

INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO, EL TIPO DE INÓCULO Y LAS CONDICIONES DE AGITACIÓN-AIREACIÓN EN LA REPRODUCCIÓN DE DOS CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (BERL.) EN FERMENTADORES DE DIFERENTES VOLÚMENES

Orietta Fernández-Larrea Vega, Argelia Cejas Valencia y María Elena Márquez Gutiérrez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, oflarrea@inisav.cu

RESUMEN

El comportamiento de la cepa LBT-3 de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se determinó en fermentadores de 30 y 100 L de capacidad efectiva, y de la LBT-13 en fermentadores de 5, 30, 100 y 500 L. Se comprobaron algunos de los parámetros ajustados en zaranda y se obtuvieron rendimientos de esporas y cristales entre $1-3 \times 10^9$ esporas/mL después de 28-32 h de cultivo. Las dos variantes de inóculos ensayadas con la cepa LBT-3 (cultivos en fase logarítmica y esporulados) no mostraron diferencias en los diferentes fermentadores utilizados en relación con el rendimiento final de esporas y cristales, aunque sí influyeron en el tiempo del proceso que fue siempre menor, cuando se utilizaron inóculos en fase vegetativa y a concentraciones entre el 5 y el 10%. Un régimen más elevado de agitación-aireación permitió incrementar el rendimiento de espores y cristales, mientras que el porcentaje de esporas no varió significativamente en las diferentes variantes, ni el tiempo del proceso. En los cuatro fermentadores utilizados con la cepa LBT-13 se encontró que el tiempo del proceso aumentó en relación directa con el volumen de los equipos, y que en el fermentador de 100 L se obtuvieron las concentraciones más elevadas de esporas y cristales y un tiempo de proceso más largo. Las variaciones del pH, características del cultivo y el incremento de la concentración de la biomasa (células por mililitro) en fermentadores de 100 y 500 L con la cepa LBT-13, mostraron un comportamiento similar en ambos equipos. La efectividad biológica de los caldos fermentados se demostró mediante bioensayos.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, fermentación, parámetros de producción

ABSTRACT

The behavior of *Bacillus thuringiensis* strain LBT-3 was determined in fermentation equipment of 30 and 100 L of effective capacity, and for strain LBT-13 by using equipment of 5, 30, 100 and 500 L. The parameter obtained by shaker in laboratory level were confirmed when yield of $1-3 \times 10^9$ spores and toxins crystal/mL were obtained after 28-32 hours. The two types of inoculums (log cultures and spores) with LBT-3 strain did not show difference in the different fermentation scale in relation with the concentration of spores and crystals, but the time of process was lower when log cultures was used. A higher aeration and agitation regimen allowed increase the yield of spores and crystals. In the four scales of fermentation used with LBT-13 strain, the time of the process increase in relation with the volume of fermentation. Higher concentration of yields was obtained by using 100 L fermentation equipment and also increased the process time. Variations of pH, microbiological characteristics and biomass did not show differences with LBT-13 strain in both 100 and 500 L fermentation equipments. The affectivity of cultures was demonstrated by bioassays.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, fermentation, production parameters

INTRODUCCIÓN

La producción de un bioplaguicida a partir de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) requiere de un medio de cultivo que permita obtener una elevada concentración de esporas y cristales de δ -endotoxina; es necesario además que sus componentes resulten económicos y de fácil adquisición. De igual forma el ajuste

correcto de los parámetros del proceso se traduce en mejores rendimientos y mayor eficiencia, lo cual debe comprobarse a las diferentes escalas de producción [Vanderkar y Dulmage, 1983; Devisetty, 1993; Bernhard y Utz, 1993; Ibarra, 1997; Morris *et al.*, 1995; Bai y Brady, 2001].

Para que un proceso de producción microbiológico se utilice de forma industrial resulta necesario que pueda ser escalado para obtener grandes volúmenes de productos [Blackebrough y Moresi, 1981; Vercht-Lifshitz *et al.*, 1989].

En la práctica el empleo de microorganismos para el control de plagas está condicionado a la posibilidad de obtener grandes cantidades de estos productos con elevada eficiencia y a bajo costo, que les permita ser competitivos con los productos químicos [Dulmage, 1981; Lysanki, 1993].

En laboratorio se han desarrollado muchos procesos de reproducción de microorganismos entomopatógenos que no ha sido posible llevar a gran escala [Miller y Churchill, 1986; Balaraman *et al.*, 1996]; sin embargo, la producción de bioplaguicidas a partir de la especie bacteriana *Bacillus thuringiensis* ha hecho posible que actualmente existan decenas de productos en forma comercial que se utilizan en su mayoría para el control de lepidópteros y dípteros, y en menor medida para otros grupos de organismos plaga [De Barjac y Frachon, 1990; Federeci y Wu, 1995].

