

En el futuro de todos!

PRODUCCION POR TECNOLOGIA DE FERMENTACION DE BACILLUS THURINGIENSIS UTILIZANDO MEDIOS ALTERNATIVOS

Yaneth Amparo Muñoz Peñalosa
Ing. Qca. MsC. Profesor Auxiliar
Dpto. Ciencias del Medio Ambiente
U.F.P.S.

RESUMEN

En la producción por tecnología de Fermentación del *Bacillus Thuringiensis*, se estudiaron cinco medios alternativos. Los resultados del crecimiento celular, a nivel de trabajo de 100 ml en cultivo estático y temperatura de 28 °C, mostraron que el sustrato óptimo correspondió al medio en el cual se adicionó melaza y polvo de arroz (Medio alternativo N°1) El desarrollo celular utilizando 100 ml de sustrato fue estudiado con agitación recíproca 110 r.p.m.. de esta prueba se determinó filtrar el medio. La curva de crecimiento del inóculo, permitió fijar el tiempo de proceso en 6 horas.

Para el desarrollo de las fermentaciones, se contó con el equipo experimental, bioreactor en vidrio de dos litros de capacidad y los dispositivos para aireación, agitación mecánica, toma de muestra y salida de gases. La fermentación en la producción del *Bacillus thuringiensis* es del tipo discontinua, proceso aerobio y crecimiento sumergido. Teniendo en cuenta la información bibliográfica y los resultados previos del estudio, se determinaron los parámetros fijos de trabajo para realizar la producción por fermentación de *Bacillus thuringiensis*, siendo medio alternativo N°1, volumen 1 litro, temperatura 28°C y concentración celular del inóculo.

Para determinar los parámetros óptimos de la fermentación se utilizó un diseño factorial de experimentos del tipo 2², (dos variables a dos niveles), siendo aireación (3.2 - 0.5 VVM) y agitación (110- 210 r.p.m.). Se realizaron 7 fermentaciones, 4 del diseño y 3 al nivel medio de las variables. Para el monitoreo de la fermentación se tomó muestra cada 12 horas y se analizó concentración celular (Cámara de Neuvauer) y pH. Los resultados de la concentración celular para las fermentaciones medida a las 60 horas muestra que las condiciones óptimas de trabajo corresponden a los valores de la variable, aireación 3.2VVM y agitación 210 r.p.m. La variable significativa fue la aireación del pH en los medios de fermentación cambio de neutro a ácido y finalizó como básico. A las fermentaciones se les efectuó control de calidad microbiológico, coloración de gram, viabilidad y análisis para la concentración de azúcar fermentable inicial siendo de 9.8%. Se recomienda continuar el estudio con la caracterización del sustrato, instrumentación del bioreactor, control del pH en el proceso, el estudio cinético y realizar el escalado 1:10.

PALABRAS CLAVES: INOCULO, BIOREACTOR, DISEÑO FACTORIAL DE EXPERIMENTOS, ESCALADO.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de producir alimentos preservando el medio ambiente, cobra importancia en la actualidad.

La producción agrícola, afectada por diversos factores, siendo uno de ellos las numerosas plagas, se han combatido con el uso indiscriminado de agroquímicos, sin embargo, los residuos de dichos agentes químicos han afectado considerablemente los ecosistemas.

Hoy día existe una creciente presión social y legislativa orientada a prevenir o reducir los efectos tóxicos, riesgos ambientales y perjuicios sobre la salud asociados al uso de plaguicidas químicos.

El interés se centra en producir agentes biológicos fácilmente biodegradables.

La Biotecnología puede y debe integrarse en esta renovada tecnología de producción y protección de cultivos.

Es importante el conocimiento de agentes biológicos que en la naturaleza aparecen con ocasión al aumento de la cantidad de insectos perjudiciales regulando su población. Es así como una bacteria el *Bacillus thuringiensis* fue aislada en 1909 de unas larvas de la polilla de la harina y se

emplea actualmente como uno de los principales microorganismos para el control biológico de insectos plagas (90% de todos los productos biológicos) a nivel mundial.

