinción con cristal violeta, siendo este porcentaje de esporulación el recomendado para la formulación del bioinsecticida comercial (Smith 1982).

Condiciones de Operación	5 L.
Volumen de medio (mL)	3.000
Relación volumen de medio/volumen de fermentador	0.6
Porcentaje de inóculo	10%
Agitación (rpm)	200
Temperatura (°C)	29
Aireación (vvm)	1
pH inicial del medio	7.2
Antiespumante Silicona emulsionada (mL)	2
Tiempo de fermentación (h)	216

Tabla 8. Condiciones de operación para la fermentación de 5 litros

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1 Determinación de la densidad óptica

De los erlenmeyers inoculados se tomo 1 mL de muestra cada 2 horas, diluido en solución salina 0.9%, se leyó espectofotométricamente a 600 nm, el blanco utilizado fue 1 ml del mismo medio sin inocular diluido en solución salina al 0.9%.

3.6.2 Determinación de azúcares reductores, método DNS

Se evaluó el consumo de la fuente de carbono A con base en la reducción del Acido Dinitrosalicílico (DNS) para formar un complejo nitroaminado de color amarillo, cuya concentración es proporcional a la concentración de los grupos reductores, se mide espectofotométricamente a 540 nm (Miller 1.959).

La cuantificación de los azúcares se hizo mediante una curva patrón en la zona donde la relación de absorbancia y concentración de azúcares es lineal.

En el Anexo 1 se presenta el procedimiento para la elaboración de las curvas de calibración, la preparación de los reactivos y el análisis de las muestras. Los valores obtenidos para la curva de calibración, se muestran en la corresponden a una correlación lineal, (Anexo 1).

3.6.3 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Esta técnica colorimétrica se utilizó para determinar proteínas en solución. Consiste en la interacción de la proteína con el reactivo fenólico y cobre en condiciones alcalinas dando como resultado una coloración azul.

El color formado por el Folin-Ciocalteu es debido a la interacción de la proteína con la solución alcalina de cobre, en el reactivo y a la reducción de las sales de fosfomolibdato y fosfotungstato, en el reactivo, por la tirosina y triptofano presentes en la proteína. Estos grupos son los responsables en gran parte de la concentración del color azul.

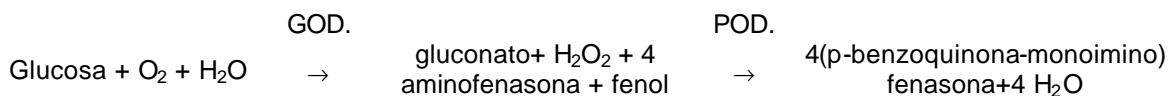
El color desarrollado por el método de Lowry no es estrictamente proporcional a la concentración de la proteína. Las mismas cantidades de varias proteínas dan lecturas diferentes ya que la intensidad de color depende en parte del contenido de tirosina y triptófano de las diferentes proteínas. Las proteínas relativamente ricas en tirosina y triptófano, dan absorbancias más altas que las respectivamente pobres en esos aminoácidos. El color desarrollado en el folin es dependiente también de la concentración fenilalanina de la proteína.

En este trabajo el método fue utilizado para determinación de la proteína total logrado en cada medio ensayado y para la determinación de proteína de las fuentes de nitrógeno. Para tal fin se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de proteína.

En el Anexo 2 se indica la forma como se realizó la curva de calibración, las concentraciones y el orden de adición de los reactivos.

3.6.4 Kit glucosa GOD-PAD

La glucosa fue determinada por el método enzimático GOD-PAD. La glucosa oxidasa actúa como catalizador en la oxidación de la glucosa. El peróxido formado reacciona con 4-aminoantipirina y 4 ácido hidroxibenzoico en presencia de peroxidasa. La intensidad de la coloración es proporcional a la concentración de glucosa; se lee espectrofotométricamente a 510 nm.



3.6.5 Recuperación de la espora cristal

El producto obtenido de la fermentación en matraz y en fermentador cuando alcanza un 95% de espora cristal, se centrifugó a 5000 rpm por 20 min.

Para todas las fermentaciones se guardó el precipitado y el sobrenadante para determinar azúcares reductores y proteína. El pelet total obtenido se lavó con agua destilada desionizada estéril a 4°C y se centrifugó.

3.6.6 Liofilización

El pelet obtenido de la centrifugación se resuspendió y se guardó en viales de 50 mL previamente esterilizados, secados, pesados y se almacenaron en nevera de -70°C, durante un día, luego se colocó en el liofilizador marca Labconco hasta retirar toda el agua contenida en el vial y dejando la mezcla espesa cristal totalmente seca.

3.6.7 Caracterización espesa – cristal

Se utilizó el recuento en placa para la cuantificación de la bacteria, se realizaron diluciones seriadas a partir del liofilizado, para lo cual se tomó 0.01 g en 1000 µl de solución salina estéril, a partir de esta se tomó 100 µl muestra y se agregó a 900 µl de solución salina estéril (primera dilución) este procedimiento se repitió sucesivamente hasta la dilución 10^{10} .

A partir de la dilución 10^3 hasta la dilución 10^{10} , se sembró 100 µl de la muestra en el medio de cultivo respectivo; se distribuyó homogéneamente utilizando un rastrillo de Drigaslsky: se incubaron a 29°C por 24 horas, al cabo de este tiempo se realizó el conteo de colonias en aquellas en que se presentaron entre 30-300 colonias.

El conteo de esporas se realizó mediante la cámara de Neubauer y según el procedimiento indicado en el diagrama de flujo del Anexo 4, allí se ilustra un esquema de la cámara y se explica la forma de cálculo del número de esporas.

Para el conteo de espora y cristal se realizaron tinciones del producto liofilizado con cristal violeta, Para tener una idea de la cantidad de cristales producidos en cada medio se realizó el conteo de esporas y según Jasón y Okafor (1984) se pueden asumir que por cada espora se produce un cristal (Anexo 3) (Avignone, 1992).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO DE *Bacillus thuringiensis*

4.1.1 Características macroscópicas

De las larvas enfermas de *Loxotoma elegans* recolectadas se obtuvo un aislado de *Bt*. El mantenimiento de esta bacteria se hizo sobre placas de agar LB hasta el final de la esporulación.

Durante los primeros días de crecimiento, las colonias son opacas redondas con borde irregular, de consistencia cremosa y de color crema claro. A lo largo del crecimiento y esporulación, las colonias se extienden sobre el medio, son brillantes, viscosas y su consistencia es cremosa, pero la coloración no cambia significativamente (Figura 2).



Figura 2. Colonia de *Bacillus thuringiensis* sembrada en medio LB, después de 5 días de incubación

4.1.2 Características microscópicas

A través de una tinción simple con cristal violeta, se observan claramente formas vegetativas que corresponden a bacilos delgados que se tiñen de violeta oscuro. Las esporas son ovaladas y refringentes a la luz y los cristales de forma bipiramidal grande y mediano, las cuales fijan el colorante y se tiñen de cristal violeta claro (Figura 3).

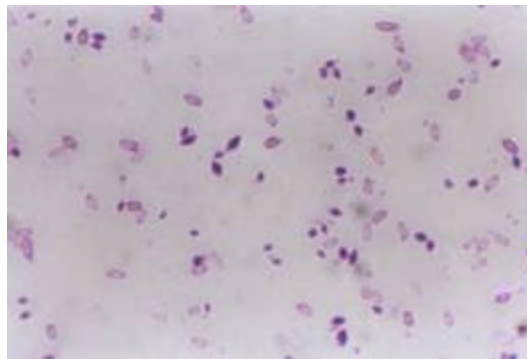


Figura 3. Cristal y espora de *Bt*. Observación microscópica 100X, cristal violeta

4.1.3 Análisis electroforético

El perfil electroforético realizado para la proteína de Bt, presentó 2 δ -endotoxinas las cuales tienen un peso molecular aproximado de 130 KDa y 60 KDa.

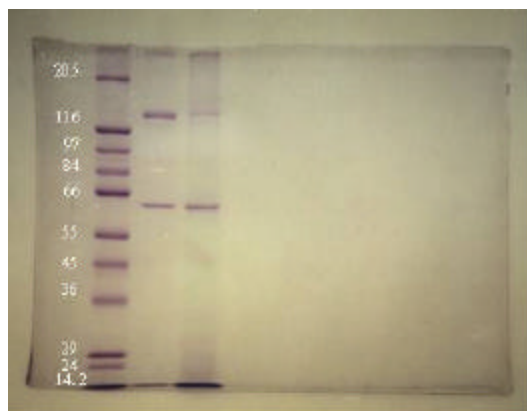


Figura 4. Análisis electroforético de la proteína

En la figura anterior se observa en el primer carril, el marcador de peso molecular y en el segundo y tercer carril la proteína producida por la cepa aislada de *Loxotoma elegans*.

4.2 ESTUDIO PRELIMINAR MEDIO HCO

Para conocer los parámetros cinéticos asociados con el crecimiento de *Bt.* velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, se utilizó el medio HCO (Cerón, 1991) a nivel de matraz de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL, a una temperatura de 29°C, agitación de 200 rpm con un agitador orbital; estas condiciones se mantuvieron para la evaluación de los medios.

En la cinética de crecimiento se tomaron muestras cada hora y al cabo de 13 horas se realizó una tinción simple con cristal violeta, observándose

microscópicamente célula vegetativa en cadenas (Cerón 1991), lo cual indicó el comienzo del proceso de esporulación. A las 27 horas de la fermentación se observó presencia de espora y cristal; al término de 96 horas la fermentación finalizó teniendo un 95-100% de espora y cristal.

La velocidad específica de crecimiento (μ) obtenida para esta fermentación fue de 0.550 h^{-1} , un tiempo de duplicación (td) de 1.26 h, 2.3×10^9 UFC, una cantidad de Biomasa de 1.5 g/L y un conteo de 1.2×10^9 esporas/mL.

4.3 DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO A NIVEL MATRAZ

Para el diseño de los medios de cultivo se tomó como referencia las concentraciones de fuente de Carbono, Nitrógeno y sales minerales reportadas para el medio HCO, las cuales permitieron obtener la mezcla cristal espora de *Bt*.

La selección de los sustratos empleados como fuente de nitrógeno orgánico, se consideró con base a la facilidad de preparación de los mismos y el tiempo de duración de las fermentaciones preliminares. El tiempo de fermentación se fijó hasta cuando la bacteria alcanza el porcentaje de esporulación del 90 al 95%.

Los tratamientos previos para la extracción de proteína a partir de B fueron más sencillos que los necesarios para la extracción de proteína de C y D. Los sustratos C y D aportaron poca proteína 5 mg/mL y 4.2 mg/mL respectivamente

haciendo necesario un aumento en la cantidad de materia prima para la preparación del medio de cultivo; el contenido inicial de proteína para el sustrato B fue 20.21mg/mL.

La producción de esporas y de proteína asociada al cristal son factores importantes para la elección del sustrato, por lo que se determinó que con la fuente de nitrógeno B se obtuvo 3.2×10^8 esporas/mL y 553 mg/g de proteína total y con los sustratos C y D se obtuvo 2.3×10^6 y 5.4×10^6 esporas/mL respectivamente. Además la producción de proteína fue baja donde se lograron resultados de 102 y 145 mg/g de liofilizado para C y para D.



Figura 5. Fermentación en matraz

Estos aspectos permitieron la selección del sustrato B, teniendo en cuenta consideraciones técnico-económicas en relación con el diseño del medio de cultivo.

4.3.1 Selección del medio de cultivo

Para la selección del medio de cultivo las variables respuesta fueron, esporas, proteína asociada al cristal, biomasa y relación spora-cristal obtenidos en los medios de cultivo (Anexo 6).

La evaluación de la cinética de crecimiento (Anexo 8) permitió calcular velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td). Estos valores mostraron (Tabla 9) que entre los tratamientos no hubo diferencias significativas, lo cual mostró que la bacteria *Bacillus thuringiensis* presenta velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación similares con lo reportado por Díaz (1997) donde obtuvieron tiempos de duplicación entre 1.60 h y 1.33 h.

Tabla 9. Velocidades específicas y tiempos de duplicación de los tratamientos evaluados

TRATAMIENTO (Medio)	Velocidad específica de crecimiento (μ) h ⁻¹	Tiempo de duplicación (td) h
11	0.445	1.56
12	0.438	1.58
13	0.408	1.51
21	0.430	1.61
22	0.446	1.63
23	0.370	1.88
31	0.460	1.50
32	0.416	1.66
33	0.414	1.68
HCO (Medio control)	0.4813	1.44

El tiempo de duplicación para el tratamiento 23 (relación 1.8:1) es de 1h 53min, mientras que para los demás tratamientos 31 y 11 con relaciones (6.2:1), es cerca de hora y cincuenta, esto permite concluir que a medida que se aumenta las

relaciones, crece más rápido el microorganismo, ventaja económica si se piensa en la producción de la proteína a nivel industrial (Buitrago, 1997).

4.3.2 Producción de esporas

La evaluación de la producción de esporas se hizo en cada uno de los tratamientos propuestos, se cultivo la cepa aislada de *Bacillus thuringiensis* en erlenmeyers de 250 mL con 50 ml de medio de cultivo, utilizando diferentes relaciones carbono (A): nitrógeno (B); los resultados obtenidos en los ensayos se expresan como esporas/mL.

Los altos conteos de esporas obtenidos con el tratamiento 31, se pueden explicar porque esta fuente de nitrógeno es rica en aminoácidos que podrían ser asimilados directamente por la bacteria. Además contienen algunos iones esenciales que la bacteria aprovecha para producir su espora como son: Mn^{+2} , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{2+} y Zn^{2+} (Carvajal 2000).

El sustrato A mostró ser el más adecuado para la producción de esporas, este sustrato es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido y otros azúcares que corresponde al 52%, además presenta sustancias orgánicas tales como Mn^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , K^+ , As^{3+} y Fe^{3+} , siendo la cuatro primeras favorables para la producción de espora.

Aunque en casi todos los tratamientos se produce una cantidad similar de esporas el medio 31 con una relación de 6.2:1, se destaca ya que se obtienen 5.5×10^8 esporas/mL comparado con el medio 33 con una relación de 2.5:1, donde se obtiene 3.2×10^7 esporas/mL.

El análisis de varianza realizado a esta variable respuesta indicó que no hay diferencias significativas entre tratamientos, aunque esta variable respuesta es de gran importancia para la selección del medio se seleccionó el medio 31 como el mejor medio para la producción de esporas (Figura 6) .