La producción de *Bt* por vía fermentativa en Cuba se realiza en plantas de producción con fermentadores de 500 L, en las cuales se obtiene un producto en forma de fluido acuoso concentrado que se aplica para el control de diferentes especies de lepidópteros [Díaz *et al.*, 1996; Fernández-Larrea *et al.*, 1999]. Para la introducción en las plantas de fermentación de la producción con las cepas LBT-3 y LBT-13 de *Bt*, con efectividad comprobada para el control de nematodos y ácaros [Almaguel *et al.*, 1993; Mena *et al.*, 1998], y para las cuales se encuentran definidos los medios y parámetros de producción a escala de zaranda, resulta necesaria la comprobación y ajuste de los medios y parámetros a escala de fermentador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas LBT-3 y LBT-13 pertenecientes al cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Inisav) se mantuvieron como cultivos en fase de esporas, obtenidos sobre cuñas con agar nutriente incubadas durante siete días a 27°C y mantenidas en refrigeración a 4°C. Se conservaron en forma liofilizada.

En todos los casos en que se utilizaron las suspensiones de esporas se obtuvieron por arrastre de los cultivos esporulados con solución salina estéril de NaCl al

0,85%, y se ajustaron las concentraciones según los requerimientos del experimento, mediante diluciones con solución salina de igual composición.

Se realizaron conteos de células (o esporas) para verificar la concentración por mililitro de la suspensión utilizada o de los caldos fermentados, que se efectuaron en un microscopio de contraste de fases a 400x, y se empleó una cámara de Neubauer. En caso necesario las concentraciones se ajustaron por medio de la misma solución salina ya referida.

Se realizaron bioensayos con ácaros y nematodos. Para los primeros se colocó una hoja de plátano joven en cada placa Petri estéril, que contenía un pedazo de algodón embebido en agua destilada estéril debajo de la hoja. La prueba contó de tres réplicas para cada tratamiento y un control negativo con el medio de cultivo. Se colocaron diez ácaros (*Tetranychus tumidus*) por réplica. Las hojas se asperjaron con una suspensión de las muestras por ensayar a una concentración de 10⁸ esporas/mL. Los resultados se observaron a las 24, 48, 72 h, cinco y siete días, cuando se contaron los ácaros muertos.

Para lo bioensayos con nematodos se tomaron ootecas jóvenes de *Meloidogyne incognita* esterilizadas en solución de hipoclorito de sodio al 2%, y se colocaron en un vidrio reloj al que se añadió un mililitro de las diferentes variantes por ensayar, concentradas y diluidas (1/10), a una concentración máxima de 10⁸ esporas/mL. Se realizaron tres réplicas para cada variante y se pusieron diez ootecas por réplica. La evaluación del porcentaje de eclosión se determinó por observación a los 10 días bajo un microscopio estereoscópico 200x. El resultado se determinó por el porcentaje de huevos no eclosionados.

Se calculó la efectividad por la fórmula de Abbott [CIBA-Geigy, 1978] y se aplicó para calcular la eficiencia técnica de los productos ensayados en el laboratorio.

Los medios de cultivo se esterilizaron durante 40 min a 1,5 atm, y se evaluaron por la mayor producción de esporas y cristales por mililitro.

Para comprobar los resultados a escala de fermentador se probaron los medios M4 y M11 para la cepa LBT-13, y el MO para la LBT-3 (Tabla 1). El valor del pH al inicio de la fermentación se ajustó de 6,8 a 7,2. La esterilización se realizó a 121°C durante 40 min, y se utilizaron fermentadores de 10 L con 5 L de capacidad, de 45 L con 30 L efectivos, y de 140 L con 100 L de capacidad efectiva, instalados en la planta piloto del Inisav, y un fermentador de 750 L con 500 L efectivos, instalado en la planta de bioplaguicidas de Güira de Melena.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivos utilizados en la prueba

Medio	Composición (g/L)
MO	Levadura panadera 2,5; levadura torula 5,0; almidón de yuca 2,5
M4	Levadura torula 35,0; almidón de yuca 5,0; fosfato de amonio 2,0; sulfato de potasio 1,0
M11	Levadura torula 5,0; harina de soya 5,0; almidón 5 g/L; carbonato de calcio 0,3 g/L

Los preinóculos se prepararon a partir de suspensiones de esporas y cristales, realizados con una solución estéril de NaCl al 0,85% para el arrastre de los cultivos esporulados. Las suspensiones se sometieron a tratamiento de 60°C durante 15 min para eliminar la posible presencia de células vegetativas.