La obtención del *Bacillus thuringiensis* puede ser en cultivo líquido estático o en cultivo sumergido por tecnología de fermentación.

Es de interés en el presente estudio desarrollar el procedimiento de cultivo sumergido bajo condiciones óptimas a nivel laboratorio como una primera etapa en la producción por fermentación de *Bacillus thuringiensis*.

MATERIALES Y METODOS

El estudio fue realizado en el Lab. De Biotecnología de la U.F.P.S. El microorganismo utilizado fue el *Bacillus thuringiensis* cepas 24 y 26. El sustrato se determinó a partir de cinco medios alternativos véase Tabla N°1, en cultivo estático. El inóculo se trabajó con agitación recíproca. Las fermentaciones se desarrollaron en cultivo sumergido, con agitación mecánica y aireación y utilizando un recipiente tipo recinketler en sistema discontinuo. Se utilizó el diseño experimental (factorial 2 exponente 2) para el estudio de parámetros. Se aplicó análisis de

medida celular (Cámara de Neuvauer), concentración de azúcar, pH en las fermentaciones y evaluación cualitativa de viabilidad para el biocatalizador.

MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO 3	MEDIO 4	MEDIO 5
CaCO ₃ , 0.3 gr/l	Almidón: 5gr/lt	CaCO ₃ , 0.3 gr/l	CaCO ₃ , 0.3 gr/l	Almidón: 5 gr/lt
Polvo de arroz: 2 gr/lt	Extracto harina de maiz: 100 ml/lt	Levadura torula: 5 gr/lt	Levadura: 5 gr/lt	Extracto de harina de maiz: 100 ml/lt
Melaza: 1 gr/lt		Extracto de harina de soya: 10 gr/lt	Jarabe de Maiz de alta maltosa: 1 gr/l	Jarabe de maiz de alta maltosa 1 gr/lt
Levadura: 5 gr/lt		Almidón: 5 gr/lt	Polvo de arroz: 2 gr/lt	Levadura: 5 gr/lt

TABLA 1. Medios Alternativos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas 24 y 26 del *Bacillus thuringiensis* fueron sembradas en los medios 1, 2 y 3 en cultivo líquido estático volumen de 100 ml.

Según los resultados del crecimiento celular mostrados en la Tabla 2, se determina que el crecimiento de la cepa 24 es mayor en un menor tiempo y que la cepa 26 aunque muestra un valor mayor en concentración en el día 11, el tiempo invertido es considerable, 5 días más, además su etapa de adaptación es mayor, por lo cual se selecciona la cepa 24.

tiempo de crecimiento días	CEPA 24						CEPA 26					
	MEDIO 1		MEDIO 2		MEDIO 3		MEDIO 1		MEDIO 2		MEDIO 3	
	Conc. M.O/ml 10 ⁶	PH	Conc. M.O/ml 10 ⁶	PH	Conc. M.O/ml 10 ⁶	PH	Conc. M.O/ml 10 ⁶	PH	Conc. M.O/ml 10 ⁶	PH	Conc. M.O/ml 10 ⁶	PH
0	27.5	6.0	39	6.5	78	6.0	44.8	6.5	10	6.0	50.7	6.5
3	89	7.5	142.5	6.0	91.5	6.0	168	6.0	8	6.4	155.5	7.5
6	333.5	8.5	29.5	5.5	218.5	6.0	178.5	6.8	3.5	6.0	225.5	7.5
11	341.5	8.0	49.5	6.0	175.5	7.0	406	7.0	16	6.0	261	8.0

Tabla N°2 Crecimiento de las cepas 24 y 26 del *Bacillus thuringiensis* en los medios de cultivo alternativo seleccionados.

