



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN PARA LA
OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES A PARTIR
DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Autoras

Carolina Cecilia Pineda López
Sara Vélez Salas

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN PARA LA
OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES A PARTIR DE *BACILLUS*
THURINGIENSIS

Trabajo De Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología

Profesor Guía
MSc. María Alejandra Cruz Salazar

Autoras
Carolina Cecilia Pineda López
Sara Vélez Salas

Año
2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUIA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Optimización de las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*, a través de reuniones periódicas con las estudiantes Carolina Cecilia Pineda López y Sara Vélez Salas, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

María Alejandra Cruz
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
CI: 1719928572

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber revisado este trabajo, Optimización de las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*, de Carolina Cecilia Pineda López y Sara Vélez Salas, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

Mónica Cecilia Vaca Proaño
Magíster en Ingeniería de la Energía
CI: 1716631294

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Carolina Cecilia Pineda López
CI:1714134754

Sara Vélez Salas
CI: 1103581763

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la MSc. Alejandra Cruz y al Ing. Edgar Velastegui por ser nuestros guías y apoyo durante el desarrollo de nuestro trabajo y en el trayecto de la carrera.

A la Universidad de Las Américas por contribuir a nuestra formación profesional.

DEDICATORIA

A mis padres Carlos Pineda y Mireya López por brindarme su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos por aconsejarme y ser personas ejemplares.

Carolina Cecilia Pineda López

DEDICATORIA

A mi ángel Iván Vélez, mi madre Ma. Lorena Salas, mis hermanos Pedro y José, mi familia y mis amigos, por ustedes y para ustedes. Gracias por todo su cariño y apoyo incondicional.

Sara Vélez Salas

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram positiva caracterizada por la producción de proteínas con actividad insecticida, como las *Cry* a manera de cuerpos paraesporales cristalinos durante su fase de esporulación y otro tipo de proteínas en la fase vegetativa de su crecimiento. *Bt* y sus toxinas se han usado en la agricultura como alternativa biológica. Las principales características de estas toxinas son su alta especificidad e inocuidad para vertebrados y otros insectos benéficos. Si bien es cierto, existen estudios que evalúan algunas condiciones para el crecimiento y la producción de sus proteínas, los resultados obtenidos han demostrado una discrepancia de datos con relación a la producción de proteínas y no se han evaluado a la vez condiciones de operación y de cultivo para la obtención de un máximo rendimiento. De ahí la importancia de establecer un protocolo optimizado para la producción de gran cantidad de toxinas de carácter proteico a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. En este trabajo se realizaron dos diseños experimentales Plackett-Burman con el fin de evaluar las variables influyentes en la producción de proteínas de *Bt*. En el primer Plackett-Burman se obtuvieron 7 variables influyentes y en el segundo diseño, desarrollado con las mismas condiciones de las 7 variables, las concentraciones de CoCl_2 , FeSO_4 y la temperatura resultaron estadísticamente influyentes. Se efectuaron tres Diseños Centrales Compuestos (DCC rotacional 2^k) los cuales generaron tres superficies de respuesta que mostraron los valores óptimos para la producción de proteína. Mediante el modelo matemático generado por las superficies de respuesta se determinó que a una concentración de 30,83 mg/L de CoCl_2 , 1,37 mg/L de FeSO_4 y a una temperatura de 34,9 °C, la producción de proteína total calculada fue máxima y tomó un valor de 4,0 mg/mL. De manera experimental, al utilizar estas condiciones de cultivo y de operación, se obtuvieron concentraciones de proteína entre 3,6 y 4,5 mg/mL, lo que demuestra que tanto el modelo matemático como los valores obtenidos de manera experimental son una representación aproximada de la influencia de la concentración de CoCl_2 , FeSO_4 y la temperatura frente a la producción de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a Gram-positive bacterium characterized by the production of proteins with insecticidal activity, like Cry proteins in the form of crystalline parasporal bodies during its sporulation phase and other proteins in the vegetative phase of its growth. *Bt* and its toxins have been used in agriculture as a biological alternative against plague insects. The main characteristics of these toxins are their high specificity and innocuousness for vertebrates and other beneficial insects. While it is true that there are studies that evaluate some conditions for the growth of the microorganism and the production of its proteins, the results obtained have shown a discrepancy of data regarding the production of proteins and have not been evaluated at the same time operating and culture conditions to obtain maximum yield. Hence the importance of establishing an optimized protocol to produce large amounts of protein toxins from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. In this work, two experimental Plackett-Burman designs were carried out to evaluate the influential variables in the production of *Bt* proteins. In the first Plackett-Burman, 7 influential variables were obtained, and in the second design, developed under the same conditions, of the 7 variables, CoCl_2 and FeSO_4 concentrations and temperature were statistically influential. Three Compound Central Designs were made (rotational DCC 2^k) which generated three response surfaces showing the optimal values for protein production. The mathematical model generated by the response surfaces allowed to deduce that at a concentration of 30,83 mg/L of CoCl_2 , 1,37 mg/L of FeSO_4 and a temperature of 34,9 °C, the total protein production calculated was maximum and took a value of 4,0 mg/mL. Experimentally, using these culture and operating conditions, protein concentrations between 3,6 and 4,5 mg/mL were obtained, which shows that both, mathematical model and the values obtained experimentally, are an approximate representation of the influence of CoCl_2 , FeSO_4 and the temperature versus the production of total proteins from *Bacillus thuringiensis*.

Índice

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación de la investigación	5
2. Capítulo II. Marco teórico.....	6
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.1.1 Generalidades	6
2.1.1.1 Características microbiológicas.....	8
2.1.1.2 Características bioquímicas	9
2.1.2 Aplicaciones.....	10
2.1.2.1 Bioinsecticidas.....	10
2.1.2.2 Proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.1.2.3 Ventajas del uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus toxinas como bioinsecticida	15
2.1.3 Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
2.2 Optimización de medios de cultivo y condiciones de operación.....	17
2.2.1 Generalidades	17
2.2.2 Producción industrial.....	18
2.2.3 Nutrientes esenciales para el crecimiento de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i>	19
2.3 Diseño de experimentos en bioprocesos	21
2.3.1 Generalidades	21
2.3.2 Diseño experimental Plackett-Burman.....	21
2.3.3 Diseño Central Compuesto rotacional 2^k	22
3. Capítulo III. Diseño experimental	23

3.1	Diseño del plan experimental.....	23
3.2	Diseño experimental	24
3.2.1	Diseño Plackett-Burman	24
4.	Capítulo IV. Procedimientos.....	29
4.1	Población y muestra	29
4.2	Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	29
4.2.1	Materiales	29
4.2.2	Métodos	30
4.2.2.1	Activación y aislamiento de la bacteria.....	30
4.2.2.2	Preparación del inóculo inicial.....	30
4.2.2.3	Formulación del medio de cultivo	30
4.2.2.4	Curva de calibrado de biomasa.....	31
4.2.2.5	Determinación de biomasa.....	32
4.2.2.6	Curva de calibrado de proteínas totales	32
4.2.2.7	Obtención y cuantificación de proteínas totales	33
4.2.2.8	Verificaciones variables influyentes mediante Plackett-Burman	33
4.2.2.9	Desarrollo del Diseño Central Compuesto (DCC) rotacional 2 ^k	34
4.2.2.10	Producción de proteínas en Biorreactor (Validación y escalado en Biorreactor).....	35
4.3	Evaluación estadística de los resultados.....	35
5.	Capítulo V. Resultados y Discusión	36
5.1	Caracterización e identificación del microorganismo.....	36
5.1.1	Pruebas bioquímicas	36
5.2	Curvas de calibrado	40
5.2.1	Curva de calibrado de <i>Bacillus thuringiensis var kurstaki</i>	40
5.2.2	Curva de calibrado de proteína total	40
5.3	Curvas de crecimiento de biomasa	41
5.3.1	Curva de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis var kurstaki</i> a escala de laboratorio	41