Como inóculo se utilizaron dos variantes para la cepa LBT-3. La variante 1 constituida por cultivos totalmente esporulados sobre agar nutriente en frascos Roux, a partir de los cuales se obtuvieron suspensiones de esporas por arrastre con solución salina estéril de NaCl 0,85%, las cuales se ajustaron a una concentración de $3-6 \times 10^8$ esporas/mL, y se sometieron a tratamiento térmico durante 15 min a 60°C, y se inocularon al 1% v/v; la variante 2 formada por cultivos de ocho horas en fase de crecimiento vegetativo, obtenidas por agitación en el mismo medio empleado para la fermentación e inoculados al 10% v/v. Para la cepa LBT-13 solo se emplearon cultivos esporulados según la variante 1 ya explicada.

La agitación y aireación (rpm/vvm) se variaron según las posibilidades de los diferentes equipos utilizados, y se tuvieron en cuenta los resultados a nivel de zaranda. La presión en los equipos se mantuvo siempre por encima de 0,5 atm.

Se tomaron alícuotas en condiciones estériles a las 8, 12, 16, 20, 24 h y al final del proceso, lo cual se determinó por la presencia de un porcentaje de esporas y cristales superior al 90%. Se realizaron observaciones al microscopio óptico a 1000x mediante preparaciones teñidas con solución de violeta cristal al 5% para determinar las características del cultivo. En cada muestra se midió el valor del pH y se realizaron siembras en placas con agar nutriente para determinar la ausencia de contaminaciones. A las muestras finales se les realizó, además, conteo en cámara de Neubauer y bioensayo.

Para todos los experimentos a los cuales se realizaron análisis de comparación de medias, los resultados se sometieron a análisis estadísticos de varianza simple,

mediante la comparación de los valores medios del logaritmo de las concentraciones, para lo cual se empleó la prueba de Newman Keuls con el 5% de error.

Los resultados correspondientes a la concentración final de biomasa, porcentaje de esporas y tiempo del proceso para las diferentes variantes de inóculo y régimen de aireación y agitación, en el caso de la comprobación de los resultados a escala de fermentador 30 L para la cepa LBT-3, en el cual se variaron estos parámetros, se trataron con un análisis de varianza multivariable Anova. La comparación de las medias se hizo mediante una prueba de Tukey (diferencias significativas honestas) con un nivel alpha para rangos críticos del 0,05%.

A los resultados con la cepa LBT-13 en los diferentes fermentadores se determinaron los valores medios y la desviación estándar del tiempo del proceso y concentración final obtenidas para los diferentes equipos, y los logaritmos de los valores medios se sometieron a un análisis de varianza simple, para lo que se empleó la prueba de Newman Keuls para el 5% de probabilidad de error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados con la cepa LBT-3 en fermentador de 30 y 100 L de capacidad efectiva (*Tablas 2, 3, 4 y 5*) permitieron corroborar que la variable inóculo no resultó significativa entre cultivos esporulados al 1% (variante 1) y cultivos en fase logarítmica (ocho horas en agitación) al 10% (variante 2), en relación con la concentración final de biomasa, aunque sí con relación al tiempo del proceso, ya que resultó significativamente menor cuando se emplearon cultivos de ocho horas a una concentración de 10% v/v, lo que se comprobó en los dos equipos utilizados (30 y 100 L). Estos resultados concuerdan con lo reportado en los procesos de producción de *Bt* por varios autores, quienes utilizaron otras cepas [Dharmisthidi *et al.*, 1985; Vanderkar y Dulmage, 1983; Bernhard y Utz, 1993; Morris *et al.*, 1995; Fernández-Larrea *et al.*, 1995; Galán *et al.*, 1996; Aves *et al.*, 1997].

Cuando se varió el régimen de agitación-aireación en el fermentador de 30 L se encontró un incremento significativo en la concentración final de esporas y cristales por mililitro (Tabla 3) al utilizar 300 rpm y un vvm, lo que indica la importancia de la aireación en estos procesos [Aiba *et al.*, 1973; Andrade 1990; Medrano *et al.*, 1993; Cejas *et al.*, 1996].

Al analizar la influencia de las dos variables ensayadas sobre el porcentaje de esporas, se observó que no hubo

diferencias significativas, y resultó independiente del régimen de aireación-agitación y del tipo de inóculo utilizado (Tablas 3 y 5), lo cual concuerda con lo reportado por varios autores, quienes consideran que el final de un proceso exitoso se caracteriza por una población con un porcentaje de esporas y cristales entre el 90 y el 100% [Vanderkar y Dulmage, 1982; Bernhard y Utz, 1993; Morris *et al.*, 1995; Galán *et al.*, 1996; Vallejo y Orduz, 1996].