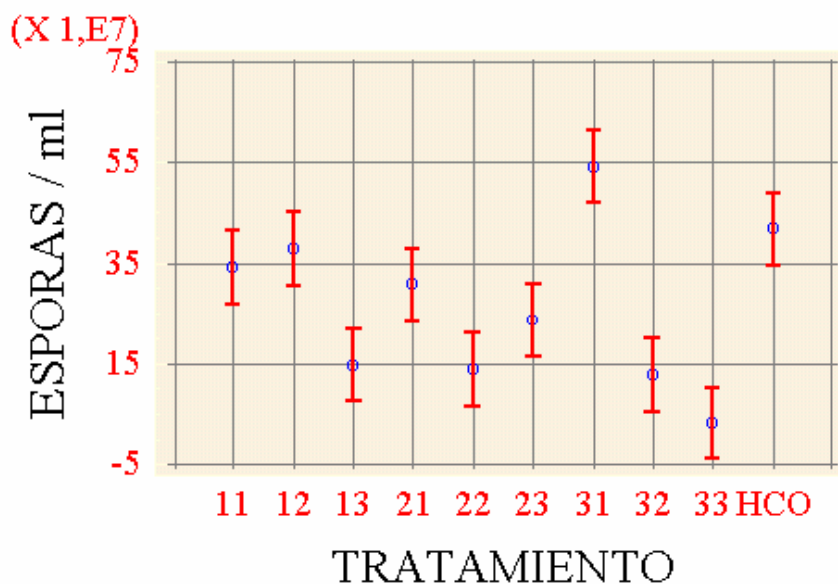


Figura 6. Esporas en los tratamientos evaluados

4.3.3 Biomasa (peso liofilizado)

La cantidad de biomasa se ve favorecida en el tratamiento 31 (621 mg/g) el cual presentó diferencias significativas respecto a los otros tratamientos, por este motivo se rechazó la hipótesis nula planteada ya que el valor de P (0.00) es menor de 0.05 (Anexo 6).

La prueba de comparación múltiple de Scheffe con un nivel de significancia del 95% determinó que el medio 11 y 21 presentaron diferencias significativas en cuanto a la variable respuesta biomasa si se compara con los medios 13, 31, 22 y el medio control (Figura 7).

Estos resultados corresponden a lo encontrado por Pearson (1988) y Anderson (1990) ellos obtuvieron mejores resultados con relaciones C:N mayores a uno las cuales favorecieron la producción de biomasa en los medios de cultivo.

Es necesario agregar fuentes de aminoácidos libres o aplicar tratamientos que hidrolicen parcialmente las proteínas y péptidos presentes para mejorar el rendimiento de la producción de δ -endotoxinas de *Bt.* (Dulmage (1987) y Sakharova (1984-1985).

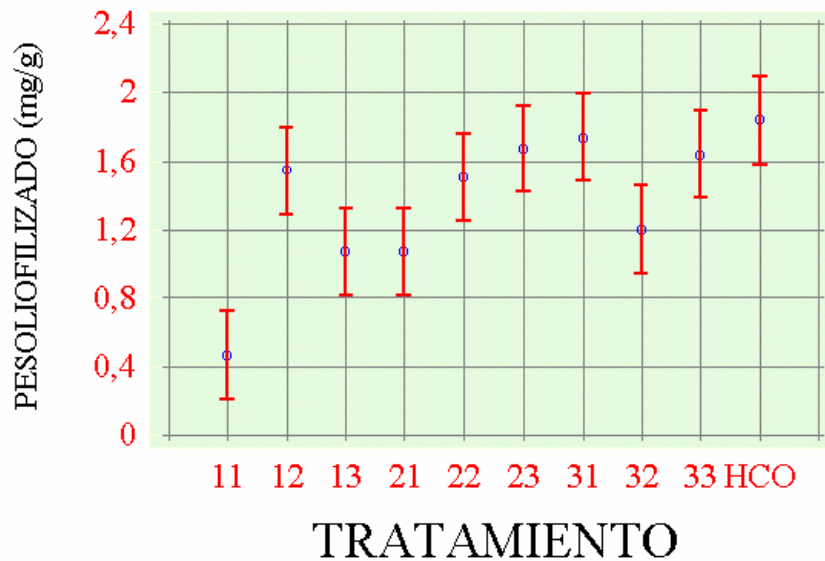


Figura 7. Biomasa obtenida en matraz

4.3.4 Determinación de proteína asociada al cristal

Al final de las fermentaciones se cuantificó proteína total al liofilizado por el método de Lowry. La proteína total se atribuye a la δ -endotoxina, cubierta de la espora y a los residuos de los medios de cultivo.

Las determinaciones de proteína total a partir de liofilizado se realizaron en los tratamientos esporulados al 100%. Los datos de proteína total se expresan en mg/g de liofilizado se encuentra en el Anexo 7.

Es evidente la influencia de la relación carbono-nitrógeno sobre la cantidad de proteína producida atribuida al cristal, siendo mayor para los tratamientos con una relación 6.2:1 que para los tratamientos con la relación 2.5:1.

De acuerdo con la relación 2.5:1, al probar la hipótesis para la variable proteína, se estableció que sobre esta variable respuesta, los tratamientos que más influenciaron los resultados obtenidos fueron el 31 y con el medio control (HCO) se obtuvo 683 mg/g liofilizado.

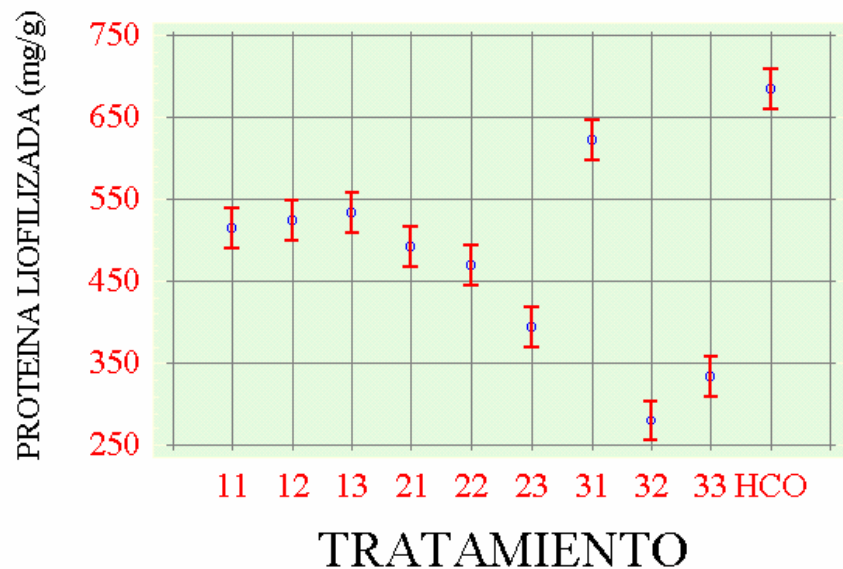


Figura 8. Proteína asociada al cristal en los tratamientos evaluados

4.3.5 Relación espora cristal

La relación espora-cristal establecida para *Bt.* es uno o menor a uno, una mayor cantidad de cristal se traduce en una mayor cantidad de proteína en la biomasa final (Smith 1982).

De acuerdo con los resultados obtenidos se encuentra que en los tratamientos 13, 11, 31, 12, 21 y el medio control HCO se obtuvo una relación espora-cristal 1.311, por tanto favorece la producción del cristal.

Con el diseño experimental planteado y el análisis se comprobó que las variables esporas, relación espora-cristal, biomasa y proteína asociada al cristal presentaron diferencias significativas de acuerdo a las variaciones realizadas en la fuente de carbono y nitrógeno en los tratamientos como se muestra en la **Figura 9**.



Figura 9. Relación espora – cristal en los tratamientos evaluados

4.4 DETERMINACIÓN DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO

Los rendimientos obtenidos en la producción de *Bt.* en los diferentes medios evaluados, expresados como cantidad de esporas, biomasa total, relación esporacristal y proteína asociada al cristal permitieron establecer según el análisis de SCHEFFE que el mejor medio de cultivo fue el 31, porque presentó el rendimiento más alto según dicho análisis estadístico.

Estos resultados quizá se atribuyeron al contenido de aminoácidos libres presentes en este sustrato (B), los cuales son aprovechados por la bacteria. Estos resultados coinciden con lo de varios autores quienes indican que esta fuente de proteína es apta para la obtención de rendimientos altos en proteína asociada al cristal (Rodríguez, 1991).

Hay una diferencia significativa entre los tiempos de fermentación de los tratamientos seleccionados estadísticamente 13 y 31 de 20 y 7 días respectivamente. Se ha reportado que una fermentación ideal es aquella en la que se obtienen los mejores rendimientos en un tiempo de fermentación no de mayor de 10 días (Duarte, 1990). Por esta razón el medio seleccionado para la fermentación 3L fue el medio 31 ya que presentó rendimientos de 5.4×10^8 esporas/ml, 621 mg/g proteína del liofilizado y 6.5×10^8 UFC/ml, 1.48 h^{-1} y un tiempo de fermentación menor de 10 días. Los rendimientos Biomasa producidos por gramo de A fue proporcional a la relación carbono-nitrógeno en los tratamientos evaluados; el mayor rendimiento fue el del tratamiento 31 de 0.572 g

biomasa/g glucosa y una relación carbono nitrógeno 6.2:1, la fuente de carbono (A) contiene compuestos que favorece las condiciones de crecimiento y producción de la δ -endotoxina.

Paralelamente a la realización de los ensayos se utilizó un medio control para observar el comportamiento de las diferentes variables a medir. Los resultados del medio control fueron comparados con el medio seleccionado. Se observó que con el medio control se obtienen 2.3×10^8 esporas/mL (Anexo 7), esto puede deberse a que el sustrato empleado como fuente nitrógeno orgánico le proporciona elementos a la bacteria que le ayudan en el proceso de esporulación tales como aminoácidos y iones que la fuente de nitrógeno utilizada en el medio control no los presenta.

Se realizaron fermentaciones preliminares utilizando como única fuente de nitrógeno (E) obteniendo bajos resultados en: 8.5×10^7 esporas/mL, 9.2×10^7 UFC/mL, 0.86 g/L Biomasa, 1.71 relación espора-cristal, 498 mg/g proteína asociada al cristal, $0.322 \text{ h}^{-1} \mu$ y un t_d 2.15 h ; A pesar de ser (E) muy utilizado por la bacteria en la fase de crecimiento exponencial (producción de Biomasa), no necesariamente lo es para la producción del cristal proteico. Hay reportes que concluyen que para que se produzca buena esporulación y formación de cristales es necesario proporcionar aminoácidos libres (Egorov, 1984).

Para la evaluación de la fuente de nitrógeno inorgánica E, se utilizó el medio seleccionado con una relación 1:1 de nitrógeno orgánico (B) y nitrógeno inorgánico (E). Los resultados fueron significativamente diferentes con los obtenidos con el medio 31. Se observa que la producción de esporas se incrementa mientras que la biomasa disminuye cuando se emplea la relación 1:1 de nitrógeno orgánico e inorgánico, como se ha reportado en trabajos realizados por (Avignone, 1990).

4.5 FERMENTACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO

En esta fase de experimentación se validó la producción de *Bt.* en volumen de 3L utilizando el medio de cultivo diseñado bajo las condiciones mencionadas en el numeral 3.5.2. A esta fermentación se le determinó el perfil de pH, cinética de crecimiento y consumo de sustrato.

4.5.1 Resultados de la fermentación

En la fermentación se calculó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (Anexo 5). Para determinar la pendiente μ y t_d se despejaron las fórmulas planteadas en el Anexo 6; en la fermentación se obtuvo un cristal bipiramidal grande, característica observada a nivel de matraz en el tratamiento.

Al paquete espora-cristal obtenido en el reactor se les determina la relación espora-cristal, biomasa, UFC y conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

Los resultados de UFC (Anexo 5) se ubicaron por debajo de los obtenidos en cantidad de esporas, debido posiblemente al error experimental en la cuantificación por la técnica Unidades formadoras de Colonia o en la cual varias células pueden formar una sola colonia. La biomasa producida en la fermentación de 3L fue mayor con respecto a la biomasa obtenida a nivel matraz ya que en la fermentación de 3L Figura 10, se controló temperatura, aireación, agitación y pH, siendo este último un factor importante para evitar la degradación y solubilización de la proteína en el medio cuando el pH llega a valores superiores de 9.0.



Figura 10. Fermentador BIOFLO III utilizado para la fermentación de 3 litros

La curva de crecimiento de la fermentación realizada tiene la forma típica de una fermentación microbiana, en la cual la fase de latencia desaparece debido al inóculo utilizado. La densidad (0.65 nm) de los inóculos es adecuada y por tal motivo la curva de crecimiento no presenta fase lag. Estos inóculos se sembraron

con bacilo en estado vegetativo como lo recomiendan Pearson y Ward (1988) para obtener eficiencia en la esporulación y liberación del cristal en la etapa de esporulación.

Durante las primeras 24 horas de fermentación, se observó un incremento en la población de microorganismos, al tiempo que ocurría un descenso en el pH hasta el valor de 5.8 (Anexo 5) y un consumo del 60% de los azúcares reductores. Para asegurar el crecimiento de la bacteria se ajustó el pH a 7.0, teniendo en cuenta las indicaciones de Smith (1982) quien expresó que valores de pH inferiores a 5.3 inhiben el crecimiento de *Bt.* (Farrera, 1992).

Al cabo de 24 horas hubo un consumo notable de los azúcares reductores (Anexo 5), durante este tiempo, el pH aumentó hasta llegar a 7.9 en la hora 88, en la que nuevamente se realizó un ajuste de pH hasta llevarlo a 7 y así evitar la disolución del cristal por alcalinidad en el medio. A partir de la hora 44 se inició la fase estacionaria, ya que la cantidad de sustrato residual era poca como para continuar la fase de crecimiento vegetativo. El consumo de sustrato expresado como azúcares reductores indicó que durante la hora 20 y la hora 44, se comenzó a consumir el Lactato, Piruvato y Acetato acumulados durante la glicólisis. Durante la fase estacionaria en donde comienza la esporulación, es la importante de fuente de nitrógeno orgánico B ya que contiene ácido aminobutírico, el cual suple en el microorganismo la carencia de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa, para poder llevar a cabo de manera completa el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

(CAT), que permite el consumo de los intermediarios acumulados durante el crecimiento vegetativo.