5.3.2 Curva de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> a escala banco	42
5.4 Curvas de proteína total.....	44
5.4.1 Curva de proteína total producida a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> a escala de laboratorio.....	44
5.4.2 Curva de proteína total producida a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> a escala banco.....	45
5.5 Parámetros cinéticos de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> ...	47
5.6 Determinación de variables influyentes a partir del diseño Plackett-Burman	48
5.6.1 Plackett-Burman 1	48
5.6.2 Plackett-Burman 2	49
5.7 Diseño Central Compuesto (DCC) para la producción de proteína total a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
5.7.1 Concentración de proteína total en los tratamientos del DCC	51
5.7.2 Superficies de respuesta	52
5.7.3 Análisis estadístico	57
5.7.4 Determinación del valor óptimo.....	58
5.8 Diseño Central Compuesto (DCC) para la obtención de biomasa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	60
5.8.1 Concentración de biomasa en los tratamientos del DCC.....	60
5.8.2 Superficies de respuesta	61
5.8.3 Ecuaciones para determinación de valores óptimos de biomasa .	65
5.8.4 Análisis estadístico	66
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
6.1 CONCLUSIONES	68
6.2 RECOMENDACIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Durante años se han realizado investigaciones sobre toda clase de problemas relacionados con la pérdida de los cultivos, ya sea por condiciones ambientales o por plagas. Anualmente las plagas invaden y destruyen alrededor del 35% de los cultivos a nivel mundial y luego de ser cosechados, las aves, roedores y microorganismos contribuyen en una pérdida adicional que oscila entre un 10 y 20%, teniendo una pérdida total de un 40 a 50% (Badii & Landeros, 2015). Hasta la fecha el uso de insecticidas químicos ha sido una herramienta muy útil para el control biológico en diferentes cultivos, siendo los organoclorados y organofosforados los más comúnmente empleados (Mishra, Sharma & Kumar, 2012; Badii & Varela, 2015). No obstante, estos han ocasionado efectos negativos en el ser humano y en animales, como afecciones en la piel, vías respiratorias, tracto digestivo e incluso a nivel neuronal. De igual manera han provocado un gran impacto ambiental debido a su alta toxicidad (del Puerto, Suárez & Palacio, 2014). En el Ecuador se estima que el 49,07% de la producción agrícola en el año 2015 utilizó insecticidas químicos para sus cultivos, siendo una posible causa de enfermedades a la piel o a las vías respiratorias (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2015).

La biotecnología mediante el uso de algunos microorganismos ha permitido desarrollar productos como los insecticidas biológicos. Estos productos son de gran importancia para el ser humano y el entorno que lo rodea. Uno de los microorganismos es *Bacillus thuringiensis*, comúnmente llamado *Bt*, es una bacteria Gram positiva formadora de esporas, aislada de una amplia variedad de ecosistemas como: suelo, agua, cadáveres de insectos, mamíferos insectívoros, hojas de árboles e incluso de tejidos humanos con necrosis severa (Palma, Muñoz, Berry, Murillo & Caballero, 2014). Se caracteriza por sintetizar proteínas cristalinas paraesporales con actividad insecticida durante la fase de esporulación y estacionaria de su crecimiento. Estas proteínas se denominan delta-endotoxinas (δ -endotoxina), toxinas Cyst o *Cry*, y conforman alrededor del

30% de la célula (Portela Dussán, Chaparro Giraldo & López Pazos, 2013). *Bt* además de producir proteínas Cry, produce otro tipo de toxinas que le permiten sobrevivir y multiplicarse dentro del huésped; estas son: α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles, β -endotoxinas y las proteínas Vip (*vegetative insecticidal proteins*) (Schnepf & Whiteley, 1985; Estruch et al., 1996, Schnepf et al., 1998; Sauka & Benintende, 2008; Palma et al., 2012; Velloorvalappil, Robinson & Sailas, 2013).

Estas proteínas son secretadas al medio en fase vegetativa del crecimiento de la bacteria (Izquierdo, 2012). Existen diferentes variedades de *Bt* con una actividad plaguicida, algunas de las más destacadas son: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*), *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (*Btt*) y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) (Nava Pérez, García Gutiérrez, Camacho Báez & Vázquez Montoya, 2012; Ennouri, Ben Hassen, Ben Khedher & Zouari, 2013; Ben Dov, 2014).

La capacidad de la bacteria *Bt* para producir la proteína cristalina y algunas toxinas como las Vips en un medio de cultivo bien suplementado, se ha convertido en el enfoque principal para el desarrollo de bioinsecticidas para el control de especies de insectos entre los órdenes díptera (mosquitos), lepidóptera (orugas) y coleóptera (escarabajos) (Bravo et al., 2013; Velloorvalappil et al., 2013). Algunos isotipos de *Bt* producen toxinas con actividad nematocida y también combaten ácaros y protozoos (Yu et al., 2014). Actualmente se considera a *Bt* y sus toxinas una alternativa o un suplemento útil al insecticida químico sintético, lo que resulta en una gran aplicación dentro de la agricultura, control de mosquitos y en el manejo forestal (Velloorvalappil et al., 2013).

Varios productos comerciales cuya formulación está basada en *Bacillus thuringiensis* han tenido éxito en el mercado. Los más destacados son: Turilav®, Dipel® y XenTari®. La aplicación de estos productos a los cultivos se ha convertido en una alternativa conveniente para los agricultores orgánicos por el hecho de que el uso de estas formulaciones de *Bt* resulta en una producción agrícola más limpia, sana y con una mayor calidad (Izquierdo, 2012).

Las toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis* se caracterizan por ser formadoras de poros, los cuales se abren en la membrana del insecto lo que causa un desequilibrio osmótico y la ruptura de células epiteliales. Según Portela Dussán et al., (2013), la toxina es solubilizada debido a la alcalinidad del intestino medio del insecto en estado larvario, de esta manera por una acción proteolítica se liberan fracciones tóxicas. Estas fracciones se unen a proteínas receptoras para posteriormente insertarse en la membrana formando poros líticos. Estos poros formados en la membrana permiten el paso de iones y agua los cuales causan hinchazón y por ende la posterior ruptura celular y muerte del insecto (Portela Dussán et al., 2013).

Bacillus thuringiensis requiere una gran cantidad de minerales y fuentes esenciales tanto para el crecimiento del microorganismo como para la producción de las distintas toxinas. La formulación del medio de cultivo es un paso clave en cada etapa de la bacteria. Las fuentes de carbono más estudiadas son dextrosa, maltosa, glucosa, lactosa, almidón glicerol, inulina y melaza, siendo esta última una fuente residual de gran interés para la producción de la toxina (Içgen, Içgen & Özcengiz, 2002). En cuanto a fuentes de nitrógeno se han realizado estudios principalmente con peptona, extracto de levadura y sulfato de amonio (Mourin, Shishir, Nargis, & Hoq, 2015). Según Navarro-Mtz & Pérez Guevara (2014), la concentración de fuente de carbono y nitrógeno es crucial para el crecimiento del microorganismo y también para la producción de un metabolito en específico, es por ello que se recomienda una relación 7:1 carbono-nitrógeno. En cuanto a minerales, se han realizado estudios con $MnSO_4$, $MgSO_4$, $CoCl_2$, fosfatos, $CaCl_2$, $FeSO_4$ y $CuSO_4$. Sin embargo, las sales y concentraciones utilizadas varían de acuerdo con el autor (Chandrashekhar, Hemant, & Satish, 2014; Hernández, 2014).

Según Mourin et al., (2015), es recomendable el uso de medios rentables. En esta investigación se utilizó como fuente de carbono melaza, como fuente de nitrógeno extracto de soya y como elementos traza (Fe, Zn, Se) agua de mar. Al utilizar estas fuentes se incrementó la síntesis de δ -endotoxinas, por lo cual, con estos resultados, se podrá realizar a gran escala la producción de

bioinsecticidas. En otra investigación realizada por Hernández (2014) se optimizaron las condiciones de cultivo para una mayor producción de proteína Cry y esto se logró al ajustar el medio de cultivo a un pH neutro, reducir la oxigenación, utilizar almidón como fuente de carbono y añadir NaCl a una concentración de 5 g/L. Por otro lado, en un estudio realizado por İçgen et al., (2002), se evaluó el efecto de elementos minerales para la producción de proteínas cristalinas y se determinó que el Mg, Cu y el Mn fueron los metales más importantes para la biosíntesis de toxinas por parte de *Bacillus thuringiensis*.