Tabla 2. Resultados de las corridas de la cepa LBT-3 en el fermentador de 30 L

Inóculo	Rpm/vvm	Tiempo (h)	Características del cultivo	Título (células por mililitro)
Esporas (1%)	300/1	24	70	1,2 x 10 ⁹
Esporas (1%)	300/1	33	96	3,5 x 10 ⁹
Esporas (1%)	300/1	30	90	2,6 x 10 ⁹
Esporas (1%)	400/0,5	27	100	4,8 x 10 ⁹
Esporas (1%)	400/0,5	28	98	3,2 x 10 ⁹
Esporas (1%)	400/0,5	29	96	3,8 x 10 ⁹
8h (5%)	300/1	26	99	1,5 x 10 ⁹
8h (5%)	300/1	26	93	1,4 x 10 ⁹
8h (5%)	300/1	26	90	1,6 x 10 ⁹
8h (10%)	300/1	24	93	2,6 x 10 ⁹
8h (10%)	300/1	25	98	2,4 x 10 ⁹
8h (10%)	300/1	24	95	2,3 x 10 ⁹
8h (10%)	400/0,5	23	98	3,4 x 10 ⁹
8h (10%)	400/0,5	24	97	2,9 x 10 ⁹
8h (10%)	400/0,5	24	100	3,2 x 10 ⁹
8h (10%)	400/0,5	24	98	3,0 x 10 ⁹
X media		26,06	95,43	2,64 x 10 ⁹
EE		2,74	7,23	0,97
CV (%)		9,49%	7,66%	35%

Tabla 3. Análisis estadístico (prueba de Tukey HDS) para las corridas en el fermentador de 30 L

Indep. var. / dep. var.	Tiempo	Título
Esporas (1%)	28,25 a	
8 h (5%)	27,50 ab	
8 h (10%)	24,25 b	
400/0,5	No significativo	2,03 x 10 ⁹ a
300/1		3,64 x 10 ⁹ b

En el fermentador de 100 L (Tablas 4 y 5) se confirmó que solamente el tipo de inóculo influyó en el tiempo del proceso, y disminuyó significativamente en comparación cuando se utilizaron cultivos esporulados, y que la concentración de biomasa y el porcentaje de esporas al final

del proceso no variaron. Este resultado puede considerarse importante, ya que la disminución del tiempo en los procesos de fermentación se traduce en incrementos en la eficiencia, con el consiguiente ahorro en los costos de producción [Bernhad y Utz, 1993; Devissety, 1993].

Tabla 4. Resultados de las corridas de la cepa LBT-3 en el fermentador de 100 L

Inóculo	Tiempo (h)	Porcentaje de esporas	Concentración de esporas y cristales por mililitro
8 h (10%)	24	97	$2,3 \times 10^9$
8 h (10%)	23	98	$3,2 \times 10^9$
8 h (10%)	24	100	$3,2 \times 10^9$
Esporas (1%)	29	96	$2,9 \times 10^9$
Esporas (1%)	32	98	$3,0 \times 10^9$
Esporas (1%)	32	100	$3,1 \times 10^9$
Esporas (1%)	30	96	$2,8 \times 10^9$

Tabla 5. Análisis estadístico (prueba de Tukey HSD) para las corridas con la cepa LBT-3 en el fermentador de 100 L

Inóculo	Tiempo (h)	Porcentaje de esporas	Concentración de esporas y cristales por mililitro
8 h (10%)	23,66667 b	No significativo	No significativo
Esporas	30,75000 a	No significativo	No significativo

En la primera variante ensayada con la cepa LBT-13 en el fermentador de 100 L se utilizó el medio M4 en el cual se produjo, desde el inicio del proceso, una gran cantidad de espuma que dificultó incluso la agitación. La adición de aceite vegetal y glanapón en proporción 1:1 como antiespumante, a una concentración de 1 mL por litro de medio al inicio del proceso no logró disminuir la espuma. De la misma forma posteriores adiciones hasta alcanzar 50 mL por litro no permitieron la reducción de la espuma a niveles compatibles con el proceso, ya que posteriormente se comprobó en ensayos de zaranda que esta concentración de antiespumante disminuye el rendimiento de esporas y cristales entre el 20 y el 40%. Se conoce que la espuma que se produce durante los procesos de fermentación pueden comprometer la eficiencia y calidad de las producciones y productos de *Bt* y otros microorganismos [Moraes *et al.*, 1980; Vanderkar y Dulmage, 1982; Bernhard y Utz, 1993]. Por otra parte,

un exceso de antiespumante puede ser causante de una limitación en la transferencia de oxígeno, lo que para los microorganismos que demandan grandes cantidades de este elemento, como es el caso de la cepa LBT-13, puede resultar inhibitorio [Mancy y Okun, 1963; Foda *et al.*, 1985; Andrade, 1990; Cejas *et al.*, 1995; Farrera *et al.*, 1998]. Se considera, además, que la presencia de aceites antiespumantes en exceso pueden dificultar los procesos de recobrado y secado para la obtención de formulaciones en polvo [Prijanova, 1990; Devissety, 1993].

Al no diferir significativamente los resultados en zaranda con el medio M11 del M4 para esta cepa, se utilizó el M11 para los ensayos en fermentadores.