El *Bacillus thuringiensis* (cepa 24) fue inoculado en los cinco medios alternativos y su crecimiento evaluado, véase tabla 3, siendo el medio N°1, el sustrato óptimo.

tiempo de crecimiento horas	Medios Alternativos				
	1	2	3	4	5
	Conc. M.O/ml 10^6	Conc. M.O/ml 10^6	Conc. M.O/ml 10^6	Conc. M.O/ml 10^6	Conc. M.O/ml 10^6
0	14.9	14.9	14.9	14.9	14.9
18	30.5	15	20	18	16
27	55.5	19	45	35.5	24.5
54	67.5	19	59.5	45.5	16.5
138	102.5	14	85.5	66.5	13.5

Tabla 3. Crecimiento del *Bacillus thuringiensis* cepa 24 en los medios de cultivo.

Para caracterizar el inóculo de trabajo, se realizó cultivo en erlenmeyers (4) con agitación 110 r.p.m, volumen de trabajo 100 ml, temperatura 28°C y replica en cultivo estático. Del procedimiento desarrollado se determinó filtrar el sustrato.

Para determinar la curva de crecimiento a nivel del inóculo, se preparan 100 ml del medio N1 se filtra y se pasan a erlenmeyers de 250 ml y se esteriliza a 15 lbs de presión por 40 minutos. Se procede a sembrar en área estéril, de la replica N.3 (Medio líquido estático) 5 ml al medio preparado (inóculo). Se coloca en crecimiento con agitación (110 r.p.m) y 28 C. Se toman muestras cada dos horas. El comportamiento del crecimiento celular en el inóculo se muestra en la Tabla N.4 en la cual se observa el crecimiento exponencial a partir de las 5 horas, con lo cual se fija el tiempo de proceso para el inóculo, 6 horas y la variable concentración inicial de microorganismo para las fermentaciones.

Tiempo h	Conc. (M.O/ml) x 10^6	PH
0	2.85	7
2	4.55	7
4	15.85	6
6	72	6
8	90	8
22	92.5	9

Tabla 4. Datos de concentración celular y pH en el proceso de inóculo. Medio N.1 Volumen 100 ml. Agitación recíproca 100 r.p.m. Temperatura 28 C.

Para realizar las fermentaciones a nivel de laboratorio, se utilizó un recipiente tipo recinketer, capacidad de trabajo 1 o 2 litros con sus respectiva tapa de vidrio. La tapa cuenta con cuatro entradas, en las cuales se pueden adaptar para entrada de gases (bomba de aireación, filtro), salida de gases, toma muestra y agitación mecánica (eje, impulsor y motor eléctrico), como se muestra en la figura 2.

La fermentación para la producción de *Bacillus thuringiensis* presenta las siguientes características: tipo batch (discontinuo), estado líquido, aerobia, y cultivo sumergido, volumen de trabajo 1 litro, temperatura 28°C.

Teniendo en cuenta la información precedente sobre la producción de *Bacillus thuringiensis*, se seleccionaron los parámetros fijos de trabajo y sus valores.

Para obtener las condiciones óptimas de la fermentación se seleccionó el diseño experimental 2^2 en el cual dos variables adquieren valores máximo y mínimo y se realizan 3 experiencias de control a nivel medio de las variables.

Los parámetros fijos son: volumen de trabajo (1 litro), temperatura 28°C (cuarto temperatura controlada),

muestra inicial y se continuó con muestra aproximadamente cada 12 horas, realizando conteo microbiológico (Cámara de Neuvauer) y pH. Finalizada la fermentación se preserva y es guardada bajo refrigeración.

Otras pruebas de control de calidad fueron:

- Concentración inicial de azúcar en el medio de cultivo.
- Coloración de Gram.
- Prueba cualitativa de viabilidad.

En la caracterización preliminar del medio de cultivo N°1, se determinó una concentración inicial de azúcar reductor expresado como glucosa de 0.52%, 10.3% azúcar total (reductor + invertido) y 9.82% azúcar fermentable.

Una prueba de control y observación de microorganismos (Coloración de Gram), se observa en la figura 3.