1.2 Planteamiento del problema

Los cultivos como el maíz y el arroz son algunos de los más afectados en el Ecuador por plagas como: *Spodoptera frugiperda* comúnmente conocida como el gusano cogollero, *Spodoptera eridania* llamada gusano ejército y *Helicoverpa zea* el gusano de la mazorca, lo que resulta en grandes pérdidas económicas para los agricultores del país (MAGAP, 2017). Estas plagas se han combatido durante años mediante el uso de insecticidas químicos. No obstante, estos plaguicidas traen consigo efectos negativos en cuanto a la contaminación ambiental por su persistencia y su dispersión en el ambiente afectando a distintos ecosistemas como el suelo, ríos y mares, perjudicando también a especies vegetales, animales y seres humanos. Además, varias plagas han desarrollado resistencia a varios tipos de plaguicidas. En el Ecuador, anualmente existe una mayor inversión en insecticidas químicos para el control de plagas en los cultivos (INIAP, 2011). Se han desarrollado insecticidas biológicos a partir de *Bacillus thuringiensis*, los cuales gracias a sus toxinas son una alternativa a los sintéticos. Sin embargo, los costos de producción aún son elevados debido a la falta de protocolos de optimización que impliquen la formulación del medio de cultivo y las condiciones de operación para la producción de toxinas de carácter proteico.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general.

Optimizar las condiciones de producción para la obtención de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

1.3.2 Objetivos específicos

Determinar las variables influyentes en el cultivo de *Bacillus thuringiensis* para la producción de proteínas totales mediante un diseño experimental Plackett-Burman.

Establecer el valor óptimo de las variables influyentes en el cultivo de *Bacillus thuringiensis* para la producción de proteínas totales mediante el diseño central compuesto con superficie de respuesta.

1.4 Justificación de la investigación

Existe la necesidad de buscar alternativas a los insecticidas químicos y reemplazarlos por plaguicidas que sean más amigables con el medio ambiente e igual de efectivos. Los bioinsecticidas son una alternativa de gran utilidad en el campo agrícola para el control de plagas. La biotecnología permite mediante el uso microorganismos como *Bacillus thuringiensis*, la producción de proteínas que actúan como bioinsecticidas. Por lo tanto, es indispensable establecer un protocolo optimizado para la producción de toxinas proteicas, en donde tanto la metodología empleada como los resultados obtenidos al final del estudio sirvan como referencia para futuras aplicaciones. De esta forma, se minimiza la discrepancia de datos que existen en varias investigaciones en cuanto a la formulación del medio de cultivo y condiciones de operación que son necesarias para la producción de proteínas con actividad tóxica a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Las ventajas de producir toxinas a partir de *Bt* son: alta especificidad, baja toxicidad ya que sus proteínas no han mostrado efectos tóxicos para los seres humanos, y una de las más importantes, es que no representan un impacto ambiental negativo. Además, en próximas investigaciones, se podría llevar a gran escala la producción de las toxinas con una mayor cantidad y calidad de la misma bajo las condiciones óptimas obtenidas.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1 *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Generalidades

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria aeróbica Gram positiva del género *Bacillus*, formadora de esporas, que se caracteriza por producir un cuerpo de inclusión cristalino paraesporal que contiene proteínas *Cry* y *Cyt*, las cuales son tóxicas contra una amplia gama de órdenes de insectos, nematodos y células cancerígenas humanas (Palma et al., 2014). Esta bacteria tuvo sus orígenes en Japón en el año 1901, al ser descubierta y aislada por el biólogo Shigetane Ishiwata quién estudiaba la enfermedad de sotto del gusano de seda, *Bombyx mori* (*Lepidoptera*, *Bombycidae*), y encontró a esta bacteria ser la causante principal de la enfermedad en las larvas, por lo que la denominó *B. sotto* (Melo, Soccol, y Soccol, 2016). Más adelante en 1911 el científico alemán Ernst Berliner aisló la misma bacteria de la larva de la polilla *Anagasta kuehniella* (*Lepidoptera*, *Pyralidae*), quién le dió el nombre de *Bacillus thuringiensis*, con el que actualmente se la conoce, debido a la región alemana Thuringia de donde fue aislada (Rosas García, 2014).

Dentro de su clasificación taxonómica, *Bt* pertenece al reino Eubacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus* y especie *thuringiensis* (Carrera, 2010). Esta bacteria presenta una alta similitud morfológica y bioquímica entre especies de su mismo género como: *B. subtilis*,

B. anthracis, *B. cereus*, *B. mycoides*, entre otros, por lo que “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” diferencia a *Bacillus thuringiensis* de las demás especies de su mismo género por la presencia de un cuerpo de inclusión o cristal paraesporal y por sus propiedades insecticidas (Sauka y Benintende, 2008).

A *Bt* se la considera una bacteria ubicua debido a que ha sido aislada en cualquier parte del mundo y de un sin número de ecosistemas tales como suelo, agua, hojas de plantas, cadáveres de insectos, mamíferos insectívoros e incluso de tejidos humanos con necrosis severa (Palma et al., 2014). Esta bacteria se muestra como un patógeno especializado que, al colonizar y matar a sus huéspedes, se multiplica en sus cadáveres y es posteriormente depositada en el suelo y plantas, lo que convierte estos entornos en reservorios naturales (Argôlo-Filho y Loguercio, 2013). Es por esto que, a pesar de la variedad de ecosistemas, *Bt* es mayormente encontrada y aislada de muestras de suelo, entorno que presenta materia orgánica en descomposición o exudados de raíces, en donde el microorganismo obtiene los nutrientes necesarios para su supervivencia y reproducción en la naturaleza (Fang et al., 2011).

Las propiedades del suelo tales como la humedad, el pH, las concentraciones de minerales y materia orgánica, así como la microbiota propia del entorno, influyen directamente en la supervivencia de *Bt*, otorgando un efecto positivo o negativo sobre la germinación, crecimiento, reproducción, esporulación y la producción de proteínas del microorganismo (Polanczyk, Zanúncio y Alves, 2009). No obstante, algunos autores consideran al suelo únicamente como un medio de almacenamiento para las esporas producidas por *Bt*, ya que apenas logra germinar en este nicho cuando no tiene los nutrientes y condiciones de pH específicas para esto (Saleh, Harris y Allen, 1970; Akiba, 1986). Por lo tanto, en suelos húmedos y ricos en nutrientes, con un pH cercano a 7 (neutro) e incluso en presencia de demás de microorganismos propios del entorno, las esporas de *Bt* pueden formarse y crecer con facilidad (Argôlo-Filho et al., 2013).

2.1.1.1 Características microbiológicas

Las células de *Bacillus thuringiensis* al ser sometidas a una tinción Gram y observadas bajo el microscopio, se muestran de color morado (Gram positivas) con una forma bacilar o de vara alargada y miden de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho (Portela, Chaparro y López, 2013). Las colonias de *Bt* son de color blanco o crema, generalmente presentan una textura mate o granular, tienen una forma redonda con bordes regulares o irregulares, con un diámetro de 2-7 mm y muestran una ligera elevación (Muniady, Rathinam y Subramaniam, 2011). La principal característica que diferencia a *Bt* de otras especies de su mismo género es la presencia intracelular de proteínas cristalinas conocidas como δ -endotoxinas, Cry o Cyt. Estos cristales presentan diferentes formas: piramidal, bipiramidal, cuboidal, romboide, rectangular y esférica, siendo la más común la forma de un cristal bipiramidal (Rabinovitch et al., 2017). Esta especie de bacteria es aeróbica no estricta con un rango de temperatura de crecimiento entre 10-15 °C (mínima) y 40-45 °C (máxima), siendo la temperatura óptima entre 30 y 35 °C (Paucar, 2011).

Durante su ciclo de vida, *Bt* presenta dos fases: la primera es la fase de crecimiento vegetativo, en donde las células bacterianas se duplican por bipartición cada 30-90 min, dependiendo de la composición del medio de cultivo, y la segunda es la fase de esporulación, en donde se da una diferenciación de la bacteria a espora (Soberón y Bravo, 2007). La espora de *Bt* tiene una forma elipsoidal, aunque mayormente son cilíndricas y se localizan en la región central o paracentral cuando se encuentran dentro de la célula madre bacteriana. El desarrollo de esta espora y el cristal paraesporal se da en siete fases distintas (figura 1): fase I - la formación de filamentos axiales, fase II - formación de tabiques preespora, fase III - engrosamiento, primera aparición de cristales paraesporales y formación de una preespora, fase IV a VI - formación de exosporium, corteza y capas de esporas acompañadas por la transformación del nucleoide de la espora y finalmente la fase VII - la maduración de las esporas y la lisis esporangial (Ibrahim, Griko, Junker y Bulla, 2010). La formación de la espora ocurre como un mecanismo de defensa de la bacteria que le permite

permanecer en el ambiente por largos períodos en ausencia de humedad y limitación de nutrientes (Soberón y Bravo, 2007).