Con relación al inóculo, durante el ajuste de los parámetros al nivel de zaranda se determinó que los cultivos en fase logarítmica resultaron los mejores para esta cepa, al igual que para la LBT-3; sin embargo, se

tuvo en cuenta que por las características de las plantas de bioplaguicidas no resulta posible emplear esta variante, ya que se necesitan volúmenes de inóculo de 50 L (10%) para inocular los fermentadores de 500 L, y las plantas de bioplaguicidas no cuentan con equipos de esa capacidad de fermentación, por lo que se ensayó solamente la variante de cultivos esporulados al 1% obtenidos sobre agar nutriente en frascos Roux, y ajustados a una concentración inicial de 10^6 esporas/mL. Se tuvo en cuenta también que con esta variante se habían cosechado buenos resultados cuando se realizaron los ensayos en los experimentos a nivel de zafra con esta cepa.

Los resultados en la escala de 5, 30 y 100 L (Tablas 6 y 7) permitieron corroborar el comportamiento del cultivo durante el proceso, y se alcanzaron concentraciones finales significativamente diferentes en los tres fermentadores, debido a que el régimen de agitación-aireación no fue posible variarlo en los diferentes equipos, los cuales presentan características diferentes para

la transferencia de oxígeno [Ramírez *et al.*, 1998]; no obstante, en el fermentador de 100 L, en el cual se empleó un V_{vm} de aire y menor número de rpm, se obtuvieron las concentraciones promedios más elevadas, lo que corrobora la importancia de la aireación en estos procesos, tal como se demostró con la cepa LBT-3. Con el fermentador de 30 L resulta evidentemente necesario incrementar la aireación para lograr un aumento en los rendimientos de esporas y cristales al final del proceso, tal como encontraron Ramírez *et al.* (1998) para la cepa de *Bt* LBT-26.

Con relación al tiempo del proceso en el equipo de 5 L, el final de la corrida se alcanzó a las 19,6 h, lo que explica la baja concentración de biomasa, ya que ocurren menos multiplicaciones por un acortamiento de la fase logarítmica de crecimiento. La mayor concentración obtenida en el fermentador de 100 L se corresponde con un tiempo más prolongado para alcanzar el final del proceso, que en todos los casos se definió cuando el porcentaje de esporas y cristales fue superior a 90.

Tabla 6. Resultados de las corridas con la cepa LBT-13 en 5, 30 y 100 L

Fermentador	V_{vm}/rpm	Tiempo (h)	Concentración (esporas/mL)
5 L	0,8/400	20	$2,1 \times 10^9$
5 L	0,8/400	19	$2,5 \times 10^9$
5 L	0,8/400	18	$1,6 \times 10^9$
5 L	0,8/400	22	$2,0 \times 10^9$
5 L	0,8/400	20	$0,9 \times 10^9$
5 L	0,8/400	16	$1,9 \times 10^9$
X media		19,6	$1,74 \times 10^9$
EE		1,86	0,14
30 L	0,8/400	30	$1,2 \times 10^9$
30 L	0,8/400	26	$0,96 \times 10^9$
30 L	0,8/400	25	$0,76 \times 10^9$
X media		27	$0,87 \times 10^9$
EE		2,16	0,8
100 L	1/300	31	$2,7 \times 10^9$
100 L	1/300	34	$2,93 \times 10^9$
100 L	1/300	32	$2,6 \times 10^9$
X media		32,3	$2,7 \times 10^9$
EE		1,24	0,02

Tabla 7. Comparación de los resultados en los tres equipos fermentadores con la cepa LBT-13

Fermentador	Tiempo del proceso (X media) (h)	Concentración de esporas y cristales por mililitro (X media)
5 L	19,6 c	$1,74 \times 10^9$ b
30 L	27,0 b	$0,87 \times 10^9$ c
100 L	32,3 a	$2,7 \times 10^9$ a
EE	10,6	2,48
CV (%)	22	6,7

Posteriormente estos resultados fueron comprobados durante tres fermentaciones realizadas en la planta de producción de Güira de Melena, en fermentadores de 500 L de capacidad efectiva, donde los resultados fueron similares a los obtenidos con el fermentador de 100 L (Tabla 8), aun cuando el régimen de aireación y agitación fue de 300 L/h (0,6 Vvm) y 80 rpm, que teóricamente se encuentra por debajo de los valores utilizados con el equipo de 100 L. Esto se explica porque a medida que se incrementa la escala de trabajo, la agitación puede disminuirse sin afectar la transferencia de oxígeno a causa de las propias características reológicas de los fermentadores, los cuales se diseñan precisamente para que respondan a regímenes de trabajo menos intensos y que permitan una utilización más racional de la energía cuando se aumentan los volúmenes de trabajo [Pirijanova, 1990; Mahar, 1993; Olshue, 1996].