En la prueba cualitativa de viabilidad se observó buen desarrollo celular, libre de contaminación.

Según el diseño experimental se realizaron 4 fermentaciones y 3 experimentos de control. Los resultados se muestran en la Tabla N°7 y en las Figuras 4 y 5.

Experimento	CONCENTRACION CELULAR (MO/ml) x 10 ⁶						
	Tiempo (h)						
	0	15	24	36	48	60	72
1	3.65	*	15	22	28.33	58	102.5
2	5.35	10	23	64.5	82.5	120	141
3	5.36	21.0	32.5	69	*	94	123.6
4	3.6	*	36	111.5	*	162	175
5	3.6	*	30	68	100	122	156
6	6.05	15	35	81	110	131	158
7	6.5	20	42	86	115	125	163

Tabla 7. Resultado del crecimiento del Bacillus thuringiensis en las fermentaciones.

* Datos no tomados debido a causas ajenas al desarrollo del proyecto.

La variable de respuesta es la concentración celular y definida a la 60 horas, la cual se presenta en la Tabla 8. Se selecciona las 60 horas debido a que en este período ya se obtiene una fase estacionaria analizando el experimento N°4. Los resultados

muestran que la fermentación óptima corresponde al experimento N°4, el cual presenta la mayor concentración celular a las 60 horas, que corresponde al experimento con los valores máximos de las variables aireación (3.2 VVM) y agitación (210 r.p.m.).

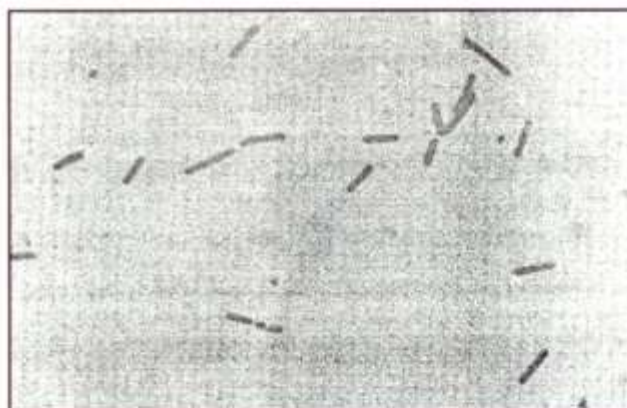


Figura 3. Fotomicrografías de Bacillus thuringiensis. Coloración de Gram.

Experimento	X ₁	X ₂	Y
1	-1	-1	58
2	+1	-1	120
3	-1	+1	94
4	+1	+1	162
5	0	0	122
6	0	0	131
7	0	0	125

Tabla 8. Matriz de diseño y respuestas obtenidas para la fermentación discontinua a las 60 horas de proceso.

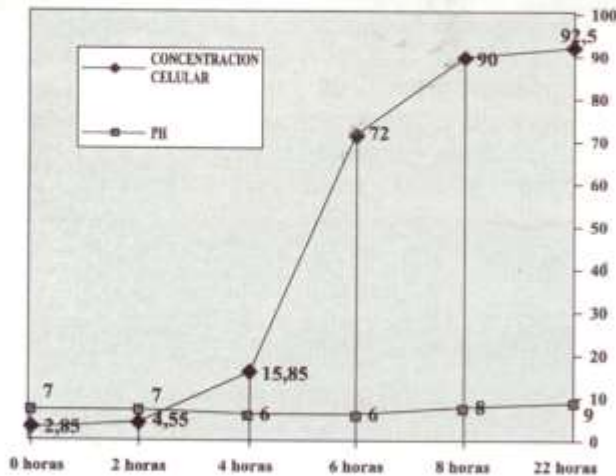


Figura 1. Curva de crecimiento del *Bacillus thuringiensis* a nivel de inóculo.

concentración inicial de inóculo (volumen 50 ml). La variables de estudio son: aireación (3.2 VVM y 0.5 VVM) y agitación (210 r.p.m y 110 r.p.m), ver Tabla 5.