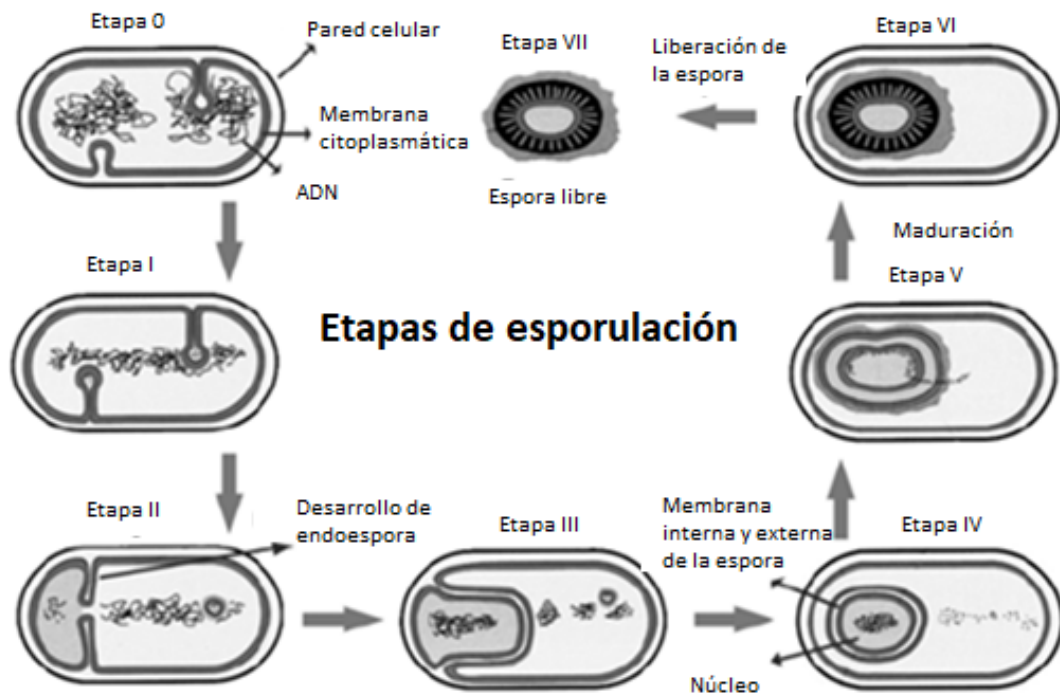


Figura 1. Fases de esporulación de *Bacillus thuringiensis*.

Adaptado de: Gebeshuber et al., 2010.

2.1.1.2 Características bioquímicas

Usualmente se conoce que, si es aerobio, produce esporas y es Gram positivo, la bacteria es del género *Bacillus*, pero para tener un acercamiento a la especie del microorganismo, generalmente se realizan pruebas bioquímicas que no son más que una serie de análisis para identificar un microorganismo a partir de su metabolismo (Carrera, 2010). Algunas de las características bioquímicas comúnmente presentadas en distintos aislados de *Bt* son la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, sacarosa, maltosa y ribosa. Además, el microorganismo es capaz de hidrolizar el almidón, la gelatina, glucógeno, N-acetil-glucosamina y esculina (Sauka y Benintende, 2008).

Dentro de las pruebas bioquímicas que se realizan está la de Voges-Proskauer, en donde se espera la presencia de acetyl-metil carbinol o acetoina. Otra de las pruebas es determinar si se da la fermentación de la glucosa al producir ácido y

una nula formación de gas, también se realiza la prueba para la producción o no de la enzima α -amilasa encargada de hidrolizar el almidón. Debido a que la presencia del cristal paraesporal en el interior de la célula es la característica principal para identificar a *Bacillus thuringiensis*, se realiza una tinción diferencial con verde malaquita, mediante un frotis de la muestra de la bacteria y su fijación sobre un portaobjetos (Galvis, 2013). Una vez realizada la tinción, se observan, los cuerpos paraesporales mediante un microscopio óptico a partir de 100X de aumento. Por lo tanto, si el bacilo es Gram+, produce espora central, V-P+, ácido+, gas- y amilasa+, podría ser *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* o *B. anthracis*. No obstante, si tras su tinción se observa un cuerpo paraesporal en el intracelular, podemos concluir que es *Bacillus thuringiensis* (Carrera, 2010).

2.1.2 Aplicaciones

2.1.2.1 Bioinsecticidas

Una gran aplicación de *Bacillus thuringiensis* mediante el uso de la biotecnología es la elaboración de bioinsecticidas a partir de este microorganismo. Un bioinsecticida o insecticida biológico es un agente controlador de plagas, específicamente de insectos, de origen biológico ya sea a partir de hongos, plantas, microorganismos o una toxina natural de los mismos (Padilla, 2017).

Bt es uno de los microorganismos más estudiado y comercialmente utilizado como bioinsecticida en la mayor parte del mundo debido a la toxicidad contra las larvas de los insectos plaga de los órdenes: diptera, lepidoptera, coleoptera, hymenoptera, orthoptera, hemiptera y además contra nematodos, protozoarios, ácaros y platelmintos (Carrera, 2010). Los primeros bioinsecticidas basados en *Bt* se comercializaron a gran escala en Francia cerca del año 1958, con la introducción del producto Thuricide® al mercado, el cual tuvo una serie de análisis toxicológicos previos en animales y humanos voluntarios realizados por la U.S FDA (*United States Food and Drug Administration*) que demostraron que el producto no es tóxico para seres humanos u otros mamíferos vertebrados, no

produce efectos negativos en enemigos naturales de las plagas ni en plantas, por lo que permitió su aprobación para ser comercializado sin perjudicar al medio ambiente (Jacas, 2005, pp. 67-70).

Actualmente existen alrededor de 100 formulaciones de bioinsecticidas a partir de *Bt* en el mercado, siendo Dipel®, Turilav® y XenTari® las marcas más utilizadas y comercializadas a nivel mundial (Izquierdo, 2012). Según un listado presentado por Agrocalidad en el 2013, Dipel®, Turilav®, New BT 2x®, NOVO-BIOBIT®, VectoBac® y XenTari®, son algunas de las marcas de bioinsecticidas a base de *Bt* registradas para comercialización en Ecuador.

Existen diferentes variedades de *Bt* y las respectivas plagas a las que atacan: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* producen toxinas específicas contra lepidópteros; *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* produce toxinas específicas para dípteros; *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* produce toxinas específicas contra coleópteros (Benson, Dahod, Dave, Nair y Adams, 2013). En 1970, Howard.T Dulmage aisló una cepa de *B. thuringiensis*, a la cual denominó *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1), que resultó entre 20 y 200 veces más potente contra lepidópteros que todas las cepas conocidas. Por lo general, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) es la base para la formulación de la mayoría de bioinsecticidas comerciales (Castro, 1994; Upadhyay, 2013)

2.1.2.2 Proteínas de *Bacillus thuringiensis*

2.1.2.2.1 Toxinas cristalinas (δ -endotoxinas)

Las proteínas cristalinas se forman como inclusiones cristalinas parasporales durante la fase estacionaria del crecimiento de *Bacillus thuringiensis*. Las más conocidas son las δ -endotoxinas, incluidas las toxinas Cry y Cyt (Schnepf et al., 1998).

A las proteínas Cry se las ha definido como “cualquier proteína parasporal de *Bacillus thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo,

verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que tenga similitud con las proteínas Cry” (Soberón y Bravo, 2007).

Las proteínas cristalinas o Cry son producidas en mayor cantidad por *Bt*, estas se acumuladas en las células de la bacteria como inclusiones parasporales y representan hasta el 25% del peso seco celular esporulado (Agaisse y Lereclus, 1995). Estas toxinas son principalmente activas para especies de lepidópteros, aunque han mostrado actividad contra algunas especies de coleópteros y dípteros (Palma et al., 2014). Las proteínas Cry se encuentran distribuidas en 50 grupos, las cuales se clasifican desde Cry 1 hasta Cry 55 (Soberón y Bravo, 2007). Hasta la fecha se conocen 204 holotipos de δ -endotoxinas Cry específicos para los órdenes de insectos lepidoptera, diptera, hymenoptera, coleoptera y también algunos son específicos para nemátodos (Bravo, Gill y Soberón, 2007; del Toro de León, 2010). En la tabla 1 se muestran las diferentes especies de *Bt* utilizados en la agricultura con las toxinas Cry que producen y sus respectivos su insecto plaga.