En la Tabla 8 se muestran las características del desarrollo de la bacteria bajo las condiciones experimentales del fermentador de 100 y 500 L, en la cual se aprecia que a partir de las ocho horas ocurre la multiplicación acelerada (fase de crecimiento logarítmico) de esta cepa, y estas características se mantienen hasta las 16-18 h, lo que demuestra un comportamiento acorde con el tiempo de duplicación de una 1 h y 41 min encontrado para esta cepa durante el cultivo en zaranda. A partir de las 20-22 h se aprecia la formación de endosporas, las que alcanzan una concentración de $9,5 \times 10^8$ endosporas/mL. A partir de las 26 h comienza a observarse la lisis del esporangio y la liberación de los cristales insecticidas de forma bipiramidal y cuadrada, característicos de la cepa LBT-13, lo que coincide con un pH final cercano a la neutralidad. El final del proceso se llevó hasta las 28-32 h, cuando se alcanzan concentraciones de $1-3 \times 10^9$ esporas y cristales/mL, lo que concuerda con los resultados al nivel de zaranda.

Esta concentración y el tiempo del proceso corrobora además lo reportado por varios autores, quienes consideran que la producción de esporas y cristales de *Bt* ocurre en un tiempo máximo entre 24 y 32 h, y que cuando se alcanzan títulos de 2 a 6×10^9 y un porcentaje de esporas superior a 90, puede considerarse que es un proceso eficiente [Vanderkar y Dulmage, 1982; Devisetty, 1993; Bernhard y Utz, 1993; Agaisse, y Lereclus, 1995; Galán, 1996; Yang, y Shaw, 1998].

Debe destacarse que el régimen de aire utilizado fue máximo para este equipo, tal como lo demanda esta cepa, y aunque en las dos últimas horas se disminuyó el flujo de aire a 150 L/h para favorecer la lisis del esporangio y la liberación de las esporas y cristales, esto no influyó en el título final obtenido.

La cinética del pH se mantuvo con características similares a lo reportado para otras cepas de esta especie [Vanderkar y Dulmage, 1982; Fernández-Larrea y Díaz 1990; Bernhard y Utz, 1993; Fernández-Larrea *et al.*, 1999; Medrano y Galán, 1996; Morris *et al.*, 1995; Yang y Shaw, 2000], y aunque pueden existir diferencias según la composición del medio de cultivo, cuando ellos se encuentran bien balanceados en la composición de nutrientes los perfiles de pH se comportan de forma similar al obtenido en estos experimentos.

Con relación a la actividad biológica de las dos cepas estudiadas, se encontró que con suspensiones de 10^8 esporas y cristales/mL, obtenidas de los caldos fermentados y recobrados de la cepa LBT-13, se obtuvieron valores de mortalidad en *Tetranychus tumidus* del 85% a los siete días de iniciado el ensayo, lo cual indica que durante el proceso de producción de esta cepa bajo las condiciones ensayadas no se afectó su actividad biológica. De igual forma los caldos recobrados de la cepa LBT-3 produjeron inhibición en la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* entre el 80 y el 90%.

Tabla 8. Características generales del proceso de fermentación de la cepa LBT-13 en fermentador de 100 y 500 L

Muestra (h)	Características del cultivo	pH	Concentración de esporas y cristales por mililitro
0	Esterilidad	6,8-7,2	Inóculo inicial $2-5 \times 10^6$
8	Células de forma bacilar cortas en parejas y sueltas	6,4-6,7	–
12-14	Bacilos cortos lig. gruesos y sueltos	6,0-6,5	–
16-18	Bacilos con citoplasma heterogéneo, comienza formación de esporas. Suelos	6,6-6,9	$4-6 \times 10^8$
20-22	Endosporas mejor definidas. Se observa formación del cristal parasporal	6,8-7,1	$6-7,5 \times 10^8$
24-26	Endosporas y esporas y cristales libres	6,8-7,1	$7,5-9,5 \times 10^8$
26-32	Esporas y cristales libres mayor del 90%	6,8-7,2	$1,5-3 \times 10^9$

CONCLUSIONES

- El uso de inóculos en fase logarítmica al 10% v/v disminuyó los tiempos del proceso para la cepa LBT-3 en los fermentadores de 30 y 100 L, y no influyó en el porcentaje de esporas ni en la concentración final del proceso.
- Un régimen de agitación-aireación de 300 rpm/1vvm incrementó significativamente la concentración de esporas y cristales con la cepa LBT-3 en el fermentador de 30 L.
- Con la cepa LBT-13 se cosecharon buenos resultados en el rendimiento y calidad de la biomasa con el medio M1 en un fermentador de 100 L y con un régimen de agitación-aireación de 300 rpm/1vvm.
- En el proceso de fermentación en el fermentador de 100 L y 500 L con la cepa LBT-13 en el medio MO se obtuvieron concentraciones de $1,5-3 \times 10^9$ esporas y cristales/mL, con más del 90% de esporas y en un tiempo entre 26-32 h.
- Los caldos obtenidos del proceso de fermentación de las cepas LBT-3 y LBT-13 mantuvieron la actividad biológica contra *M. incognita* y *T. tumidus* respectivamente.