A partir de la hora 98 hasta la hora 118 se presentó la liberación de cristal, coincidiendo este hecho con el consumo casi total de azúcares reductores. Los cristales se forman como metabolitos secundarios, es decir, compuestos cuya síntesis por la bacteria no está asociada al crecimiento del microorganismo, sino que ocurre cuando la población ha dejado de multiplicarse (Farrera, 1992).

Los buenos resultados obtenidos con el tratamiento propuesto podrían deberse a que durante la fase de esporulación de *Bt.*, hay una gran producción de ácidos grasos, que en la maduración de la espora son oxidados; Estos ácidos grasos son sintetizados a partir de moléculas ramificadas de acetil-CoA que proviene a su vez de valina, isoleucina, leucina, aminoácidos que en el medio provee.

5 CONCLUSIONES

Se aisló una cepa de *Bacillus thuringiensis* a partir del lepidóptero *Loxotoma elgans* Zeller.

Se diseñó un medio de cultivo que está constituido por una fuentes de carbono A y una fuente nitrógeno orgánico B con una relación de 6.2:1 en la cual se obtuvo una biomasa de 1.7g/L y una proteína total de 621 mg/g.

Se establecieron las bases de un medio de cultivo y las condiciones de operación en un fermentador de 5 L, las cuales fueron: 200 rpm de velocidad de agitación, 1 VVM de aireación y pH inicial de 7.2; se obtuvo una biomasa 5.8 g/L y Unidades Formadoras de Colonia de 4.2×10^9 /mL, esporas de 1.2×10^9 /mL, proteína total de 658 mg/g, relación spora cristal 1.258.

6 RECOMENDACIONES

Se debe verificar la actividad insecticida del producto final obtenido por medio de bioensayos con larvas de *Loxotoma elegans*, en condiciones de laboratorio o campo.

BIBLIOGRAFÍA

ABARCA, C.; MARTÍNEZ, A. and QUINTERO, R. Optimización del proceso de producción de *Bt. var aizawai*. En: *Insect Biochem Mol. Biol.* Vol 22: 1. 1992. p. 1-7.

ACOSTA, M.; NAVARRO, C. Estudio del efecto de la fuente de carbono en la producción de la δ -endotoxina de *Bt.* Proyecto de Grado. Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. 1993.

AIBA, S.; OKAMOTO, R. and SATOH, K. Two sorts of measurements with a jar type of fermenter – power requirements of agitations and capacity coefficient of mass transfer in bubble aeration. En: *J. Ferm. Tech.* Vol 43. 1965. p.137-145.

ANDREWS, S. The Biotechnology of *Bt.* En: *CRC Critical Reviews in Biotechnology.* Vol. 6. 1987. p. 163-232.

ARCAS, J. A new medium for growth and δ -endotoxin production by *Bt. var Kurstaki*. En: *Biotechnology and Biochnol*, 46. 1984. p. 78-84.

AVIGNONE, C.; and MIGNONE, C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuos cultures of *Bt.* En: *Appl. Microbiol Biotechnology.* Vol. 46. 1996. p. 78-84.

AVIGNONE, C.; ARCAS, J.; and MIGNONE, C. *Bt.* Growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. En: World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 8. 1992. p. 301-304.

AVIGNONE, C.; y ARCAS, J. Organic and inorganic source ratio effects on *Bt.* var *israelensis* δ -endotoxin production. En: World Journal Microbiology and Biotechnology. N° 6. 1990. p. 27-31.

BADII, M. H.; FLORES, A. E. En: Diversidad ecológica. Calidad Ambiental. Vol. 1. 1994. p. 18-25.

BAMBARA, S.; and BAKER, J. Biological Pest Control: An introduction, What Is Biological Pest Control? En: Biological Control Virtual Information Center. Department of Entomology, North Carolina State University. 1997. p. 1-6.

BERDUGO; C.; ZAMORA, A. Estudio preliminar para la optimización de un medio de cultivo para la producción de *Bt.* Proyecto de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. 1995.

BRAVO, A.; QUINTERO, R. Importancia y Potencial del *Bt.* en el control de plagas. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal. 1993. p. 1-55.

BULLA, L. Ultraestructure, physiology and biochemistry of *Bt*. En: Microbiol. Vol. 8. 1980. p. 147-207.

CARVAJAL, F. Estudio preliminar para la optimización de medio de cultivo para la producción de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. 2000

CERON, J. Establecimiento de estrategias para la caracterización y manipulación genética de cepas de *Bt*. Tesis (Maestría en Biotecnología) Universidad Nacional Autónoma de México. 1991. p. 3-7.

COUCH, T. L. and ROSS, R. Production and utilization of *Bt*. En: Biochem and Bioeng. Vol. 22. 1980. p. 1297.

CRICRMORE, J. V. R. *Bt*. and Its Pesticidal Crystal Proteins. En: Microbiology and Molecular Biology. 1998. p. 775-806.

DE BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of the *Bt*. strains. En: Entomophaga. Vol. 35:2. 1990. p. 133-240.

DE URQUIJO, N. E. Producción de *Bt*. para el control de ciertas lagas de importancia agrícola y médica en México. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINESTAV-IPN. 1987.

DULMAGE, H. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bt*. En: Journal of Invertebrate pathology. Vol. 15. 1970. p. 15-20.

DULMAGE, H. Production of the spore δ -endotoxin complex by variants of *Bt*. in two fermentation medio. En: Journal of invertebrate pathology. Vol. 16. 1971. p. 385-389.

DULMAGE, H. T. Production of bacteria for biological control of crop production, G.C. Papavizas (ed). En: Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanhed, Osmun and., Totowa, N.J. 5:129. 1981.

EGOROV, N. S. Influence of aminoacids on the synthesis of exoprotease by *Bt*. En: Applied Biochemical Microbiology. Vol. 19. 1984. p. 481.

ENGLISH, L.; SLATIN, S. Mode action of δ -endotoxin from *Bt*. a comparison with other bacterial toxins. En: Insect Biochem Molecularly Biol. Vol. 22. 1992. p. 1-7.

ERTOLA, R. Production of *Bt*. insecticides. Centro de investigación y desarrollo de Fermentaciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 1985. p. 187-198.

FALOCCI, M.; VANTANO, O.; MARINO, H.; ARCAS, J.; ERTOLA, R. Effect of the media composition on the grown parameters and the biological proprieties of *Bt. var israelensis* δ -endotoxin. En: World of Microbiol. 1990.

FARRERA, R. R. Síntesis de un proceso para la producción de *Bt.* Trabajo Predoctoral. CINVESTAV-IPN. 1992.

FAUST, R. M. Bacterial and their toxins as insecticide in Microbial and Viral Pesticides. Ed Edward Kurstak, Marcel DeKker, Inc. New York. Vol 3. 1982. p. 75-77.

FODA, M. Factors affecting grown physiology of *Bt.* En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 22, 50. 1985.

GALAN, L. Biotecnología de Plaguicidas. Compendio de artículos del tema. 1996.

GARCIA, H. Biología del defoliador de la planta de aceite, *Loxotoma elegans* seller (Lepidoptera: Stenomidae), Villanueva (Casanare), En: Palmas 15 (4). 1994. p. 9-15.

GILL, S. The mode action of *Bt.* δ -endotoxin. En: Annu. Rev Entomol. Vol. 37. 1998. p. 615-626.

GOLDBERG, I.; SNEH, B.; BOTTAT, B.; KLEIN, D. Optimization of medium for a high yield production of spore crystal preparation of *Bt.* effective against the Egyptian Cotton leaf worm *Spodoptera Littorais* Boisd. En: *Biotechnol Lett.* Vol. 2. p. 419-426.

IBARRA, J.; LEON, T. Cuantificación toxicológica de *Bt.* bajo condiciones de laboratorio. Memorias del curso sobre *Bt.* Octubre 1993.

JENNY, K. Stabilization and increased production of insecticidal crystal proteins of *Bt.* subsp. *galleriae*, in steady – and transient-state continuous cultures. En: *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 47. 1997. p. 12-17.

IGNATENKO, Y. N. Effect of temperature and aeration on growth and spore formation in *Bt.* En: *Microbiology.* Vol. 52:5. 1983. p. 716-718.

KNOWLES, B.; and DOW, J. The crystal δ -endotoxin of *Bt.*: models for their model of action in insect gut. En: *Bio Essays.* Vol. 15:7. 1993. p. 469 – 476.

KRIEG, A.; and MILTENBURGER, H. Biopesticides: *Bt.* En: *Advances in Biotechnological Processes.* Vol 3. 1984. p. 273-290.

LOWRY, O. Protein measurement with the folin-phenol reagent. En: *Journal of Biochemical advances.* 1951. p. 260-275.

LOZANO, A; GOMEZ, A. Mejoramiento de las condiciones para la producción masiva de complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis*. Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad América. 1998

LUTHY, P. *Bt.* as a bacterial insecticida: basic considerations and application. En: Microbial and Viral Pesticides. Kurstak, E. eds. New York. 1982.

MANASHEROB, E. Comercial production od *Bt.* EHC 7-20. 1998.

Manual de Bergey. Volumen II. Sección 13. 1986.

Manual de Operación del Fermentador BIOFLO III. BronsworK Scientific. New Yersey. 1993.

MILLER, Gail. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determiantion of Reducing Sugar. Vol 31:3. 1959

MONTGOMERY, D. Diseño y análisis experimentales. Grupo Editorial Iberoamericana. 1991.

NICKERSON, K.; BULLA, L. Physiology of sporeforming bacteria Associated with Insect: Minimal Nutritional Requirements for Growth, Sporulation and Paraesporal crystal formation of *Bt.* En: Applied Microbiology. Vol. 2:1. 1974. p. 124-128.

PEARSON, D.; WARD, P. Effect of culture continuos on growth and Sporulation of *Bt. subsp. israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxina. En: *Biotechnology Letters*. Vol. 1:7. 1988. p. 441-456.

QUINTERO, R. La Biotecnología en América Latina: Una visión diferente. En: *Reflexiones sobre el desarrollo de la Biotecnología en Europa y América Latina*. 1996.

RAZO, F. E. Estudios para el escalamiento de un proceso por lote a nivel de laboratorio a planta piloto para la producción de *Bt*. Tesis Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 1991.

RODRÍGUEZ, J.; DE LA TORRE, M.; URQUIJO, E. *Bt*. Características biológicas y perspectivas de producción. En: *Latamen Microbiol*. Vol. 33. 1991. p. 87-127.

RODRÍGUEZ, J.; DE LA TORRE, M. Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bt*. and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 45. 1996. p. 546-550.

ROWE, G.; Margaritis, A. Bioprocess Developments in the production of bioinsecticidas by *Bt*. En: *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. Vol 6. 1987. p. 87-127.

SAKHAROVA, Z. V.; IGNATO, Y. Kinetics of growth and development of *Bt.* during batch culturing. En: Microbiol. 54. 1985. pag 483.

SCHERRER, P.; LUTHY, P.; and TRUMPL, B. Production of δ -endotoxin by *Bt.* as a function of glucose concentrations. En: Applied Microbiology. Vol. 25:4. 1973. p. 644-646.

SIKDAR; D. P.; MANJUDAR, M. K. Effect of minerals on the production of the δ -endotoxin by *Bt.* subsp. *israelensis*. En: Biotechnology Letters. Vol. 13:7. 1991. p. 511-514.

SMITH, R. A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bt. var israelensis*. En: Can. J. Microbiol. Vol. 28. 1982. p. 1089-1092.

STANIER, R. Microbiología. Editorial Reverté S.A. 2ª. Edición, España. 1988. p. 1089-1092.

TZENG, Y. Characterization Study of the Sporulation Kinetics of *Bt.* Institute of Biotechnology National Dong Hwa. University. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 68. 1998. p. 11-17.

VARDAR-SUKAN, F. Dynamics of Oxygen Mass Transfer in Bioreactors. En: Process Biochemistry. 1986. p. 40-44.

WANG, D. I. C.; COONEY, CH. Fermentation and enzymes technology. John Wiley and Sons. New York. 1979. p. 374.

YUDINA, T. G. Effect of carbon of source on the Biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bt*. En: Microbiology. Vol 61. 1992. p. 577-584.

WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; NISHIMOTO, Y. Formation of crystalline δ -endotoxin or poly-B-hibroxibuturic granules by asporogeneous mutant of *Bt*. En: Applied Environmental Microbiol. Vol 43:6. 1982. p. 1473-1480.

ZAMOLA, B. *Bt*. An insecticidal microorganism with perspective. En: Process of Biochemistry. Vol 1. 1983. p. 5-9.

ANEXOS

ANEXO 1. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DNS

Soluciones

- Solución DNS: disolver 1.6 g de NaOH en agua destilada estéril, añadir 30 g de Tartrato de Sodio y Potasio hasta solución perfecta. Sobre la solución anterior adicionar lentamente con agitación constante 1 g de DNS. Aforar a 100 mL en balón aforado con agua destilada estéril. Este reactivo puede ser utilizado por un periodo de dos meses, después de los cuales debe ser desechado, conservándose en frasco ámbar a 4°C.
- Solución de Glucosa (SSG): disolver 400 mg de glucosa en balón aforado de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada estéril.

Curva de calibración

- Partiendo del stock de glucosa preparar diluciones de concentraciones diferentes en tubo de ensayo seriados:

Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Concentración (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
SSG (µL)	0	50	100	150	200	250	300	350
Agua (µL)	1000	950	900	850	800	750	700	650

Tabla 10. Preparación de la curva patrón – Método DNS⁴

- Agregar 1 mL de la solución DNS y agitar.
- Calentar en baño de María ebullición durante 5 min.
- Enfriar con hielo.
- Adicionar 10 mL de agua destilada, agitar y dejar reposar en el hielo durante 15 minutos.
- Leer densidad óptica a 540nm y graficar densidad óptica vs. concentración de glucosa en mg/mL. En la **Tabla 10** se presentan los datos de la curva de calibración.