Tabla 1.

Cepas de Bt con sus respectivas toxinas e insectos diana.

CEPA <i>Bt</i> O SUBESPECIES	ORDEN DE INSECTOS BLANCO	DELTA ENDOTOXÍNAS
<i>kurstaki</i> HD-1	Lepidóptero; Diptera	<i>Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry2B,</i>
<i>thuringiensis</i> HD-2**	Lepidoptera	<i>Cry1A, Cry1B</i>
<i>aizawai</i>	Lepidoptera	<i>Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D, Cry1F</i>
<i>entomocidus</i>	Lepidoptera	<i>Cry1Aa, Cry1B, Cry1C</i>
<i>tenebrionis</i>	Coleoptera	<i>Cry3A</i>
<i>israelensis</i>	Diptera	<i>Cry4A, Cry4b, Cry4C, Cry4D</i>

Adaptado de: Del Toro de León, 2010

Las proteínas Cyt (citotóxicas o citolíticas), son codificadas por los genes *cyt*. Estas proteínas constituyen otra familia de las proteínas insecticidas que

produce *Bt* (Guerchicoff, Delécluse y Rubinstein, 2001). A diferencia de las proteínas Cry, las proteínas Cyt exhiben una actividad citolítica general (hemolítica) *in vitro* y predominantemente especificidad de dípteros *in vivo* (Butko, 2003; Palma et al., 2014). Una importante característica de las proteínas Cyt es la capacidad que tienen para sinergizar la actividad insecticida de otras toxinas Cry o Vip3 y además pueden reducir los niveles de resistencia de los insectos a algunas proteínas Cry en algunas especies de insectos (Yu et al., 2012; Soberón, López y Bravo, 2013).

2.1.2.2.2 Toxinas secretadas

Algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* durante su fase de crecimiento vegetativo producen proteínas que son secretadas en el medio y que al igual que las proteínas Cry, se ha encontrado que tienen propiedades insecticidas contra varios insectos plaga, extendiendo de esta forma el rango general del huésped de esta bacteria. Las proteínas insecticidas secretadas constituyen dos clases: proteínas insecticidas vegetativas (Vip) y proteínas insecticidas secretadas (Sip) (Warren et al., 1998); Milne, Liu, Gauthier y Van Frankenhuyzen, 2008).

Las proteínas insecticidas vegetativas (Vip) son las proteínas que se han descubierto recientemente. Se las ha clasificado en cuatro familias las Vip1, Vip2, Vip3 y una nueva familia de proteínas Vip 4 (Crickmore et al., 2014). Las toxinas Vip1 y Vip2 son proteínas de 100 y 52 kDa, respectivamente, las cuales constituyen una toxina binaria activa contra las larvas de algunas especies de coleópteros y la plaga de insectos chupadores de savia *Aphis gossypii* (Hemiptera) (Sattar y Maiti, 2011). Se cree que su mecanismo de acción está dado por la participación de ambas proteínas, en donde Vip1 se une a receptores específicos en las células del intestino medio y forma un canal, seguidamente Vip2 atraviesa este poro modifica las actinas monoméricas e inhibe su polimerización ya que presenta una homología con las ADP-ribosiltransferasas (Sellami et al., 2013).

Por el contrario, las Vip3 de 88,5 kDa son toxinas monocatenarias (no binarias) con actividad insecticida contra una gran variedad de especies de lepidópteros y contra ciertas especies que son menos susceptibles a algunas proteínas Cry1A (p. Ej., *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua* y *S. frugiperda*) (Estruch et al., 1996; Palma et al., 2014). El modo de acción de las proteínas Vip3 aún es conocido, aunque hay evidencia de que las proteínas Vip3 actúan por formación de poros (Lee, Walters, Hart, Palekar y Chen, 2003). Se ha propuesto un mecanismo, el cual sugiere que la toxina Vip3A activada se une a las células epiteliales del intestino medio de insectos susceptibles causando su lisis, parálisis intestinal y muerte de larvas (Palma et al., 2014).

Por otro lado, las proteínas insecticidas secretadas (Sip) son el primer y único miembro de la familia insecticida *Bt* de proteínas secretadas, de las cuales se ha demostrado que son tóxicas para larvas de coleópteros. A la proteína Sip se la obtuvo inicialmente de sobrenadantes de cultivo de una cepa de *Bacillus thuringiensis* EG2158 y se la denominó como Sip1Aa1 (Donovan et al., 2006). El modo de acción de la proteína Sip1Aa1 es desconocido hasta la fecha, aunque se cree que la toxicidad de la proteína puede ser causada por la formación de poros. Se sabe que Sip1Aa1 es letal para las larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) y, además, inhibe el crecimiento de *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae) y de *D. virgifera virgifera* (Palma et al., 2014).

En ocasiones, algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* sintetizan otras toxinas con potencial insecticida pero que aún no han sido investigadas a profundidad. Las β -exotoxinas son una de ellas, *Bt* las sintetiza a manera de metabolitos secundarios no proteicos, termoestables y secretables, las cuales muestran actividad tóxica no específica contra una amplia gama de insectos y también contra mamíferos, al inhibir la ARN polimerasa dependiente de ADN (Gohar y Perchat, 2001; Liu et al., 2014). Existen otro tipo de toxinas denominadas proteínas auxiliares (P19 y P20 Helper Proteins), las cuales como su nombre lo indica, sirven de ayuda para la producción estable de cristales paraesporales, además sinergizan la actividad tóxica de Cry11A contra larvas de *A. aegypti* en

el tercer estadio y aumenta la producción de proteínas Cyt en *Bt* (Xu, Nagai, Bagdasarian, Smith y Walker, 2001; Nisnevitch et al., 2006).

2.1.2.3 Ventajas del uso de *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas como bioinsecticida

El uso de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida lleva más de 40 años en el campo agrícola principalmente en cultivos de cereales y hortalizas (Carrera, 2010). Esta bacteria muestra grandes ventajas ya que combate insectos plaga en fase larvaria, los cuales son susceptibles a las toxinas de carácter proteico producidas por *Bt*. Una de las ventajas más importantes es la inocuidad que presenta frente al medio ambiente, el ser humano, otros mamíferos, vertebrados, plantas e incluso otros insectos benéficos, además de una baja influencia en cuanto a fenómenos de resistencia (Soberón y Bravo, 2007; López y Cerón, 2010). Varios de los productos comerciales a base de *Bt* son formulados a partir de las esporas del microorganismo y sus cristales o demás toxinas, ya que la mezcla de ambas, potencia la actividad insecticida (Hussien, 2012).

2.1.3 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*

Cuando las larvas de los insectos plaga se alimentan de plantas que contienen la bacteria *Bacillus thuringiensis* o sus esporas, ocurren cambios estructurales en el intestino medio del insecto, los cuales son causados por la ingesta de las toxinas que produce el microorganismo. Al inicio la larva ingiere a *Bt* junto con su cuerpo de inclusión paraesporal, la cual permanece latente en el intestino medio del insecto debido a que las condiciones como el pH alcalino del entorno son desfavorables para la bacteria, pero una vez que la inclusión es solubilizada y dividida en fragmentos tóxicos, causa un desequilibrio osmótico y la deformación estructural de las células epiteliales del intestino, lo que hace que se desintegre la membrana microvellosa y consecuentemente produce la destrucción del mismo. Esto resulta en una parálisis de las funciones del intestino, una disminución del pH del flujo intestinal y los nutrientes se liberan

volviéndose disponibles para la germinación de las esporas de la bacteria, la cual posteriormente logra multiplicarse y colonizar en el organismo. Eventualmente la larva deja de alimentarse y muere (Castro, 1994; Portela Dussán et al., 2013).

En resumen, el mecanismo de acción de *Bt* en las plagas consta de cinco pasos (figura 2). (1) La ingestión de la bacteria: la larva del insecto se alimenta e ingiere la bacteria o las esporas de la misma que contiene el cuerpo de inclusión paraesporal. (2) Solubilización de los cristales u otras toxinas: las toxinas se solubilizan en fracciones tóxicas o protoxinas por acción de las proteasas del intestino medio, el cual tiene un pH alcalino de 9 a 12 que es de gran influencia para la activación de las toxinas. (3) Activación de las proteínas: las protoxinas son activadas gracias a enzimas digestivas en el intestino medio y se unen a receptores específicos en las microvellosidades de las membranas apicales de las células del intestino del insecto. En este caso, las aminopeptidasas, proteína tipo cadherina (CADR) y la fosfatasa alcalina, actúan como proteínas receptoras para *Bt*. (4 y 5) Unión a receptores específicos y vacuolización del citoplasma: las toxinas Cry u otras toxinas, atraviesan la membrana peritrófica uniéndose a receptores específicos en las membranas apicales de las células intestinales, lo que provoca la apertura o formación de poros. Seguidamente ocurre la vacuolización del citoplasma por desequilibrio osmótico entre los ambientes intracelular y extracelular y finalmente la disrupción celular. Esto destruye las microvellosidades, haciendo que el insecto pare de alimentarse, produciendo su muerte (Schünemann, Knaak y Fiuza, 2014).