REFERENCIAS

- Agaisse, H.; D. Lereclus: «How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?», *J. Bacteriol* 177:6027-6032, EE.UU., 1995.
- Aiba, S.; A. Humphrey; W. Willys: *Aeration and Agitation in Biochemical Engineering*, 2nd Edition, Univ. Tokyo Press, Japón, 1973, pp. 163-186.
- Almaguel, L.; N. González; O. Fernández-Larrea; E. Massó; B. Roselló; M. E. Márquez: «Utilización de *B. thuringiensis* LBT-13 en programas de lucha contra ácaros en cítricos, plátano y papa», informe final de proyecto, Inisav, La Habana, 1993.
- Alves, F. I.; S. B. Alves; P. M. Pereira; D. M. F. Capalbo: «Production of *B. thuringiensis* Berl. var. *kurstaki* Growth in Alternative Media», *Biocontrol Science and Technology* 7:377-383, EE.UU., 1997.
- Andrade, M. H.: «Estudios de aireación y agitación en fermentación con *B. thuringiensis*», Tesis en opción al título de Máster en Ciencias, Univ. Campinas. São Paulo, Brasil, 1990.
- Bai, C.; V. Brady: «Fermentation of a New *Bacillus thuringiensis* Strain», *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:50-55, Canadá, 2001.
- Balabaram, K.; M. C. Bhatia; S. Hotei: «Pilot Scale Production and Evaluation of *B. thuringiensis* H 14», *Indian Journal Med. Research* 83:462-465, 1996.
- Bernhard, K.; R. Utz: *Production of B. thuringiensis Insecticides for Experimental and Commercial Uses in B. thuringiensis an Enviromental Biopesticides. Theory and Practice*, John Wiley and Sons New York, EE.UU., 1993, pp. 255-267.
- Blalkebrough, N.; M. Moreis: «Scale up of Whey Fermentation in a Pilot-Scale Fermenter», *Eur. Journal Applied Microbiol. Biotechnology* 12:172-178, EE.UU., 1981.
- Cejas, A.; O. Fernández-Larrea; A. Díaz: «Criterio de los requerimientos de oxígeno para el escalado de la reproducción de cepas de *B. thuringiensis* en Cuba», Resúmenes del III Encuentro Nacional Científico-Técnico de Bioplaguicidas, La Habana, 1995, p. 29.
- CIBA-Geigy: Memorias del curso de instrucción «Cómo calcular los efectos del tratamiento. Planificación y evaluación de ensayos», Suiza, 1978, p. 15.
- De Barjac, M.; E. Frachon: «Classification of *B. thuringiensis* Strains», *Entomophaga* 35:233-240, EE.UU. 1990.
- Devisetty, B. N.: «Production and Formulation Aspects of *B. thuringiensis*», Proceeding of the 2nd Canberra Meeting, Inglaterra, 1993, pp. 253-265.
- Dharmisthidi, S. C.; C. Pentuwatana; N. Bhunuratana: «Production of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Using by Products», *J. Inv. Pathology* 15:232-239, EE.UU., 1985.
- Díaz, A.; M. E. Márquez; O. Fernández-Larrea: «Influencia de la composición del medio de cultivo en la producción por cultivo sumergido de diferentes cepas de *B. thuringiensis*», IV Encuentro Científico-Técnico de Bioplaguicidas, La Habana, 1996, p. 27.
- Dulmage, H. T.: «Insecticidal Activity of Isolates of *Bt* and Their Potential for Pest Control», *Microbial Control of Insects and Mites*, Academic Press, Londres y Nueva York, 1981
- Farrera, R. R.; F. Pérez; M. de la Torre: «Carbon:Nitrogen Ratio Interacts with Initial Concentration of Total Solids of Insecticidal Crystal Protein and Spore Production in *Bacillus thuringiensis* HD-73», *Appl Microbiol Biotechnol.* 49:758-765, EE.UU., 1998.
- Federeci, B. A.; D. Wu: «Synergism of Insecticidal Activity in *Bacillus thuringiensis*», Proceedings of the Canberra Meeting on *Bacillus thuringiensis*, CSIRO, Australia, 1994, pp. 3-5, 23-29.
- Fernández-Larrea, O.; A. Díaz: «Influencia del pH en el cultivo de *Bacillus thuringiensis*», *Rev. Prot de Plantas* 3(4):93-98, La Habana, 1990.
- Fernández-Larrea, O.; A. Díaz; R. Calderón; R. Santiesteban: «Thurisav, biopesticida de *B. thuringiensis* para el control de plagas agrícolas», Forum Nacional de Ciencia y Técnica, La Habana, dic. 1994 (Informe fondos Inisav, 1995).
- Fernández-Larrea, O.; A. Díaz; E. Laguardia; A. Calderón: «Obtención de un biopreparado fluido de *Bacillus thuringiensis*», *Fitosanidad* 1 (4):60-63, La Habana, 1999.
- Foda M. S.; H. S. Salama: «New Fermentation Technologies for the Production of Bacterial Insecticides», *Zbl. Microbiol.*, 141:151-157, URSS, 1985.
- Galán, J. L.; S. S. García; M. E. Santos; I. Quintero: *Producción de B. thuringiensis en avances recientes en la biotecnología de Bacillus thuringiensis*, Ed. Ciencia Universitaria, Universidad de Nuevo León, Monterrey, México, 1996, pp. 139-155.
- Ibarra, J.: «Producción, control de calidad y uso de *Bacillus thuringiensis*», Memorias del II Curso-Taller de Producción Nacional de Agentes de Control Microbiano, Tecoman, Colima, México, 9 de nov., 1997, pp. 86-96.
- Lysanky, S. G.: «The Market of Biopesticides in Opportunities for Molecular Biology in Crop Production», Proceeding of International Symposium, Cambridge, 27-29 Sep. 1993, Monograph 55, 1993.
- Mahar, J. T.: «Scale up and Validation of Fermentation and Centrifugation Process», *Part Scale Up Pharmaceutical Technology* 17:84-96, EE.UU., 1993.
- Mancy, K. H.; D. A. Okun: «Effect of Surface Active Agents on the Rate of Oxygen Transfer», *Adv. in Biol. Waste Treat.*, Pergamon, Oxford, 1963, p. 111.
- Medrano-Roldán, H.; A. Solís; C. Pérez: «Requerimientos de oxígeno por cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis*», II Congreso Nacional de Bioingeniería y Biotecnología, Durango, México, 1993, pp. 94-97.
- Medrano H.; W. J. Galán: «Bioingeniería y biotecnología de la producción de bioinsecticidas», *Avances recientes en la biotecnología de*