Condición	Parámetro	Valor
Fija	Volumen de Trabajo (lt)	1
	Temperatura °C	28
Variables Independientes	Aireación VVM	Niveles Bajo Medio Alto 0.5 1.9 3.2
	Agitación r.p.m.	110 160 210

Tabla 5 Parámetros de Trabajo.

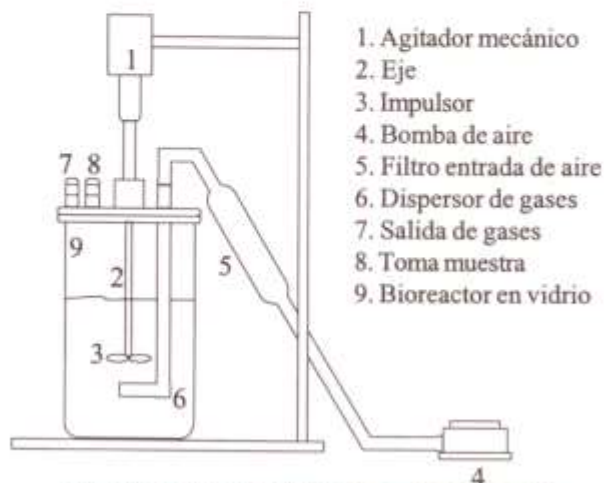


Figura 2. Montaje del Equipo experimental.

VVM: Flujo de aire/ Volumen de trabajo. Litros aire/min / litros del medio.

La matriz de diseño y cada una de las variables independientes se muestran en la tabla 6.

Experimento No	X ₁	VVM	X ₂	r.p.m
1	-	0.5	-	110
2	+	3.2	-	110
3	-	0.5	+	210
4	+	3.2	+	210
5	0	1.9	0	160
6	0	1.9	0	160
7	0	1.9	0	160

Tabla 6 matriz de diseño para la fermentación en la producción de *Bacillus thuringiensis*.

Para obtener el inóculo se procedió en forma similar al realizado en la obtención de la curva de crecimiento, dejando 6 horas de procesos, para todas las fermentaciones.

Antes de realizar las fermentaciones según el diseño experimental, se ejecutaron unas pruebas preliminares en el bioreactor con el fin de verificar el funcionamiento del mismo con relación a la agitación mecánica y la esterilidad de la fermentación. Posteriormente se realizaron las fermentaciones de manera aleatoria.

El sustrato se preparó según la composición del medio N°1 para el volumen de trabajo de 1 litro, se filtro y esterilizó en autoclave por 40 minutos a 15 lbs de presión. El fermentador fue montado con todos los dispositivos y esterilizado en horno (calor seco).

La fermentación se realizó en el cuarto del trabajo (temperatura controlada 28°C), el cual ya había sido esterilizado. Se realizó la inoculación del medio de fermentación (50 ml - 6 horas de proceso) y se llevo a cabo el montaje del bioreactor. Se tomó



RESPUESTAS

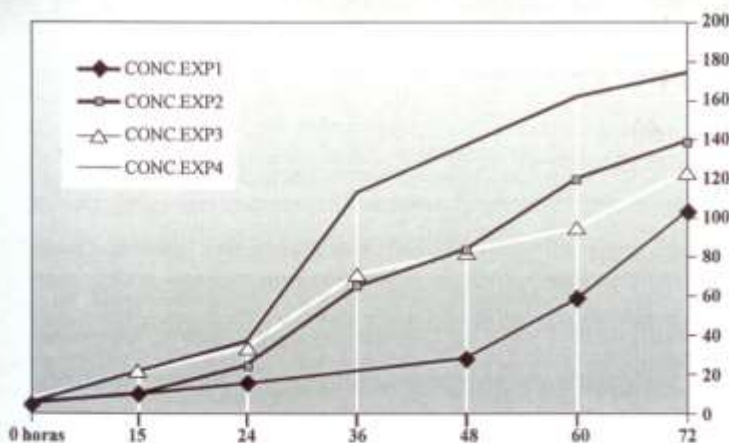


Figura 4. Desarrollo celular del Bacillus thuringiensis en las fermentaciones del diseño experimental.