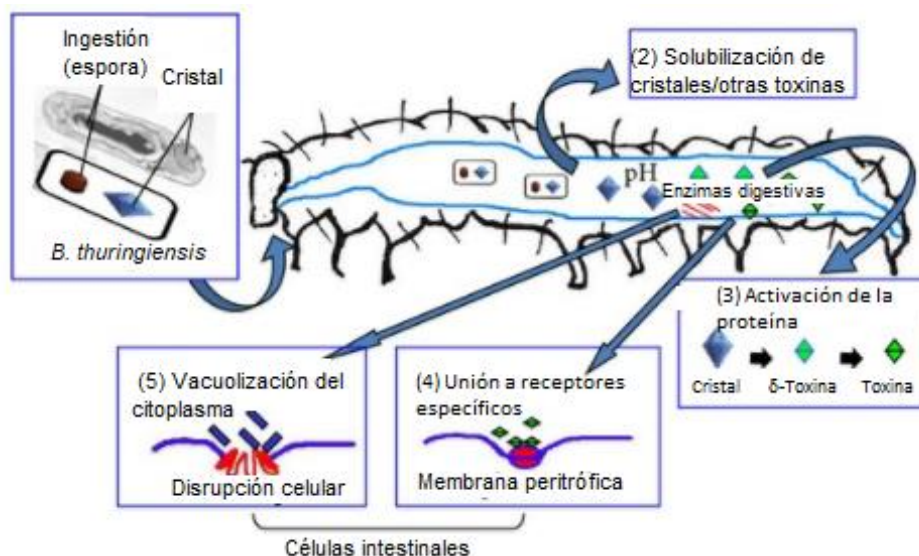


Figura 2. Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis* en lepidópteros. Adaptado de: Schünemann, Knaak y Fiuza, 2014.

2.2 Optimización de medios de cultivo y condiciones de operación

2.2.1 Generalidades

Cuando se habla de optimización se refiere a mejorar un proceso, es decir, analizar sus parámetros principales: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, macroelementos, microelementos, inductores, oxígeno disuelto, pH, temperatura, entre otros. En la mayoría de procesos se realizan optimizaciones simultáneas de varios parámetros lo cual no solo engloba el óptimo de los parámetros en específico sino el óptimo global del proceso. En un proceso industrial la “optimización” es la principal herramienta cuantitativa, para lo cual es necesario el uso de modelos y programas estadísticos para obtener tales valores. La optimización de un proceso se realiza con dos objetivos principales: el primero minimizar los costos de producción, es decir el uso eficiente de los recursos u otras materias primas y el segundo maximizar la eficiencia o el rendimiento (Kennedy, Reader, Krouse, y Hinkely, 2009).

Para realizar la optimización de un proceso se requiere varios elementos: se necesita de un valor el cual deba ser minimizado o maximizado durante el

proceso de optimización, por ejemplo: costos o rendimiento, también es necesario un modelo predictivo, el cual especifique el comportamiento del sistema, de igual manera es necesario que las variables analizadas en el proceso se ajusten al modelo predictivo mencionado con anterioridad (Lorenz y Biegler, 2010).

2.2.2 Producción industrial

En los últimos años se han realizado optimizaciones de procesos con respecto a la producción de *Bacillus thuringiensis* y sus metabolitos en específico. En varias investigaciones se han analizado las principales variables tanto de cultivo como de operación. El objetivo principal de la industria agrícola es la producción de un bioinsecticida a partir de microorganismos que producen metabolitos con un alto grado de toxicidad contra diferentes insectos, mediante la formulación y uso de medios de cultivo eficientes para el desarrollo de tales microorganismos. Se habla de un medio eficiente cuando el cultivo tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de un microorganismo como *Bt* y la producción de sus proteínas, de igual manera los medios de cultivo deben ser costo eficiente, es decir, utilizar fuentes baratas y que no sean complejas para la bacteria (Devidas, Pandit, & Vitthalrao, 2014).

En cuanto a la producción de *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas, se debe realizar la selección y conservación del microorganismo como primer paso ya que esto garantiza un buen proceso y producto (bioinsecticida). En segundo lugar, se debe realizar inóculos por medio de cultivos líquidos que deben estar en constante agitación durante la fermentación. (Carrera, 2010). Lo más importante al momento de producir *Bt* y sus toxinas proteicas son los requerimientos nutricionales del microorganismo: el balance carbono-nitrógeno y el balance de las sales como hierro, magnesio, manganeso, entre otros. En cuanto a los requerimientos de operación, *Bacillus thuringiensis* necesita condiciones óptimas para la producción de la proteína. Condiciones como temperatura, pH, suministro de oxígeno y agitación, son algunas de las condiciones principales para este

microorganismo. Sin embargo, los requerimientos cambian dependiendo de la variedad de *Bt* con el que se trabaja (Hernández, 2014).

2.2.3 Nutrientes esenciales para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*

Los requerimientos nutricionales de *Bacillus thuringiensis* son esenciales tanto para su crecimiento como para la producción de proteínas con un alto grado de toxicidad. Por lo tanto, un medio de cultivo base para este microorganismo debe contener:

Una fuente de carbono que brinda la energía necesaria para los procesos anabólicos, es decir obtención de moléculas grandes a partir de moléculas pequeñas (Paucar, 2011). La ausencia de fuentes metabolizables puede causar falta de esporulación y por ende poca formación de toxinas proteicas. Usualmente se utilizan fuentes como: glucosa, melaza, almidón y fructosa (Devidas, Pandit, & Vitthalrao, 2014).

Una fuente de nitrógeno, debido a que necesita aminoácidos o péptidos para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, los cuales son utilizados también como fuente de energía. Usualmente se utiliza extracto de levadura, harina de soya, harina de maíz, sulfato de amonio (Mourin, Shishir, Nargis, & Hoq, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que se necesita más de una fuente de nitrógeno, es decir, la combinación de nitrógeno orgánico e inorgánico que proporcionen una mayor cantidad de aminoácidos para el crecimiento de la bacteria y por ende la formación de sus toxinas (Beltrán & Zamora, 1998).

Sales esenciales como: fosfatos, manganeso, magnesio, hierro, zinc, cobre, cobalto y calcio.

- Mg^{2+} : En conjunto con los fosfatos proveen energía mediante las reacciones que implican adenosín trifosfato, mejorando así el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (Beltrán & Zamora, 1998; Ennouri, Ayed, Hassen, Mazzearello, & Ottaviani, 2015).

- Mn^{2+} : Este mineral es esencial para cualquier variedad de *Bacillus thuringiensis*, debido a que ayuda a producir mayor cantidad de endosporas. Se ha observado que el efecto es positivo siempre y cuando se coloque en concentraciones bajas (Ennouri et al., 2015).
- Ca^{2+} , Na^{+} : Promueven un mayor crecimiento del microorganismo. Na^{+} es importante debido a que forma parte de la pared de las esporas, por lo cual lo hace más resistente al calor y a rayos ultravioleta (Beltrán & Zamora, 1998; Marzban, 2012).
- K^{+} : Es importante para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, formación de esporas y endotoxinas (Beltrán & Zamora, 1998).
- Fe^{+} : La ausencia de este mineral podría limitar el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*. Usualmente se coloca en el medio de cultivo en forma de sulfato, lo cual indica que la bacteria consume hierro de manera compleja, de igual manera, se ha visto que el $FeSO_4$ en altas concentraciones tiene un efecto inhibitorio en la producción de endotoxinas y promueve la actividad de proteasas (Ennouri et al., 2015). Por lo tanto, se necesitan concentraciones adecuadas de hierro (10^{-6} y 10^{-8} M) para potenciar su crecimiento (Guerra, Abascal, Pacheco, Alonso, & Cruz, 2012). Además, el hierro es esencial para llevar a cabo reacciones bioquímicas importantes como la síntesis de ATP, mediante la disminución de oxígeno (Ennouri, Ayed, & Hassen, 2015).
- Cu^{2+} - Zn^{2+} : Siendo el Cu^{2+} y el Zn^{2+} metales tóxicos para los microorganismos, en concentraciones bajas son excelentes inductores de crecimiento y formadores de esporas y endotoxinas (Valicente, Tuelher, Leite, Freire, & Vieira, 2010).
- Co^{2+} : De manera general, promueve el crecimiento de cualquier microorganismo (Guerra et al., 2012).