Influencia del medio de cultivo, el tipo...

- biopesticidas*, Univ. Cuernavaca, Nuevo León, Monterrey, México, 1996, pp. 116-135.
- Mena, J.; R. Vázquez; O. Fernández: «Development of New Nematicides from Two Bacteria», Resúmenes del II Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Agrícola Redbio 98, 1-5 de junio, La Habana, 1998, pp. 454-455.
- Miller, T. L.; B. W. Churchill: «Substrate for Large-Scale Fermentation», *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Am. Soc. Microbiol., Washington, 1986, pp. 122-135.
- Moraes, I. O.; M. H. Santana; C. O. Hokka: «The Influence of Oxygen Concentration on Microbial Pesticides Production», Proc. 8th Int. Forum Symp. Advances in Biotechnology, vol. 1, Londres, 1980, pp. 75-79.
- Morris, O. N.; V. Converse; P. Kanagaratman; J. S. Davies: «Effect of Cultural Conditions on Spores-Crystal Yield and Toxicity of *B.thuringiensis subsp aizawai* (HD133)», *J. Inv. Pathol.* 63:129-136, EE.UU., 1995.
- Oldshue, J.: «Fermentation Mixing Scale up Techniques», *Applied Bacteriol.* 65 (4):195-202, EE.UU., 1996.
- Pirijanova, A.: «Tecnologías de fermentación y producción de bioplaguicida», Inisav, La Habana, 1990.
- Ramírez, V.; E. Laguardia; R. Núñez: «Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{la}) en la cepa LBT-26 de *B. thuringiensis* bajo diferentes condiciones de aireación y agitación», Resúmenes del V Encuentro Científico-Técnico de Bioplaguicidas, La Habana, 1998.
- Vallejo, L. T.; S. Orduz: «Producción de un plaguicida a base de *B. thuringiensis subsp kurstaki* a nivel de laboratorio», *Revista Colombiana de Entomología* 22 (1):61-67, 1996.
- Vanderkar, M.; H. T. Dulmage: *Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H14*, UNDP/World Bank / WHO, Geneva. Suiza, 1982, pp. 95-197.
- Vetcht-Lifshiz, S. E.; M. Gadman; E. Zommer: «Process Optimization and Scale up of the *B. thuringiensis* Fermentation», *Israel Journal of Entomology* 23:239-246, 1989.
- Yang, X. M.; S. W. Shaw: «Development of *Bacillus thuringiensis* Fermentation and Process Control from a Practical Perspective», *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:95-98, EE.UU., 1998.
- : «Phase-Specific Optimization of Multiple Endotoxin-Protein Production with Genetically Engineered *Bacillus thuringiensis*», *Biotechnol. Appl. Biochem* 31:71-76, EE.UU., 2000.