Concentración de Glucosa (mg/mL)	D.O. (Abs. 540 nm)
0.1	0.040
0.2	0.114
0.4	0.235
0.6	0.335
0.8	0.430
1.0	0.491

Tabla 11. Determinación de azúcares reductores en la curva patrón

⁴ Fuente: Miller (1959)

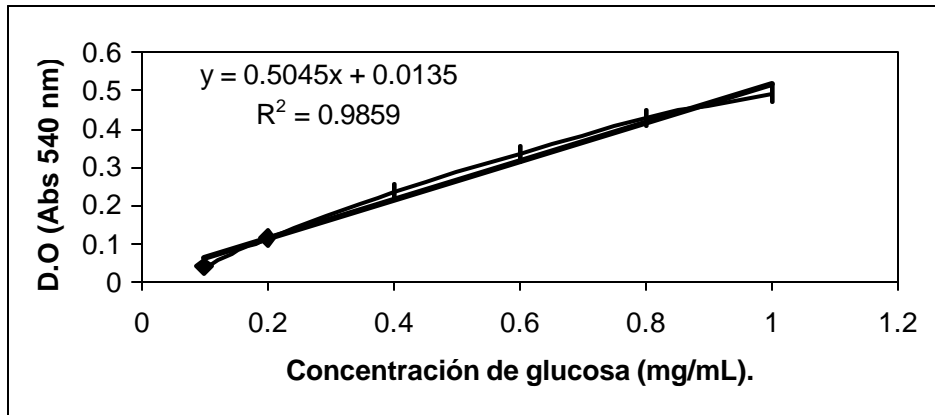


Figura 11. Curva de calibración para determinar glucosa – Método DNS

Para el análisis de muestras con glucosa se siguió el mismo procedimiento que para la curva de calibración indicado en la **Figura 12** desde la adición del reactivo DNS a la muestra diluida 5 veces (200 μ L de sobrenadante + 800 μ L de agua destilada) hasta la medición de la densidad óptica. Una vez obtenida la absorbancia se halló la concentración de azúcar mediante la curva de calibración (**Figura 11**).

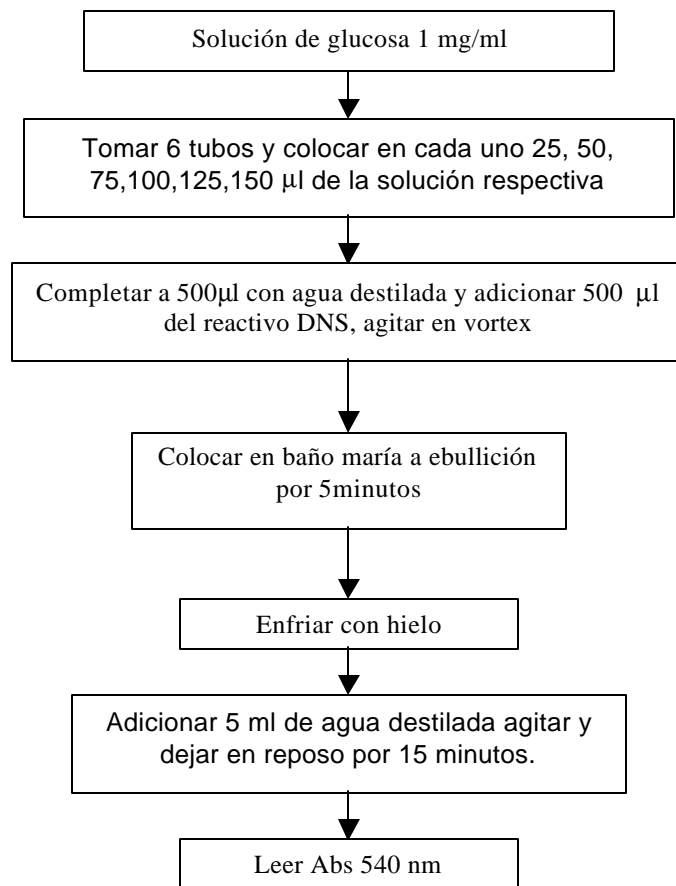


Figura 12. Procedimiento para la curva de calibración de glucosa (DNS)⁵

⁵ Fuente: Miller (1959)

ANEXO 2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA – MÉTODO LOWRY

Soluciones

- Solución A: Carbonato de Sodio 2% en NaOH 0.1 N
- Solución B: Sulfato de Cobre 0.5%
- Solución C: Tartrato de Sodio y Potasio 1%.
- Solución D: Solución B y C en proporción 1:1 v/v.
- Solución E: 1 mL de Solución D + 49 mL de la Solución A. El volumen mínimo de solución E que debe prepararse es 50 mL, para no introducir errores adicionales a lectura de la proteína.
- Solución F: Reactivo de Folin diluido en proporción 1:1 v/v con agua destilada desionizada estéril (DDE). Esta solución se prepara 2 minutos antes de ser utilizada ya que debe ser lo más fresca posible.
- Solución Patrón de albúmina (SPA): pesar 100 mg de albúmina bovina en 100 mL de agua DDE (1mg/mL).
- Todas las soluciones se preparan con agua DDE (1mg/mL).

Curva de calibración

Esta curva de calibración se hará por duplicado.

- Preparar las siguientes soluciones en tubos de ensayos seriados:
- Mezclar el contenido de cada tubo y dejara reposar durante 10 min.
- Adicionar 500 μ L de solución F en cada tubo, agitar y dejar reposar por 30 min.
- Determinar densidad óptica con 590 nm. Esta determinación debe realizarse a penas cumplidos los 30 min. Para que la curva quede bien calibrada.

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	Calibrador
Agua (mL)	1000	800	800	800	800	800	800	800	800
SPA (mL)	0	50	75	100	125	150	175	200	130
Agua (mL)	0	150	125	100	75	50	25	0	70
Sol E (mL)	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	500

Tabla 12. Preparación curva patrón – Método Lowry⁶

Cada vez que se renueve alguna de las soluciones (A, B o C) utilizadas debe realizarse de nuevo la respectiva curva de calibración. Los datos obtenidos para la curva de calibración (Figura 13) se encuentran en la siguiente tabla.

Concentración de albúmina mg/mL.	D.O. (Abs. 590 nm).
0.025	0.095
0.050	0.106
0.125	0.185
0.250	0.289
0.375	0.381
0.500	0.567

Tabla 13. Determinación de proteína en la curva de calibración

⁶ Fuente: Lowry (1951)

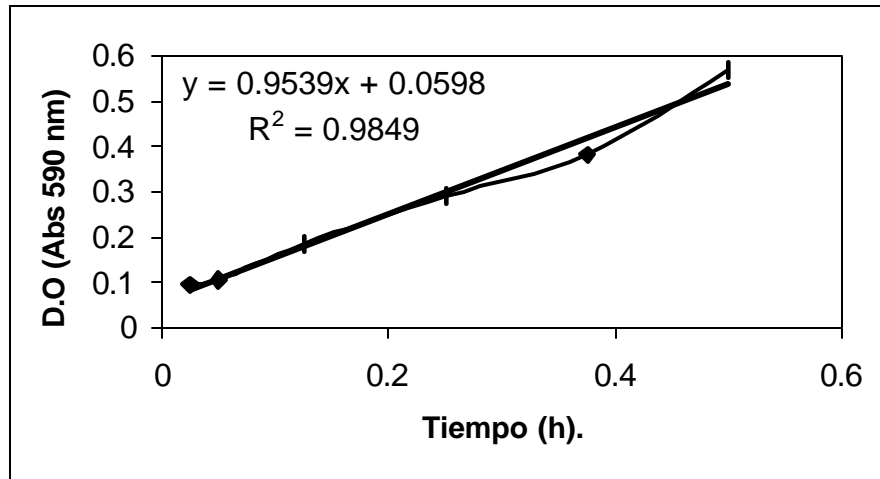


Figura 13. Curva de calibración para determinar proteína – Método Lowry

En la Figura 14 se muestra el procedimiento que se siguió para el análisis de las muestras desde la adición de la solución E y F hasta la medición de la D.O. a 590 nm.

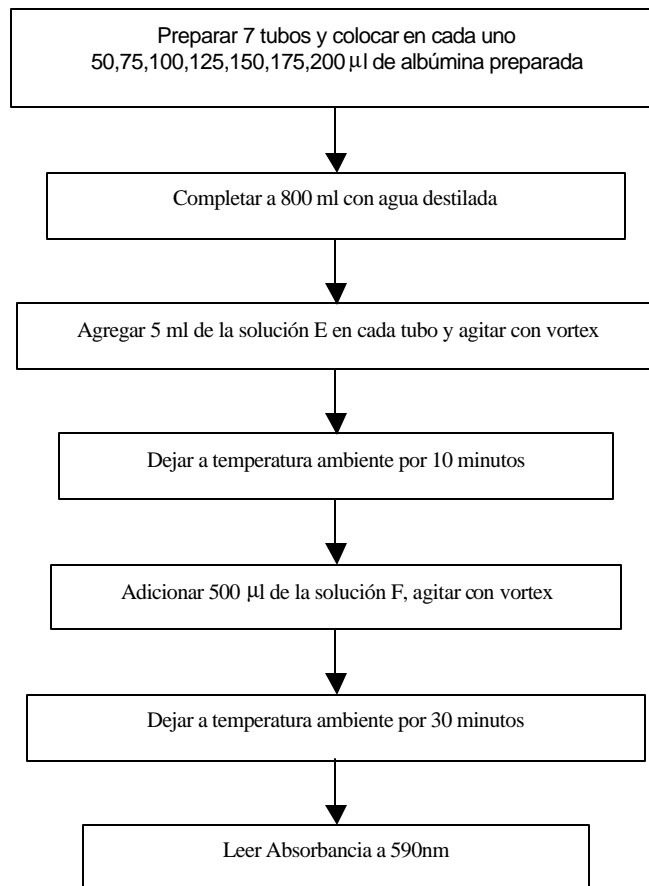


Figura 14. Procedimiento para la curva de calibración de proteína (Lowry)⁷

⁷ Fuente: Lowry (1951)

ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE ESPORA – CRISTAL

Reactivos

- Cristal violeta
- Aceite de inmersión

Muestra problema

- Pesar 0.01 g del Liofilizado + 1 mL de agua Destilada Desionizada Estéril
- Agitar en vortex
- Esparcir una gota de muestra sobre el portaobjeto limpio y desengrasado
- Fijar al calor y dejar enfriar
- Adicionar Cristal Violeta y dejar reposar por 2 minutos
- Enjuagar la placa con agua y dejar secar al medio ambiente
- En el microscopio, escoger 10 campos de aproximadamente 100 células (Entre esporas y cristales) y realizar el conteo de cristales, esporas y bacilos
- Realizar un promedio del número de esporas y de cristales de los 10 campos contados
- Determinar la relación espora cristal

ANEXO 4. CONTEO DE ESPORAS CON CÁMARA DE NEUBAUER

En la Figura 15 se observa el esquema de la cámara de Neubauer. El círculo indica el área a tener en cuenta para el conteo. Para este caso se contaron los cuadrados indicados con los numerales 1, 2, 3, 4 y 5.

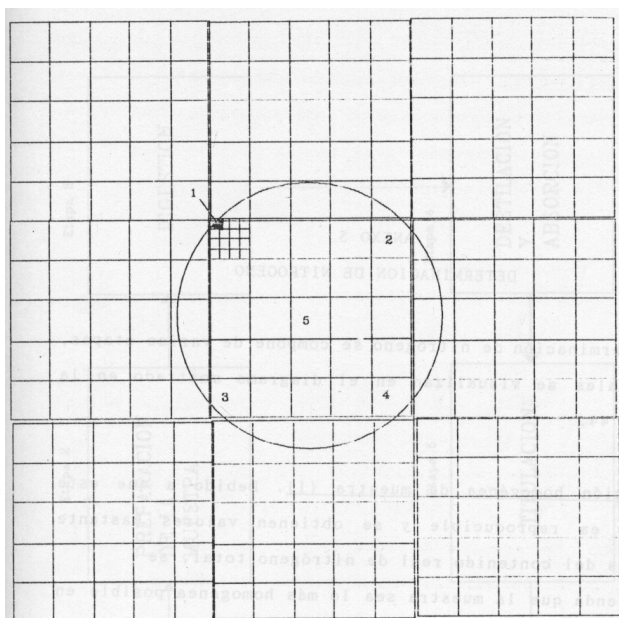


Figura 15. Cámara de Neubauer

En forma alternativa se hizo un duplicado de cada muestra y por lo tanto el número de esporas/mL encontradas en cada medio se calculó así:

$$a = 4 \text{ cuadrantes } (1+2+3+4+5)$$

Segunda replica:

b = 4 cuadrantes (1+2+3+4+5)

Entonces :

$(a + b) / 2 = C$

Nº esporas /mL = $5 C \times 10^4 \times \text{dilución}$

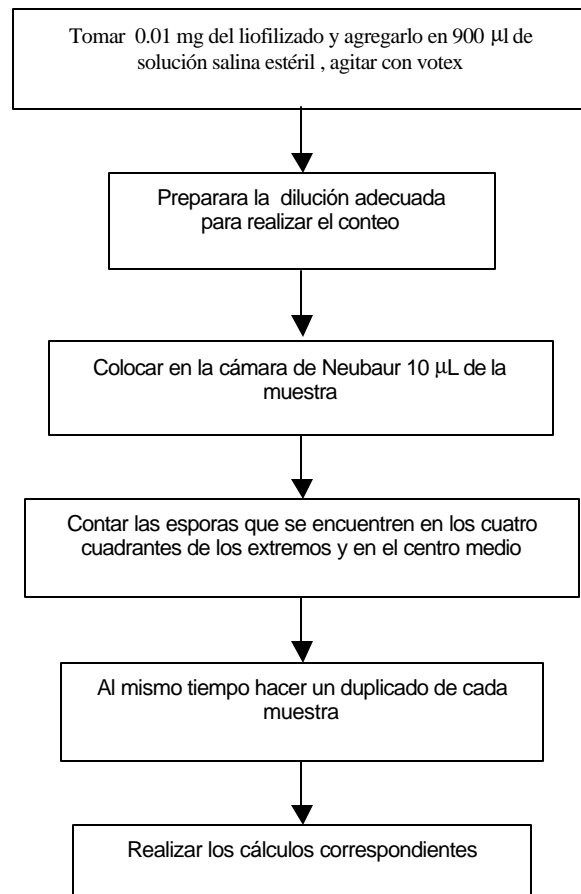


Figura 16. Procedimiento para el conteo de esporas en cámara de Neubauer⁸

⁸ Fuente: Berdugo (1995)

ANEXO 5. RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN DE BANCO

Tiempo	pH	DNS	Abs.
0	7.21	15.11	0.12
2	7.18	15.05	0.32
4	7.21	14.87	0.68
6	7.15	14.21	0.98
8	7.10	13.92	1.34
10	7.12	13.46	1.67
12	6.97	13.02	1.97
14	6.89	12.78	2.43
16	6.71	11.32	3.34
18	6.62	9.18	4.01
20	6.40	7.97	5.22
22	6.10	6.54	5.98
24	5.80	5.97	6.45
28	6.50	3.45	8.12
32	6.80	2.74	8.22
36	7.10	2.63	8.32
40	7.20	2.07	8.15
44	7.50	2.06	8.48
48	7.40	2.06	8.25
54	7.43	2.03	8.12
60	7.35	2.02	8.45
66	7.56	1.92	8.02
72	7.65	1.91	8.64
78	7.80	1.88	8.12
88	7.90	1.83	8.45
98	7.10	1.75	8.15
108	7.30	1.70	8.48
118	7.20	1.64	8.79