En cuanto a las condiciones de operación, *Bacillus thuringiensis* necesita de condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria y para la formación de

esporas y endotoxinas. Temperaturas entre 30 a 35°C son las más adecuadas (Portela-Dussán et al., 2013). Se ha observado que *Bt* duplica su producción de esporas y mejora la termorresistencia a temperaturas entre 20 a 35°C. A temperaturas mayores a 40°C, se inhibe la producción de esporas (Ignatenko, Sakharova, Khovrychev, & Shevtsov, 1983).

El pH adecuado va entre 6,8 a 7,2 dependiendo de la etapa del proceso, debido a que se ha observado que *Bt* tiene cambios en el pH durante las fases de producción (Portela-Dussán et al., 2013). Otro parámetro que se debe tomar en cuenta es el suministro de oxígeno debido a que este microorganismo necesita gas especialmente en la fase exponencial de crecimiento. El oxígeno es la fuente principal de esta bacteria. Este microorganismo se caracteriza por ser formadora de espuma durante la fermentación, sin embargo, altas concentraciones de antiespumante pueden ser un limitante en la transferencia de oxígeno necesaria para este microorganismo (Fernández, Cejas & Márquez, 2009).

2.3 Diseño de experimentos en bioprocesos

2.3.1 Generalidades

La optimización de procesos biológicos se realiza mediante diseños experimentales. El uso del correcto diseño experimental es indispensable para investigaciones y estudios analíticos. Existen diseños en donde se estudia la influencia de las variables individualmente o diseños en donde se estudia la influencia de las variables y también su interacción (Carrillo, Haro, Díaz & Cañizares, 2014).

2.3.2 Diseño experimental Plackett-Burman

El diseño Plackett-Burman es un método estadístico en donde se evalúa la influencia de las variables de estudio de manera individual con respecto a la variable de respuesta. Este método es el más adecuado para conocer si la

variación de un factor afecta al resultado de un proceso experimental y se lo utiliza para establecer las variables de estudio al inicio de una investigación (Carrillo et al., 2014). Este diseño implica tratamientos en múltiplos de 4 ($4n$) donde n puede ser cualquier valor numérico, cabe recalcar que el número máximo de factores de estudio es de $(4n-1)$. En estos diseños existen 2 niveles para cada factor, siendo (-) el valor mínimo y (+) el valor máximo de las cantidades o concentraciones de cada variable (*Analytical Methods Committee*, 2013).

Se utilizan gráficas de efectos principales o diagramas de Pareto como una herramienta adicional para el análisis de resultados de las variables influyentes, sin embargo, estas gráficas muestran únicamente resultados cualitativos. En este diseño no existen análisis probabilísticos como tablas de ANOVA en donde se determina el valor p o el valor f , debido a que no se quiere construir un modelo en particular. En este diseño se busca únicamente determinar las variables que causan alteraciones en la variable de respuesta (Cortés, 2013).

2.3.3 Diseño Central Compuesto rotacional 2^k

El diseño central compuesto es un diseño en donde se evalúa no solo la influencia de las variables de estudio de manera individual sino también su interacción.

Son diseños factoriales los cuales tienen 2^k combinaciones de sus puntos centrales simbolizado n_c y de sus puntos axiales. La rotabilidad del diseño se da mediante la siguiente ecuación: $\alpha = (2^k)^{1/4}$ en donde α es 1,44 para un diseño de dos factores y de 1,68 para un diseño de 3 factores (Careaga, 2015).

Las gráficas de superficie de respuesta representan un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas eficientes en el análisis y determinación de valores óptimos en donde la variable de respuesta se encuentra influenciada por algunas variables de estudio y en donde el interés principal es la optimización. En estas gráficas se representa: en el eje de las Y la variable de respuesta y en los ejes

X y Z las variables de estudio. De igual manera, existen gráficas de contornos que se utilizan para visualizar de manera más clara partes específicas de las gráficas de superficie de respuesta como la zona central de la optimización. El objetivo principal de un diseño central compuesto con superficie de respuesta es determinar las condiciones óptimas del sistema y de las variables de estudio, determinando de esta forma la región con los requerimientos más satisfactorios para el sistema (Montgomery, 2004).

El análisis de este diseño se realiza mediante tablas probabilísticas; principalmente análisis de varianza o también denominado tablas ANOVA. Se determina la significancia de las variables de estudio por medio de una comparación del cuadrado medio y de una estimación del error durante la experimentación, el cual casi siempre es de 0,05 (Careaga, 2015). El R^2 es un estadístico que se utiliza para determinar qué tan ajustados se encuentran los datos con respecto a una regresión. Cuando se trata de un diseño central compuesto, es decir un modelo cuadrático es aceptable un R^2 ajustado de 0,70 debido a que es un proceso biológico el cual presenta cambios de idealidad (Valderrama, 2003).

3. Capítulo III. Diseño experimental

3.1 Diseño del plan experimental

Los experimentos se desarrollaron de manera secuencial de acuerdo con el diagrama que se observa en la figura 3.

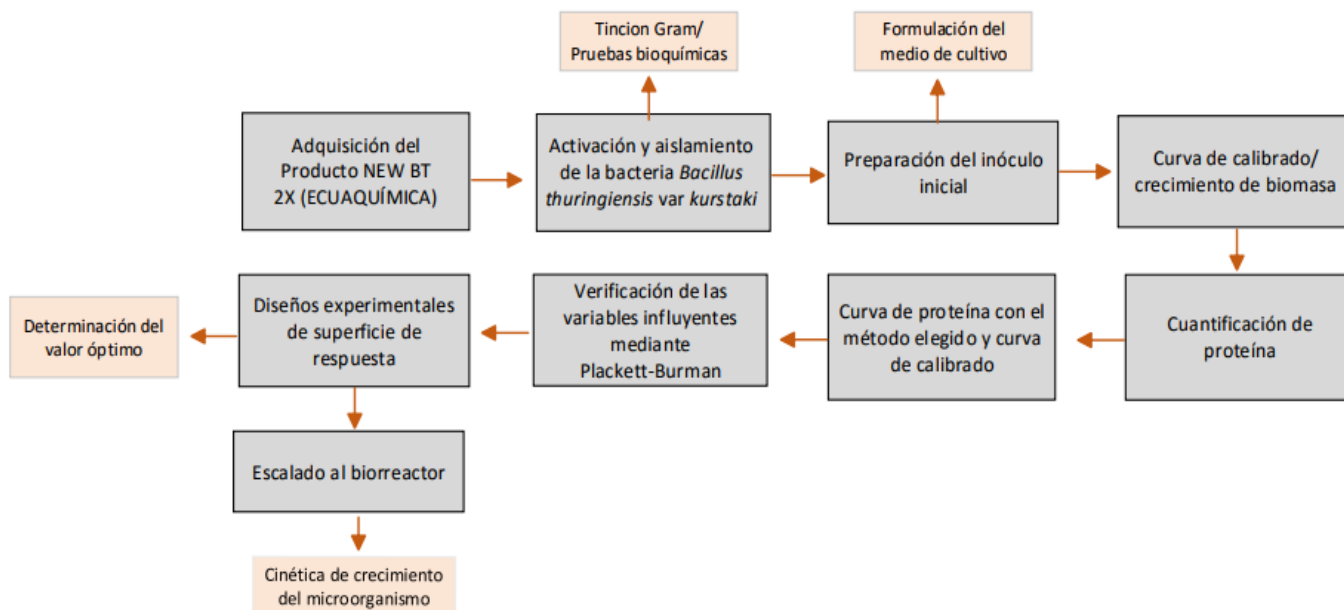


Figura 3. Diagrama de bloques del plan experimental

3.2 Diseño experimental

3.2.1 Diseño Plackett-Burman

Se plantearon dos diseños factoriales Plackett-Burman en donde se determinaron las variables influyentes en la producción de toxinas (Navarro-Mtz et al., 2014). En el primer diseño se evaluaron 11 factores y se realizaron 12 tratamientos (tabla 2).