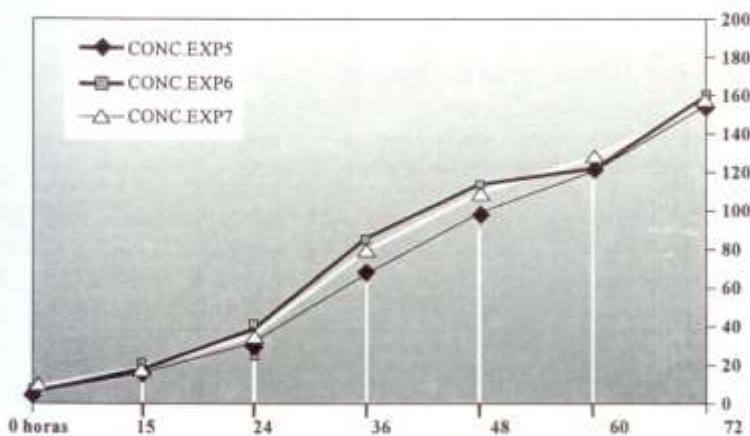


Figura 5. Desarrollo celular del Bacillus thuringiensis en las fermentaciones al nivel medio de la variable del diseño experimental.

Para el análisis de los resultados se determina la magnitud de los efectos véase Tabla 9.

Experimento	x_1	x_2	$x_1 x_2$	y Conc. Celular (M.O/ml) $\times 10^6$
1	-	-	+	58
2	+	-	-	120
3	-	+	-	94
4	+	+	+	162
$\Sigma+$	282	256	220	
$\Sigma-$	179	178	214	
$\frac{\Sigma+ - \Sigma-}{4}$	25.75×10^6	19.5×10^6	1.5×10^6	

Tabla 9. La tabla de signos para calcular la magnitud de los efectos.

Para el análisis del error experimental se determina:

Rango de experimentación
 $= (131 - 122) \times 10^6 = 9 \times 10^6$

Desviación estándar
 $s = 0.591 \times 9 \times 10^6 = 5.319 \times 10^6$

Varianza $S_i^2 = 4 (s)^2 / 1 \times 2^2$
 $= 28.292 \times 10^{12}$

Grados de libertad: $3 - 1 = 2$
 Porcentaje de probabilidad 95%

Región de aceptación hipótesis nula: $t_{.0025, 2} = 4.303$

$- 5.31 \times 10^6 \times 4.303$
 $< L < +5.31 \times 10^6 \times 4.303$
 $- 22.84 \times 10^6 < L < + 22.84 \times 10^6$

El efecto significativo según el rango de la hipótesis nula es $X_1 (25.75 \times 10^6)$. De acuerdo a las condiciones establecidas para el estudio y los resultados señalados, se determina que el parámetro significativo en la producción de bacillus thuringiensis es la aireación.

El pH en las fermentaciones mostró el siguiente comportamiento inicialmente es neutro (pH 7.0), en un período intermedio es ácido (pH 6.0), posteriormente cambia a básico pasando por pH 8.0 hasta alcanzar pH 9.0 El cambio de pH se presenta por la producción de metabolitos propios de la fermentación, que pueden afectar la composición del medio, la membrana celular entre otros, influyendo en la velocidad de crecimiento celular, por lo cual es importante mantener el pH en un valor o rango óptimo. El carbonato de calcio se adicionó en el medio con la finalidad de mantener valor del pH, sin embargo no logró dicho efecto.

CONCLUSIONES

Cinco medio alternativos fueron empleados en el crecimiento del *Bacillus thuringiensis* y el óptimo fue el medio con melaza.

La cepa 24 presentó el mayor crecimiento con un menor tiempo de proceso, en el medio con melaza.