Tabla 14. Resultados de la fermentación de banco de 3 litros en función del tiempo

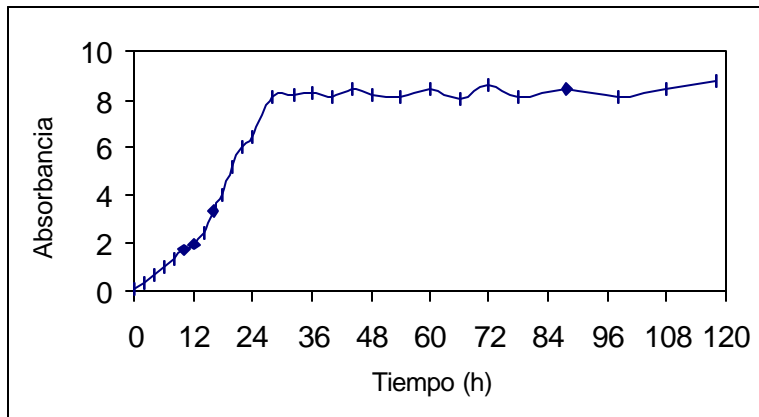


Figura 17. Cinética de crecimiento de la fermentación de 3 litros

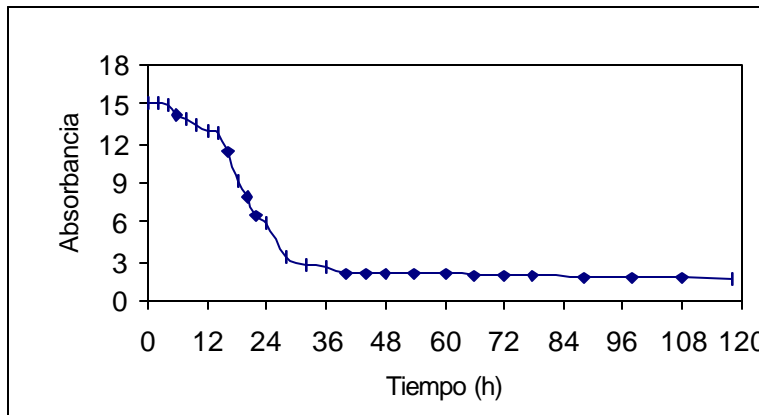


Figura 18. Consumo de sustrato en la fermentación de 3 litros

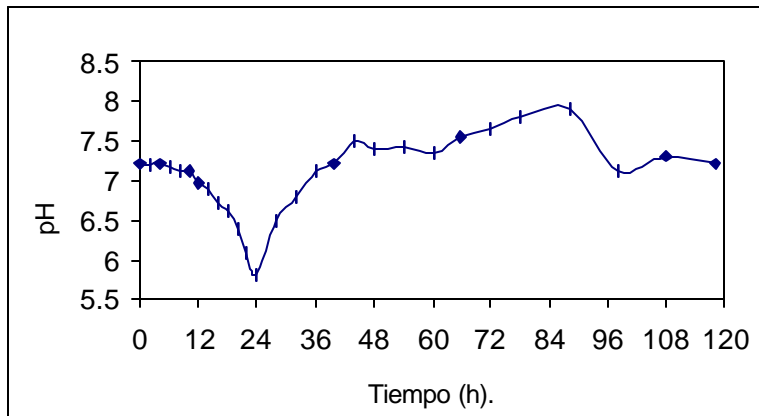


Figura 19. Variación de pH durante el tiempo de fermentación de 3 litros

Característica	Resultado
Biomasa (g/L)	5.8
UFC/mL	4.2×10^9
Esporas/mL	1.2×10^9
Proteína asociada al cristal (mg/g)	658
Relación espora cristal	1.258
Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})	0.492
Tiempo de duplicación (h)	1.4
Tiempo de la fermentación	5 días

Tabla 15. Resultados generales de la fermentación de 3 litros

ANEXO 6. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS FERMENTACIONES

La velocidad de producción de Biomasa se correlaciona con la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) y la concentración de biomasa X (g/L) conforme a la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu X \quad (1)$$

En la fase exponencial de crecimiento μ es constante y la integración de la ecuación (1) resulta:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \quad (2)$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \quad (3)$$

El tiempo de duplicación t_d de la Biomasa se obtiene de la ecuación (3) cuando:

$X = 2X_0$ y $t = t_d$, lo cual resulta en:

$$T_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (4)$$

ANEXO 7. RESULTADOS DE FERMENTACIÓN EN LOS TRATAMIENTOS DE 50 ML

Tratamientos	Tiempo de fermentación (días)	Proteína (mg/g)	Peso liofilizado (Biomasa) (g)	UFC/ mL	Esporas/mL	Relación espora cristal	Velocidad específica de crecimiento (μ) (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (td) (horas)
11	6	520	0.6	3.5X10 ⁸	3.6X10 ⁸	1.285	0.444 h ⁻¹	1.575
		515	0.4	3.8X10 ⁸	3.2X10 ⁸	1.387	0.47 h ⁻¹	1.47
		508	0.4	3.3X10 ⁸	3.4X10 ⁸	1.242	0.425 h ⁻¹	1.63
12	6	532	1.62	3.6X10 ⁸	3.9X10 ⁸	1.364	0.459 h ⁻¹	1.51
		525	1.6	3.8X10 ⁸	3.8X10 ⁸	1.276	0.435 h ⁻¹	1.60
		513	1.4	3.7X10 ⁸	3.6X10 ⁸	1.367	0.422 h ⁻¹	1.64
13	19	546	1.2	2.4X10 ⁹	1.8X10 ⁸	1.284	0.49 h ⁻¹	1.41
		528	1.0	2.7X10 ⁹	1.4X10 ⁸	1.338	0.444 h ⁻¹	1.56
		522	1.0	2.5X10 ⁹	1.2X10 ⁸	1.275	0.452 h ⁻¹	1.531
21	7	504	1.2	4.8X10 ⁸	3.1X10 ⁸	1.391	0.425 h ⁻¹	1.63
		480	1.0	3.9X10 ⁸	3.0X10 ⁸	1.28	0.449 h ⁻¹	1.55
		492	1.0	3.7X10 ⁸	3.1X10 ⁸	1.346	0.416 h ⁻¹	1.67
22	9	475	1.6	5.2X10 ⁸	1.4X10 ⁸	1.03	0.42 h ⁻¹	1.65
		452	1.4	5.4X10 ⁸	1.0X10 ⁸	1.185	0.48 h ⁻¹	1.67
		486	1.5	5.7X10 ⁸	1.7X10 ⁸	1.237	0.44 h ⁻¹	1.59
23	20	410	1.4	5.1X10 ⁸	2.1X10 ⁸	1.702	0.35 h ⁻¹	1.97
		383	1.8	5.3X10 ⁸	2.4X10 ⁸	1.492	0.38 h ⁻¹	1.81
		387	1.8	5.2X10 ⁸	2.6X10 ⁸	1.504	0.37h ⁻¹	1.86
31	7	634	1.8	6.9X10 ⁸	5.4X10 ⁸	1.29	0.49 h ⁻¹	1.41
		604	1.6	6.3X10 ⁸	5.2X10 ⁸	1.33	0.425 h ⁻¹	1.63
		625	1.8	6.5X10 ⁸	5.6X10 ⁸	1.35	0.4625 h ⁻¹	1.50
32	22	276	1.0	3.6X10 ⁸	1.0X10 ⁸	1.642	0.41 h ⁻¹	1.69
		300	1.4	3.5X10 ⁸	1.3X10 ⁸	1.67	0.417 h ⁻¹	1.66
		262	1.2	3.8X10 ⁸	1.5X10 ⁸	1.66	0.423 h ⁻¹	1.64
33	9	332	1.6	6.7X10 ⁷	3.2X10 ⁷	1.563	0.405 h ⁻¹	1.71
		342	1.6	6.0X10 ⁷	3.0X10 ⁷	1.447	0.428 h ⁻¹	1.62
		326	1.7	6.2X10 ⁷	3.1X10 ⁷	1.705	0.408 h ⁻¹	1.70
HCO	6	680	0.7	7.2X10 ⁸	3.2X10 ⁸	1.242	0.491 h ⁻¹	1.42
		693	0.8	6.5X10 ⁸	4.1X10 ⁸	1.348	0.499 h ⁻¹	1.39
		678	0.8	8.1X10 ⁸	5.2X10 ⁸	1.217	0.454 h ⁻¹	1.52

ANEXO 8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MATRACES DE 50 ML

CINETICA DE CRECIMIENTO MEDIO 11				
Tiempo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
1	0.060	0.040	0.070	0.057
2	0.065	0.045	0.078	0.063
3	0.070	0.050	0.087	0.069
4	0.100	0.080	0.156	0.112
5	0.156	0.136	0.178	0.157
6	0.237	0.212	0.234	0.228
7	0.302	0.285	0.312	0.300
8	0.480	0.343	0.570	0.464
9	0.816	0.675	0.914	0.802
10	1.120	0.996	1.420	1.179
11	1.680	1.620	1.890	1.730
25	2.800	2.600	2.700	2.700
26	2.750	2.630	2.890	2.757
27	2.900	2.720	3.120	2.913
28	3.100	2.800	3.220	3.040
29	3.150	3.120	3.170	3.147
30	3.200	3.150	3.230	3.193
31	3.250	3.180	3.320	3.250
49	3.530	3.580	3.640	3.583
50	3.570	3.620	3.650	3.613
51	3.590	3.570	3.540	3.567
52	3.420	3.610	3.720	3.583
53	3.620	3.700	3.610	3.643
54	3.510	3.650	3.590	3.583
55	3.560	3.540	3.760	3.620
56	3.670	3.720	3.640	3.677
73	3.820	3.680	3.780	3.760
81	3.510	3.480	3.630	3.540
97	3.370	3.250	3.570	3.397
121	3.067	3.025	3.340	3.144

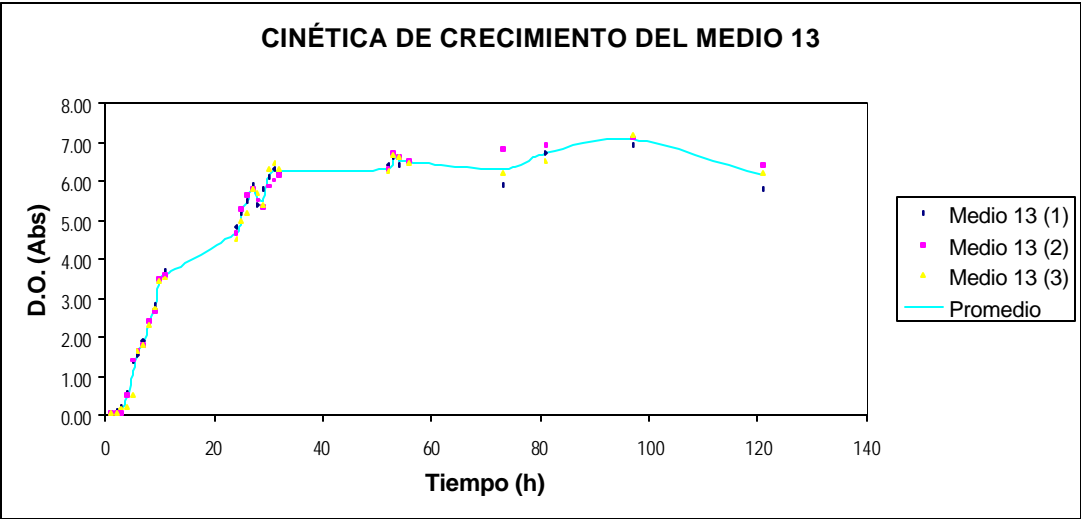
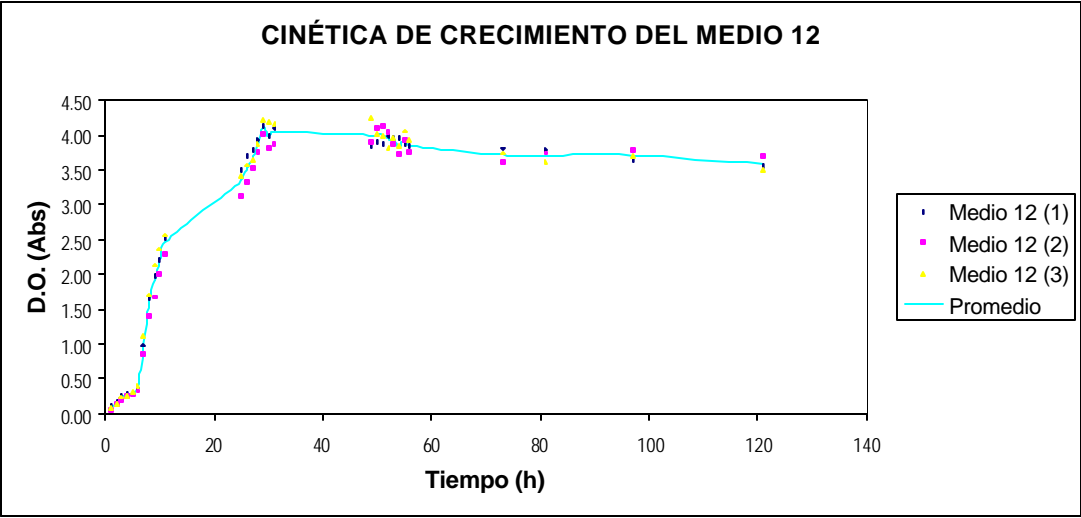
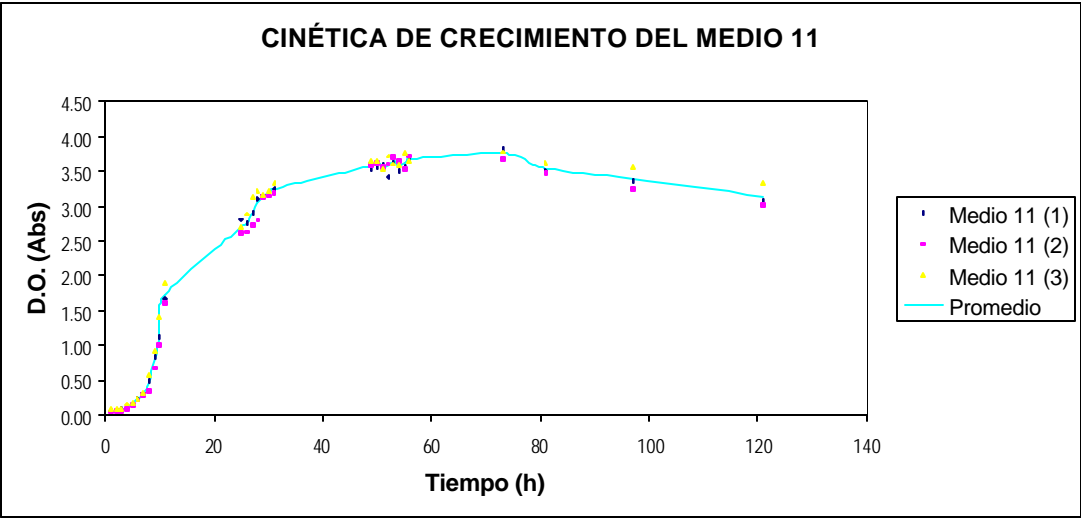
CINETICA DE CRECIMIENTO MEDIO 12				
Tiempo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
1	0.095	0.052	0.064	0.070
2	0.156	0.123	0.132	0.137
3	0.250	0.194	0.233	0.226
4	0.273	0.241	0.256	0.257
5	0.285	0.262	0.290	0.279
6	0.374	0.321	0.387	0.361
7	0.980	0.843	1.100	0.974
8	1.650	1.390	1.700	1.580
9	1.980	1.670	2.130	1.927
10	2.210	2.010	2.360	2.193
11	2.530	2.290	2.560	2.460
25	3.500	3.120	3.420	3.347
26	3.690	3.330	3.570	3.530
27	3.780	3.520	3.650	3.650
28	3.920	3.760	3.880	3.853
29	4.120	4.020	4.220	4.120
30	3.990	3.820	4.180	3.997
31	4.100	3.870	4.170	4.047
49	3.850	3.910	4.250	4.003
50	3.900	4.100	4.020	4.007
51	3.880	4.120	3.980	3.993
52	3.990	4.050	3.810	3.950
53	3.970	3.870	3.970	3.937
54	3.950	3.720	3.840	3.837
55	3.870	3.920	4.060	3.950
56	3.850	3.770	3.930	3.850
73	3.800	3.600	3.740	3.713
81	3.780	3.740	3.610	3.710
97	3.650	3.780	3.690	3.707
121	3.560	3.700	3.500	3.587

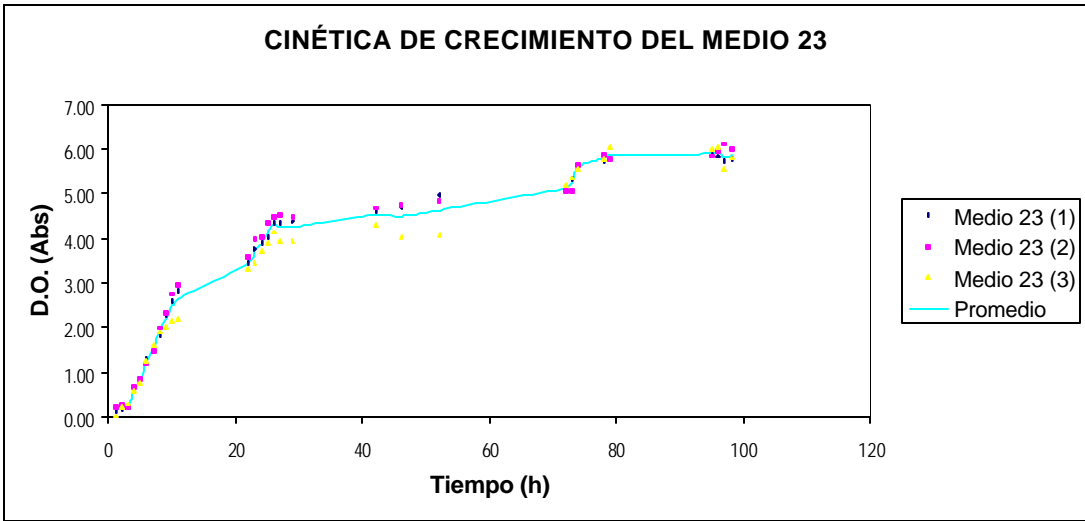
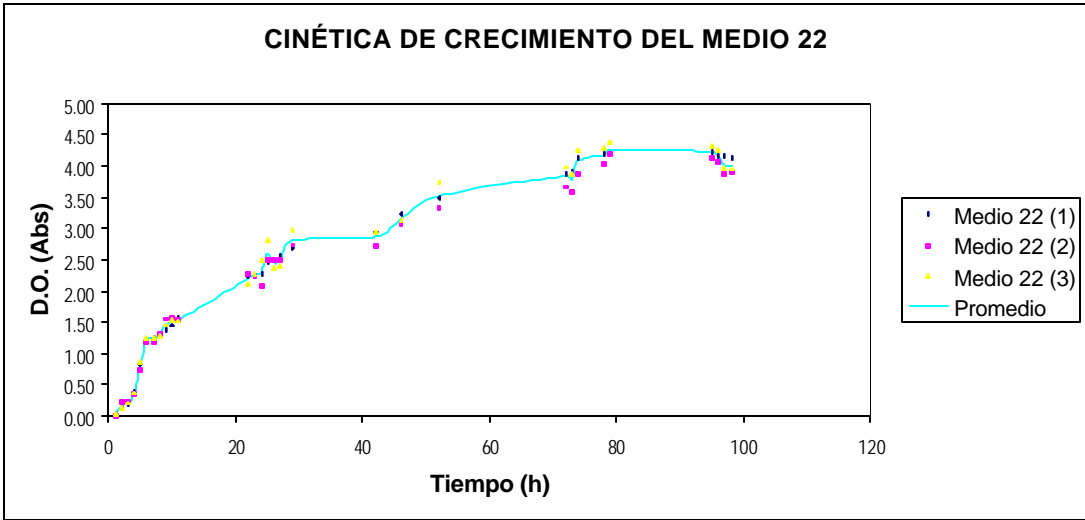
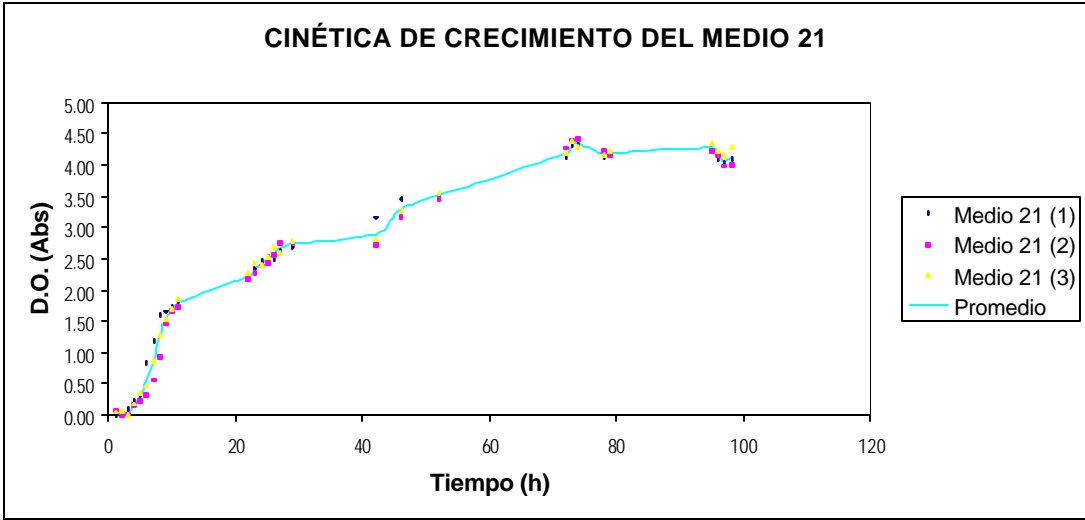
CINETICA DE CRECIMIENTO MEDIO 13				
Tiempo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
1	0.065	0.045	0.058	0.056
2	0.110	0.059	0.075	0.081
3	0.230	0.067	0.190	0.162
4	0.580	0.550	0.225	0.452
5	1.380	1.420	0.530	1.110
6	1.540	1.670	1.657	1.622
7	1.925	1.825	1.800	1.850
8	2.300	2.400	2.290	2.330
9	2.800	2.668	2.740	2.736
10	3.500	3.480	3.435	3.472
11	3.700	3.600	3.512	3.604
24	4.800	4.690	4.530	4.673
25	5.200	5.270	5.000	5.157
26	5.500	5.630	5.200	5.443
27	5.900	5.770	5.800	5.823
28	5.400	5.520	5.700	5.540
29	5.800	5.320	5.400	5.507
30	6.100	5.870	6.300	6.090
31	6.320	6.020	6.450	6.263
32	6.230	6.150	6.320	6.233
52	6.400	6.300	6.240	6.313
53	6.600	6.700	6.680	6.660
54	6.400	6.600	6.610	6.537
56	6.500	6.510	6.460	6.490
73	5.900	6.800	6.200	6.300
81	6.700	6.900	6.500	6.700
97	6.900	7.100	7.200	7.067
121	5.800	6.400	6.200	6.133

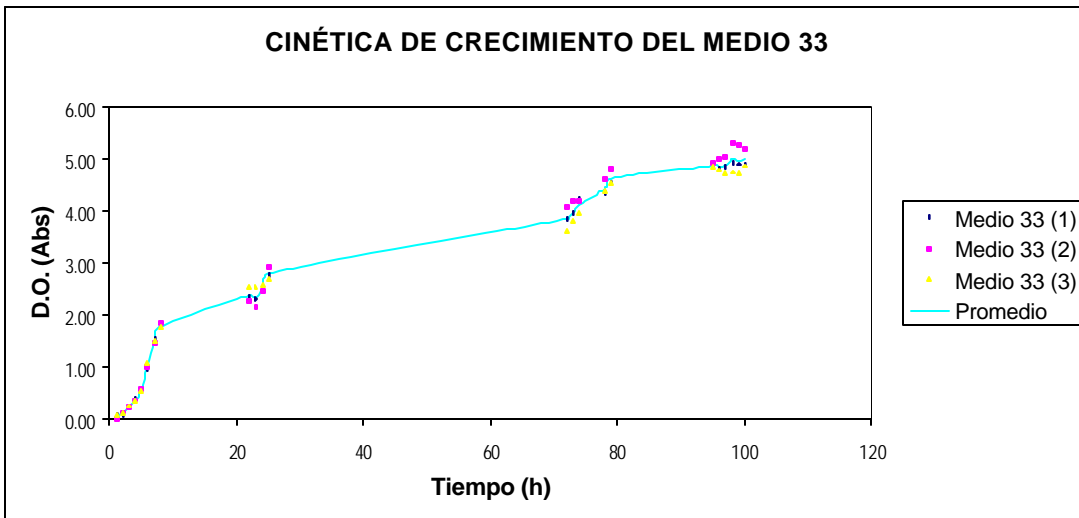
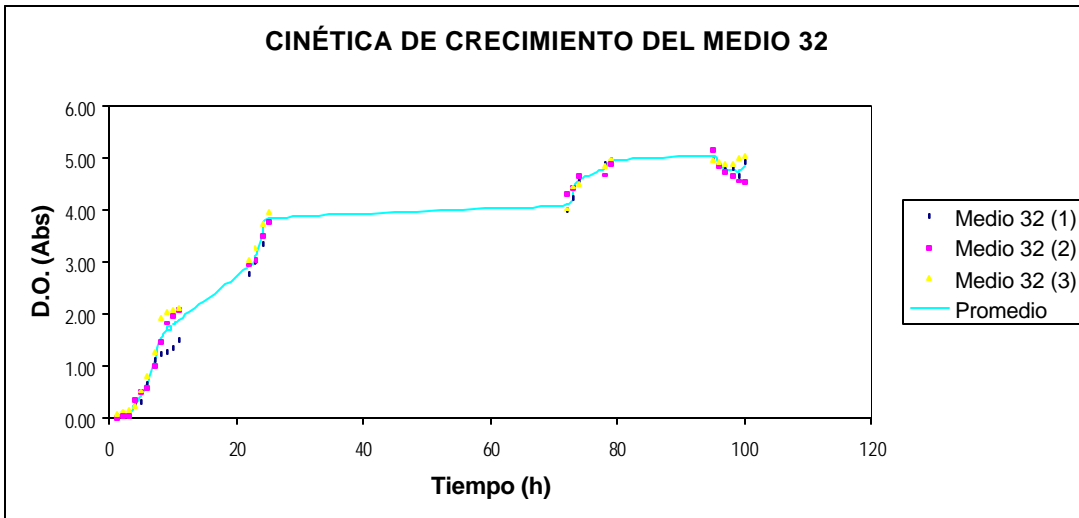
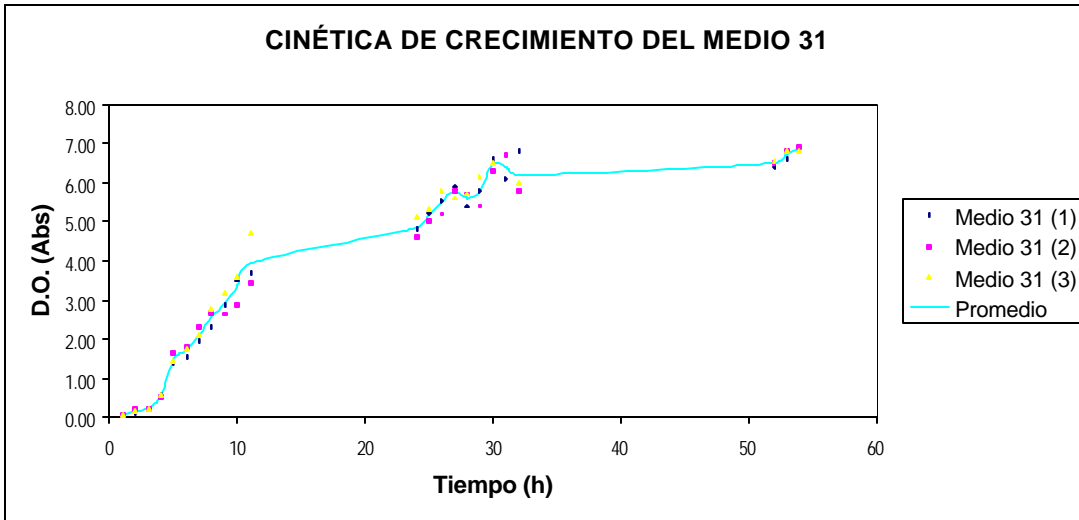
CINETICA DE CRECIMIENTO MEDIO 21				
Tiempo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
1	0.010	0.060	0.050	0.040
2	0.050	0.011	0.070	0.044
3	0.090	0.023	0.017	0.043
4	0.225	0.156	0.178	0.186
5	0.314	0.226	0.344	0.295
6	0.821	0.334	0.467	0.541
7	1.181	0.563	0.856	0.867
8	1.590	0.926	1.298	1.271
9	1.650	1.460	1.520	1.543
10	1.720	1.670	1.700	1.697
11	1.810	1.730	1.860	1.800
22	2.210	2.170	2.280	2.220
23	2.320	2.270	2.440	2.343
24	2.460	2.380	2.400	2.413
25	2.520	2.440	2.530	2.497
26	2.498	2.560	2.674	2.577
27	2.630	2.760	2.600	2.663
29	2.680	2.740	2.780	2.733
42	3.150	2.720	2.810	2.893
46	3.460	3.160	3.270	3.297
52	3.520	3.450	3.540	3.503
72	4.120	4.270	4.180	4.190
73	4.320	4.390	4.370	4.360
74	4.310	4.410	4.280	4.333
78	4.130	4.230	4.160	4.173
79	4.200	4.140	4.220	4.187
95	4.230	4.220	4.350	4.267
96	4.100	4.150	4.230	4.160
97	4.030	3.980	4.140	4.050
98	4.100	4.000	4.280	4.127