El medio de cultivo con melaza, fue analizado encontrándose un 0.52% de azúcar reductor y 9.82% azúcar fermentable.

El *Bacillus thuringiensis* según sus características fisiológicas es una bacteria capaz de utilizar azúcares complejos.

El tiempo adecuado para el proceso del inóculo fue de 6 horas. Se observó en el desarrollo del *Bacillus thuringiensis*, su división celular y esporulación.

Para optimizar las fermentaciones se escogió un diseño factorial 2^2 (2 variables a dos niveles). Las variables seleccionadas y sus rangos fueron los siguientes:

- Aireación (0.5 - 3.2 vvm).
- Agitación (110-210 r.p.m.).

Las condiciones fijas de trabajo fueron:

- Volumen de trabajo 1 litro.
- Temperatura: 28 °C.
- Volumen y concentración de inóculo.

El equipo utilizado presenta un manejo básico de parámetros y aceptables condiciones de esterilidad.

De las concentraciones celulares en la fermentación, se obtienen las

condiciones óptimas de trabajo, las cuales son: 3 VVM y 210 r.p.m., para un tiempo de 60 horas.

De las condiciones establecidas para el estudio y el análisis de los resultados del diseño experimental, se determinó que el efecto significativo para el proceso de producción por fermentación de *Bacillus thuringiensis*, es la aireación.

La tendencia en la variación del pH en los medios de fermentación fue inicialmente neutro cambiando ácido y finalmente a básico.

El equipo de trabajo para las fermentaciones es de tipo versátil y puede ser utilizado en docencia, investigación y extensión.

RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización química del medio alternativo que contiene melaza.
- Estudiar el producto del metabolismo celular del *Bacillus Thuringiensis* y analizar su posible uso.
- Mejorar el equipo de trabajo utilizado. Diseñar y construir la tapa metálica, soporte y dispositivo en metal (sello mecánico, aireación, toma de muestra, etc.), ampliar servicios de medidas y control de parámetros.
- Estudiar el control del pH en el proceso de producción por fermentación de *Bacillus thuringiensis*.
- Estudiar la cinética de la fermentación en la producción del *Bacillus Thuringiensis*. Realizar el escalado 1:10 para la producción de *Bacillus Thuringiensis* con el fin consolidar el desarrollo técnico y la viabilidad económica del Bioproceso.
- Se debe continuar con el apoyo de las investigaciones (financiamiento FRIE - U.F.P.S.) que repercuten el desarrollo de la investigación, extensión y docencia (Departamento Ciencias del Medio Ambiente - Plan de Estudios Ingeniería Producción Biotecnológica) y por ende de la Universidad Francisco de Paula Santander.

BIBLIOGRAFIA

- ATKINSON, B. Reactores Bioquímicos Reverté Barcelona 1986.
- BROCK, Tomas D. Microbiología Prentice Hall. Sexta Edición. Méjico 1993.
- CRUEGER, Wulf. Manual de Microbiología Industrial, Acribia Zaragoza (España) 1993.
- DUARTE, Alberto. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá (Colombia) 1995.
- JAGNOW, Gerhard y Wolfgang Dawid. Biotecnología. Introducción con experimentos modelo. Acribia Zaragoza (España). 1991.
- MUÑOZ, Yaneth PARADA, Margarita y otros. Tecnología de la producción masiva en fase laboratorio y campo del microorganismo *Bacillus thuringiensis* U.F.P.S. convenio U. Villas (Cuba) Cúcuta (Colombia) 1998.
- MUÑOZ, Yaneth. Producción de l(-) sorbosa a partir de D(-) sorbitol por fermentación aerobia U.I.S. Bucaramanga (Colombia) 1991.
- SAUCEDO, Orlando. Proyectos de investigaciones sobre producción masiva de *Bacillus thuringiensis* y el control de insectos plagas que inciden en las áreas experimentales de los Patios. U.F.P.S.- U VILLAS (CUBA) Cúcuta (Colombia). 1998.