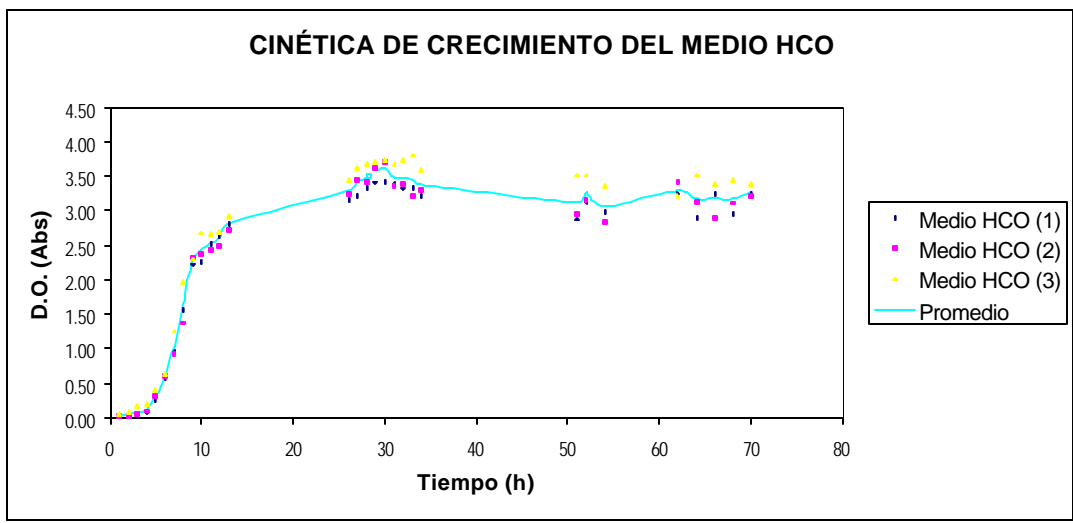
CINETICA DE CRECIMIENTO MEDIO 22				
Tiempo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
1	0.030	0.013	0.027	0.023
2	0.130	0.233	0.137	0.167
3	0.205	0.241	0.214	0.220
4	0.390	0.349	0.370	0.370
5	0.820	0.748	0.860	0.809
6	1.230	1.180	1.240	1.217
7	1.250	1.196	1.260	1.235
8	1.320	1.305	1.278	1.301
9	1.390	1.551	1.459	1.467
10	1.460	1.576	1.548	1.528
11	1.560	1.543	1.524	1.542
22	2.226	2.281	2.109	2.205
23	2.247	2.250	2.281	2.259
24	2.289	2.079	2.510	2.293
25	2.472	2.504	2.804	2.594
26	2.499	2.487	2.357	2.448
27	2.550	2.511	2.402	2.487
29	2.700	2.734	2.970	2.801
42	2.930	2.730	2.940	2.867
46	3.220	3.080	3.145	3.148
52	3.500	3.313	3.750	3.521
72	3.870	3.660	3.980	3.837
73	3.900	3.580	3.864	3.781
74	4.120	3.870	4.249	4.080
78	4.190	4.040	4.293	4.174
79	4.200	4.200	4.380	4.260
95	4.230	4.130	4.305	4.222
96	4.150	4.070	4.251	4.157
97	4.160	3.870	3.970	4.000
98	4.120	3.900	3.949	3.990

CINETICA DE CRECIMIENTO MEDIO 23				
Tiempo	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Prom
1	0.135	0.218	0.030	0.128
2	0.185	0.258	0.228	0.224
3	0.205	0.217	0.297	0.240
4	0.650	0.663	0.580	0.631
5	0.840	0.838	0.791	0.823
6	1.295	1.186	1.256	1.245
7	1.564	1.466	1.632	1.554
8	1.850	1.999	1.910	1.920
9	2.290	2.340	2.030	2.220
10	2.600	2.750	2.150	2.500
11	2.820	2.940	2.200	2.653
22	3.440	3.570	3.319	3.443
23	3.780	3.990	3.450	3.740
24	3.880	4.030	3.721	3.877
25	4.050	4.333	3.916	4.099
26	4.350	4.465	4.138	4.317
27	4.340	4.510	3.930	4.260
29	4.370	4.470	3.930	4.257
42	4.600	4.680	4.300	4.527
46	4.680	4.760	4.030	4.490
52	4.970	4.830	4.080	4.627
72	5.110	5.054	5.207	5.124
73	5.340	5.078	5.351	5.256
74	5.640	5.637	5.539	5.606
78	5.720	5.857	5.783	5.787
79	5.760	5.774	6.044	5.860
95	5.860	5.845	5.983	5.896
96	5.840	5.940	6.026	5.935
97	5.750	6.110	5.539	5.800
98	5.780	6.000	5.797	5.859









ANEXO 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Técnica de análisis de varianza:

Para realizar la comparación se partirá del modelo matemático:

$$y_{ij} = \mathbf{m} + \mathbf{t}_i + \mathbf{e}$$

Donde:

y_{ij} : Es la variable respuesta en el tratamiento "i" repetición "j".

\mathbf{m} : Es la media natural de la variable respuesta.

\mathbf{t}_i : Es el efecto que tiene el tratamiento "i" sobre la variable respuesta.

\mathbf{e} : Es el error experimental que se comete al realizar el estudio.

Hipótesis de trabajo:

$$H_0: \mathbf{m}_1 = \mathbf{m}_2 = \mathbf{m}_3 = \dots = \mathbf{m}_{10}$$

Vs

H_1 : Por lo menos un promedio es diferente.

Interpretación de la hipótesis nula: Esta hipótesis plantea la posibilidad de los tratamientos no influya sobre la variable respuesta.

Prueba de la Hipótesis:

Se empleará la técnica de análisis de varianza la cual se resume en la tabla

“ANAVA”

Fuente de Variación (1)	Grados de Libertad (2)	Suma de cuadrados (3)	Cuadrados medios (3/2)	F _{CALCULADA}
Tratamiento	a-1	$n \sum_{i=1}^a (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2$	$\frac{SC_{TRATAMIENTO}}{GL_{TRATAMIENTO}}$	$\frac{CM_{TRATAMIENTO}}{CM_{ERROR}}$
Error	Por Diferencia	Por Diferencia	$\frac{SC_{ERROR}}{GL_{ERROR}}$	
Total	(r*a)-1	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=01}^n (y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2$	-	

Donde:

a: Es el número de tratamientos en el experimento.

r: Es el número de réplicas que se realizarán en el experimento.

\bar{Y}_i : Es el promedio en el tratamiento “i”.

$\bar{Y}_{..}$: Es el promedio general de la variable respuesta.

Regla de Decisión: Una vez realizados los cálculos se aplica la siguiente regla de decisión:

$$Si: F_{calculada} > F_{teorica} \rightarrow \text{Se Rechaza } H_0$$

Donde:

$F_{teorica}$: Se busca en las tablas de distribución de probabilidad de Fisher con una confiabilidad del 95%.

Para reforzar la decisión tomada en el análisis de varianza, realizará la prueba de Scheffe, que nos permitirá identificar cual es el tratamiento óptimo se plantea la siguiente hipótesis:

$$H_0 : \mathbf{m}_{l=k} = \mathbf{m}_{l=r}$$

Vs

$$H_1 : \mathbf{m}_{l=k} \neq \mathbf{m}_{l=r}$$

Con $k \neq r$

La cual se interpreta como: Un tratamientos arroja igual proporción de positivos respecto al otro. Esta hipótesis se prueba con el siguiente estadístico:

$$S_{DIFERENCIA} = \sqrt{(a-1) * F_{teorica}} * \sqrt{CME * \left[\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right]}$$

Donde: r_1 y r_2 son las réplicas realizadas en cada una de las cepas comparadas.

Se rechazará la hipótesis nula si:

$$|Diferencia de Pr omedios| > S_{DIFERENCIA}$$

VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO

Análisis de varianza

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,035814	9	0,00397933	0,54	0,8265
Within groups	0,146734	20	0,00733669		
Total (Corr.)	0,182548	29			

Análisis de Scheffe

Method: 95,0 percent Scheffe			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
33	3	0,413667	X
32	3	0,416667	X
21	3	0,43	X
12	3	0,438667	X
22	3	0,446667	X
13	3	0,453	X
31	3	0,459167	X
23	3	0,476667	X
HCO	3	0,481333	X
11	3	0,536333	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	0,0976667	0,324549
11 - 13	0,0833333	0,324549
11 - 21	0,106333	0,324549
11 - 22	0,0896667	0,324549
11 - 23	0,0596667	0,324549
11 - 31	0,0771667	0,324549
11 - 32	0,119667	0,324549
11 - 33	0,122667	0,324549
11 - HCO	0,055	0,324549
12 - 13	-0,0143333	0,324549
12 - 21	0,00866667	0,324549
12 - 22	-0,008	0,324549
12 - 23	-0,038	0,324549
12 - 31	-0,0205	0,324549
12 - 32	0,022	0,324549
12 - 33	0,025	0,324549
12 - HCO	-0,0426667	0,324549
13 - 21	0,023	0,324549
13 - 22	0,00633333	0,324549
13 - 23	-0,0236667	0,324549
13 - 31	-0,00616667	0,324549
13 - 32	0,0363333	0,324549
13 - 33	0,0393333	0,324549
13 - HCO	-0,0283333	0,324549
21 - 22	-0,0166667	0,324549
21 - 23	-0,0466667	0,324549
21 - 31	-0,0291667	0,324549
21 - 32	0,0133333	0,324549
21 - 33	0,0163333	0,324549
21 - HCO	-0,0513333	0,324549
22 - 23	-0,03	0,324549
22 - 31	-0,0125	0,324549
22 - 32	0,03	0,324549

Contrast	Difference	+/- Limits
22 - 33	0,033	0,324549
22 - HCO	-0,0346667	0,324549
23 - 31	0,0175	0,324549
23 - 32	0,06	0,324549
23 - 33	0,063	0,324549
23 - HCO	-0,00466667	0,324549
31 - 32	0,0425	0,324549
31 - 33	0,0455	0,324549
31 - HCO	-0,0221667	0,324549
32 - 33	0,003	0,324549
32 - HCO	-0,0646667	0,324549
33 - HCO	-0,0676667	0,324549

* denotes a statistically significant difference.



TIEMPO DE DUPLICACIÓN

Análisis de varianza

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,400187	9	0,0444652	8,99	0,0000
Within groups	0,098944	20	0,0049472		
Total (Corr.)	0,499131	29			

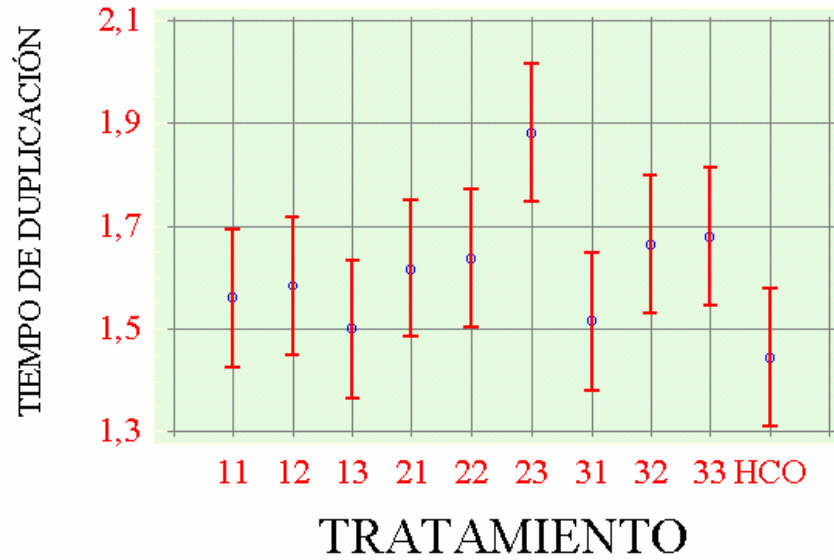
Análisis de Scheffe

Method: 95,0 percent Scheffe			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
HCO	3	1,44333	X
13	3	1,50033	X
31	3	1,51333	X
11	3	1,55833	X
12	3	1,58333	X
21	3	1,61667	XX
22	3	1,63667	XX
32	3	1,66333	XX
33	3	1,67667	XX
23	3	1,88	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	-0,025	0,266508
11 - 13	0,058	0,266508
11 - 21	-0,0583333	0,266508
11 - 22	-0,0783333	0,266508
11 - 23	*-0,321667	0,266508
11 - 31	0,045	0,266508
11 - 32	-0,105	0,266508
11 - 33	-0,118333	0,266508
11 - HCO	0,115	0,266508
12 - 13	0,083	0,266508
12 - 21	-0,0333333	0,266508
12 - 22	-0,0533333	0,266508
12 - 23	*-0,296667	0,266508
12 - 31	0,07	0,266508
12 - 32	-0,08	0,266508
12 - 33	-0,0933333	0,266508
12 - HCO	0,14	0,266508
13 - 21	-0,116333	0,266508
13 - 22	-0,136333	0,266508
13 - 23	*-0,379667	0,266508
13 - 31	-0,013	0,266508
13 - 32	-0,163	0,266508
13 - 33	-0,176333	0,266508
13 - HCO	0,057	0,266508
21 - 22	-0,02	0,266508
21 - 23	-0,263333	0,266508
21 - 31	0,103333	0,266508
21 - 32	-0,0466667	0,266508
21 - 33	-0,06	0,266508
21 - HCO	0,173333	0,266508
22 - 23	-0,243333	0,266508
22 - 31	0,123333	0,266508
22 - 32	-0,0266667	0,266508
22 - 33	-0,04	0,266508
22 - HCO	0,193333	0,266508
23 - 31	*0,366667	0,266508

23 - 32	0,216667	0,266508
23 - 33	0,203333	0,266508
23 - HCO	*0,436667	0,266508
31 - 32	-0,15	0,266508
31 - 33	-0,163333	0,266508
31 - HCO	0,07	0,266508
32 - 33	-0,0133333	0,266508
32 - HCO	0,22	0,266508
33 - HCO	0,233333	0,266508

 * denotes a statistically significant difference.



ESPORAS/ml

Análisis de Varianza.

ANOVA Table for Col_2 by TRATAMIERN

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6,70859E17	9	7,45399E16	51,29	0,0000
Within groups	2,90687E16	20	1,45343E15		
Total (Corr.)	6,99927E17	29			

Análisis de Scheffe.

Multiple Range Tests for Col_2 by TRATAMIERN

Method: 95,0 percent Scheffe

TRATAMIERN	Count	Mean	Homogeneous Groups
33	3	3,1E7	X
32	3	1,26667E8	XX
22	3	1,36667E8	XX
13	3	1,46667E8	XX
23	3	2,36667E8	XX
21	3	3,06667E8	XX
11	3	3,4E8	XX
12	3	3,76667E8	XX
HCO	3	4,16667E8	XX
31	3	5,4E8	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	-3,66667E7	1,44453E8
11 - 13	*1,93333E8	1,44453E8
11 - 21	3,33333E7	1,44453E8
11 - 22	*2,03333E8	1,44453E8
11 - 23	1,03333E8	1,44453E8
11 - 31	*-2,E8	1,44453E8
11 - 32	*2,13333E8	1,44453E8
11 - 33	*3,09E8	1,44453E8
11 - HCO	-7,66667E7	1,44453E8
12 - 13	*2,3E8	1,44453E8
12 - 21	7,E7	1,44453E8
12 - 22	*2,4E8	1,44453E8
12 - 23	1,4E8	1,44453E8
12 - 31	*-1,63333E8	1,44453E8
12 - 32	*2,5E8	1,44453E8
12 - 33	*3,45667E8	1,44453E8
12 - HCO	-4,E7	1,44453E8
13 - 21	*-1,6E8	1,44453E8
13 - 22	1,E7	1,44453E8
13 - 23	-9,E7	1,44453E8
13 - 31	*-3,93333E8	1,44453E8
13 - 32	2,E7	1,44453E8
13 - 33	1,15667E8	1,44453E8
13 - HCO	*-2,7E8	1,44453E8
21 - 22	*1,7E8	1,44453E8
21 - 23	7,E7	1,44453E8
21 - 31	*-2,33333E8	1,44453E8
21 - 32	*1,8E8	1,44453E8
21 - 33	*2,75667E8	1,44453E8
21 - HCO	-1,1E8	1,44453E8

22 - 23	-1,E8	1,44453E8
22 - 31	*-4,03333E8	1,44453E8
22 - 32	1,E7	1,44453E8
22 - 33	1,05667E8	1,44453E8
22 - HCO	*-2,8E8	1,44453E8
23 - 31	*-3,03333E8	1,44453E8
23 - 32	1,1E8	1,44453E8
23 - 33	*2,05667E8	1,44453E8
23 - HCO	*-1,8E8	1,44453E8
31 - 32	*4,13333E8	1,44453E8
31 - 33	*5,09E8	1,44453E8
31 - HCO	1,23333E8	1,44453E8
32 - 33	9,56667E7	1,44453E8
32 - HCO	*-2,9E8	1,44453E8
33 - HCO	*-3,85667E8	1,44453E8

 * denotes a statistically significant difference.

PROTEINA LIOFILIZADA

Análisis de varianza

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	409456,0	9	45495,1	279,91	0,0000
Within groups	3250,67	20	162,533		
Total (Corr.)	412707,0	29			

Análisis de Scheffe

Method: 95,0 percent Scheffe

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
32	3	279,333	X
33	3	333,333	X
23	3	393,333	X
22	3	469,667	X
21	3	492,0	XX
11	3	514,333	XX
12	3	523,333	X
13	3	532,0	X
31	3	621,0	X
HCO	3	683,667	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	-9,0	48,306
11 - 13	-17,6667	48,306
11 - 21	22,3333	48,306
11 - 22	44,6667	48,306
11 - 23	*121,0	48,306
11 - 31	*-106,667	48,306
11 - 32	*235,0	48,306
11 - 33	*181,0	48,306
11 - HCO	*-169,333	48,306
12 - 13	-8,66667	48,306
12 - 21	31,3333	48,306
12 - 22	*53,6667	48,306
12 - 23	*130,0	48,306
12 - 31	*-97,6667	48,306
12 - 32	*244,0	48,306
12 - 33	*190,0	48,306
12 - HCO	*-160,333	48,306
13 - 21	40,0	48,306
13 - 22	*62,3333	48,306
13 - 23	*138,667	48,306
13 - 31	*-89,0	48,306
13 - 32	*252,667	48,306
13 - 33	*198,667	48,306
13 - HCO	*-151,667	48,306
21 - 22	22,3333	48,306
21 - 23	*98,6667	48,306
21 - 31	*-129,0	48,306
21 - 32	*212,667	48,306
21 - 33	*158,667	48,306
21 - HCO	*-191,667	48,306
22 - 23	*76,3333	48,306
22 - 31	*-151,333	48,306
22 - 32	*190,333	48,306
22 - 33	*136,333	48,306
22 - HCO	*-214,0	48,306
23 - 31	*-227,667	48,306

23 - 32	*114,0	48,306
23 - 33	*60,0	48,306
23 - HCO	*-290,333	48,306
31 - 32	*341,667	48,306
31 - 33	*287,667	48,306
31 - HCO	*-62,6667	48,306
32 - 33	*-54,0	48,306
32 - HCO	*-404,333	48,306
33 - HCO	*-350,333	48,306

-
- denotes a statistically significant difference.

PESO LIOFILIZADO

Análisis de varianza

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,73632	9	0,526258	29,54	0,0000
Within groups	0,356267	20	0,0178133		
Total (Corr.)	5,09259	29			

Análisis de Scheffe

Method: 95,0 percent Scheffe			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
11	3	0,466667	X
21	3	1,06667	X
13	3	1,06667	X
32	3	1,2	XX
22	3	1,5	XXX
12	3	1,54	XXX
33	3	1,63333	XX
23	3	1,66667	XX
31	3	1,73333	X
HCO	3	1,83333	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	*-1,07333	0,505711
11 - 13	*-0,6	0,505711
11 - 21	*-0,6	0,505711
11 - 22	*-1,03333	0,505711
11 - 23	*-1,2	0,505711
11 - 31	*-1,26667	0,505711
11 - 32	*-0,733333	0,505711
11 - 33	*-1,16667	0,505711
11 - HCO	*-1,36667	0,505711
12 - 13	0,473333	0,505711
12 - 21	0,473333	0,505711
12 - 22	0,04	0,505711
12 - 23	-0,126667	0,505711
12 - 31	-0,193333	0,505711
12 - 32	0,34	0,505711
12 - 33	-0,0933333	0,505711
12 - HCO	-0,293333	0,505711
13 - 21	0,0	0,505711
13 - 22	-0,433333	0,505711
13 - 23	*-0,6	0,505711
13 - 31	*-0,666667	0,505711
13 - 32	-0,133333	0,505711
13 - 33	*-0,566667	0,505711
13 - HCO	*-0,766667	0,505711
21 - 22	-0,433333	0,505711
21 - 23	*-0,6	0,505711
21 - 31	*-0,666667	0,505711
21 - 32	-0,133333	0,505711
21 - 33	*-0,566667	0,505711
21 - HCO	*-0,766667	0,505711
22 - 23	-0,166667	0,505711
22 - 31	-0,233333	0,505711
22 - 32	0,3	0,505711
22 - 33	-0,133333	0,505711
22 - HCO	-0,333333	0,505711

23 - 31	-0,0666667	0,505711
23 - 32	0,4666667	0,505711
23 - 33	0,0333333	0,505711
23 - HCO	-0,1666667	0,505711
31 - 32	*0,5333333	0,505711
31 - 33	0,1	0,505711
31 - HCO	-0,1	0,505711
32 - 33	-0,4333333	0,505711
32 - HCO	*-0,6333333	0,505711
33 - HCO	-0,2	0,505711

* denotes a statistically significant difference.

UFC/ml

Análisis de varianza

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1,01115E19	9	1,1235E18	1,34	0,2787
Within groups	1,67757E19	20	8,38785E17		
Total (Corr.)	2,68872E19	29			

Análisis de Scheffe

Method: 95,0 percent Scheffe			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
33	3	6,3E7	X
11	3	3,53333E8	X
32	3	3,63333E8	X
12	3	3,7E8	X
23	3	5,2E8	X
22	3	5,43333E8	X
31	3	6,56667E8	X
HCO	3	7,26667E8	X
13	3	1,81333E9	X
21	3	1,85333E9	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	-1,66667E7	3,47021E9
11 - 13	-1,46E9	3,47021E9
11 - 21	-1,5E9	3,47021E9
11 - 22	-1,9E8	3,47021E9
11 - 23	-1,66667E8	3,47021E9
11 - 31	-3,03333E8	3,47021E9
11 - 32	-1,E7	3,47021E9
11 - 33	2,90333E8	3,47021E9
11 - HCO	-3,73333E8	3,47021E9
12 - 13	-1,44333E9	3,47021E9
12 - 21	-1,48333E9	3,47021E9
12 - 22	-1,73333E8	3,47021E9
12 - 23	-1,5E8	3,47021E9
12 - 31	-2,86667E8	3,47021E9
12 - 32	6,66667E6	3,47021E9
12 - 33	3,07E8	3,47021E9
12 - HCO	-3,56667E8	3,47021E9
13 - 21	-4,E7	3,47021E9
13 - 22	1,27E9	3,47021E9
13 - 23	1,29333E9	3,47021E9
13 - 31	1,15667E9	3,47021E9
13 - 32	1,45E9	3,47021E9
13 - 33	1,75033E9	3,47021E9
13 - HCO	1,08667E9	3,47021E9
21 - 22	1,31E9	3,47021E9
21 - 23	1,33333E9	3,47021E9
21 - 31	1,19667E9	3,47021E9
21 - 32	1,49E9	3,47021E9
21 - 33	1,79033E9	3,47021E9
21 - HCO	1,12667E9	3,47021E9
22 - 23	2,33333E7	3,47021E9
22 - 31	-1,13333E8	3,47021E9
22 - 32	1,8E8	3,47021E9
22 - 33	4,80333E8	3,47021E9
22 - HCO	-1,83333E8	3,47021E9

23 - 31	-1,36667E8	3,47021E9
23 - 32	1,56667E8	3,47021E9
23 - 33	4,57E8	3,47021E9
23 - HCO	-2,06667E8	3,47021E9
31 - 32	2,93333E8	3,47021E9
31 - 33	5,93667E8	3,47021E9
31 - HCO	-7,E7	3,47021E9
32 - 33	3,00333E8	3,47021E9
32 - HCO	-3,63333E8	3,47021E9
33 - HCO	-6,63667E8	3,47021E9

* denotes a statistically significant difference.

RELACIÓN ESPORA CRISTAL

Análisis de varianza

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,696683	9	0,0774092	12,76	0,0000
Within groups	0,12134	20	0,006067		
Total (Corr.)	0,818023	29			

Análisis de Scheffe

Method: 95,0 percent Scheffe

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
22	3	1,15067	X
HCO	3	1,269	X
13	3	1,299	XX
11	3	1,30467	XX
31	3	1,32333	XX
12	3	1,33567	XX
21	3	1,339	XX
23	3	1,566	XX
33	3	1,57167	XX
32	3	1,65733	X

Contrast	Difference	+/- Limits
11 - 12	-0,031	0,295133
11 - 13	0,00566667	0,295133
11 - 21	-0,03433333	0,295133
11 - 22	0,154	0,295133
11 - 23	-0,261333	0,295133
11 - 31	-0,01866667	0,295133
11 - 32	*-0,352667	0,295133
11 - 33	-0,267	0,295133
11 - HCO	0,03566667	0,295133
12 - 13	0,03666667	0,295133
12 - 21	-0,003333333	0,295133
12 - 22	0,185	0,295133
12 - 23	-0,230333	0,295133
12 - 31	0,0123333	0,295133
12 - 32	*-0,321667	0,295133
12 - 33	-0,236	0,295133
12 - HCO	0,06666667	0,295133
13 - 21	-0,04	0,295133
13 - 22	0,148333	0,295133
13 - 23	-0,267	0,295133
13 - 31	-0,0243333	0,295133
13 - 32	*-0,358333	0,295133
13 - 33	-0,272667	0,295133
13 - HCO	0,03	0,295133
21 - 22	0,188333	0,295133
21 - 23	-0,227	0,295133
21 - 31	0,01566667	0,295133
21 - 32	*-0,318333	0,295133
21 - 33	-0,232667	0,295133
21 - HCO	0,07	0,295133
22 - 23	*-0,415333	0,295133
22 - 31	-0,172667	0,295133
22 - 32	*-0,506667	0,295133
22 - 33	*-0,421	0,295133

22 - HCO	-0,118333	0,295133
23 - 31	0,242667	0,295133
23 - 32	-0,0913333	0,295133
23 - 33	-0,00566667	0,295133
23 - HCO	*0,297	0,295133
31 - 32	*-0,334	0,295133
31 - 33	-0,248333	0,295133
31 - HCO	0,0543333	0,295133
32 - 33	0,0856667	0,295133
32 - HCO	*0,388333	0,295133
33 - HCO	*0,302667	0,295133

• denotes a statistically significant difference.