Tabla 2.

Matriz del primer diseño experimental Plackett-Burman

Tratamientos/ Factores*	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
T1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
T2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
T3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
T4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
T5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
T6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
T7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
T8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
T9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
T10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
T11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
T12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: X1: sacarosa; X2: extracto de levadura; X3: KCl; X4: MgSO₄; X5: MnSO₄; X6: CoCl₂; X7: CuSO₄; X8: ZnSO₄; X9: FeSO₄; X10: temperatura; X11: agitación

En el segundo diseño se evaluaron 7 factores y se realizaron 8 tratamientos (tabla 3) (Kuehl, 2001; Sarrafzadeh, 2012) con distintas combinaciones de valores máximos y mínimos de cada factor, en donde (+) son los valores máximos y (-) son los valores mínimos (tabla 4). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Los resultados del diseño Plackett-Burman se obtuvieron mediante diagramas de Pareto. Los datos fueron analizados mediante el programa Minitab® (Kuehl, 2001).

Tabla 3.

Matriz del segundo diseño experimental Plackett-Burman

Tratamientos/ Factores*	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
T1	+	-	-	+	-	+	+
T2	+	+	-	-	+	-	+
T3	+	+	+	-	-	+	-
T4	-	+	+	+	-	-	+
T5	+	-	+	+	+	-	-
T6	-	+	-	+	+	+	-
T7	-	-	+	-	+	+	+
T8	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: X1: KCL; X2: FeSO₄; X3: MnSO₄; X4: extracto de levadura; X5: CoCl₂; X5: temperatura; X6: agitación

A continuación, se detallan los valores decodificados de los 2 Plackett-Burman realizados en el presente trabajo

Tabla 4.

Variables experimentales para el diseño Plackett-Burman.

Variables	Valor máximo (+)	Valor mínimo (-)
Sacarosa	74,10 g/L	34,10 g/L
Extracto de levadura	55,37 g/L	15,37 g/L
KCl	5 g/L	1 g/L
MgSO ₄	0,60 mg/L	0,10 mg/L
MnSO ₄	70 mg/L	20 mg/L
CoCl ₂	50 mg/L	10 mg/L
CuSO ₄	10 mg/L	3 mg/L
ZnSO ₄	7,50 g/L	3 g/L
FeSO ₄	3 mg/L	1 mg/L
Temperatura	30°C	37°C
Agitación	100 rpm	150 rpm

3.2.2 Diseño Central Compuesto Rotacional 2^k

Luego de identificar las variables influyentes en la producción de toxinas, se desarrolló el Diseño Central Compuesto Rotacional 2^k , que generó superficies de respuesta. En este diseño se tomaron como variables independientes aquellas resultantes como influyentes en el segundo diseño Plackett-Burman (CoCl_2 , FeSO_4 y temperatura) y las variables dependientes fueron la concentración de proteína y la concentración biomasa. Para ello se partió de un valor central el cual fue obtenido mediante bibliografía y se realizaron 18 combinaciones con 3 repeticiones por tratamiento (tabla 5) (Kuehl, 2001, pp. 433-437).

Tabla 5.

Combinaciones de las variables independientes para el DCC tanto para biomasa como para proteína

N° Experimento	Variable 1 CoCl ₂ (mg/L)		Variable 2 FeSO ₄ (mg/L)		Variable 3 Temperatura (°C)	
	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado
1	-1,00	20,00	-1,00	0,93	-1,00	34
2	-1,00	20,00	-1,00	0,93	1,00	36
3	-1,00	20,00	1,00	1,77	-1,00	34
4	-1,00	20,00	1,00	1,77	1,00	36
5	1,00	40,00	-1,00	0,93	-1,00	34
6	1,00	40,00	-1,00	0,93	1,00	36
7	1,00	40,00	1,00	1,77	-1,00	34
8	1,00	40,00	1,00	1,77	1,00	36
9	-1,68	13,20	0,00	1,35	0,00	35
10	1,68	46,80	0,00	1,35	0,00	35
11	0,00	30,00	-1,68	0,65	0,00	35
12	0,00	30,00	1,68	2,05	0,00	35
13	0,00	30,00	0,00	1,35	-1,68	33
14	0,00	30,00	0,00	1,35	1,68	37
15	0,00	30,00	0,00	1,35	0,00	35
16	0,00	30,00	0,00	1,35	0,00	35
17	0,00	30,00	0,00	1,35	0,00	35
18	0,00	30,00	0,00	1,35	0,00	35

4. Capítulo IV. Procedimientos

4.1 Población y muestra

Muestra

Se utilizó *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* obtenida a partir del producto NEW BT 2X (ECUAQUÍMICA, Ecuador). La muestra es la proteína extracelular contenida en el sobrenadante del medio de cultivo.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1 Materiales

Los materiales que se utilizaron en este trabajo experimental fueron: PBS (preparado), agar nutriente (Becton and Dickinson, Francia), LB (Invitrogen, Estados Unidos), sacarosa (*Loba Chemie*, India), extracto de levadura (Becton and Dickinson, Francia), cloruro de potasio (Panreac and AppliChem, España y Alemania), sulfato de magnesio heptahidratado (*Loba Chemie*, India), sulfato de manganeso hidratado (*Loba Chemie*, India), cloruro de cobalto hexahidratado (*Loba Chemie*, India), sulfato de cobre pentahidratado (*Loba Chemie*, India), sulfato de zinc heptahidratado (*Loba Chemie*, India), sulfato de hierro heptahidratado (*Loba Chemie*, India) y Biuret (preparado).

Los principales equipos para llevar a cabo el trabajo experimental fueron: balanza analítica (*Radwag*, Polonia), incubadora (*Biobase*, Alemania), centrífuga (*Labnet International*, Estados Unidos), espectrofotómetro (*Thermo Scientific*, Estados Unidos), potenciómetro (Mettler Toledo, Estados Unidos), estufa (*Thermo Scientific*, Estados Unidos) y Biorreactor (*Applikon Biotechnology*, México).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Activación y aislamiento de la bacteria

Para la activación y obtención de colonias puras de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* se realizó diluciones seriadas en tubos con medio PBS (Li et al., 2014). Se inició con un tubo con 10 mL de medio y 0,1 g del producto NEW BT 2X, el cual contiene la bacteria. De la dilución 10^{-5} y 10^{-6} se tomó 0,05 mL por placa Petri con agar nutriente, se extendió por toda la placa con un asa de Digralsky y se colocó en la incubadora a una temperatura de 30°C por 24 horas.

4.2.2.2 Preparación del inóculo inicial

Se preparó un medio de cultivo LB de 200 mL que sirvió de medio madre e inóculo inicial para los diferentes tratamientos de cada diseño experimental, el cual tuvo un tiempo de incubación de 72 horas a temperatura de 30 °C.

4.2.2.3 Formulación del medio de cultivo

Se formuló un medio de cultivo base (Navarro-Mtz et al., 2014) (tabla 6), del cual se partió para determinar la hora de mayor producción de proteína total del microorganismo.

Tabla 6.

Formulación de medio de cultivo para producción de proteína a partir de Bacillus thuringiensis var kurstaki

Compuesto	Concentración
Sacarosa	54,10 g/L
Extracto de levadura	35,37 g/L
KCl	3 g/L
MgSO ₄	0,20 mg/L
MnSO ₄	40 mg/L
CoCl ₂	30 mg/L
CuSO ₄	7,50 mg/L
ZnSO ₄	7,50 g/L
FeSO ₄	1,35 mg/L

4.2.2.4 Curva de calibrado de biomasa

Se elaboró una curva de calibrado que relaciona la densidad óptica (nm) con la concentración de biomasa (g/L), en donde se partió de un medio incubado por 72 horas y un medio estéril (Zokaeifar et al., 2014, pp.68-74). Se realizaron diluciones (tabla 7). De las diluciones realizadas se tomó 1 mL y se midió la densidad óptica de la biomasa a 600 nm en el espectrofotómetro, del sobrenadante de las diluciones se centrifugó a 10000 rpm por 7 minutos, y se realizaron dos lavados con agua destilada (centrífuga: Sigma® 3-18KS). Posteriormente se diluyó el pellet en 1 ml de agua destilada y se colocó en capuchones de aluminio, previamente secados, por 24 horas en la estufa. Pasado este tiempo se procedió a pesar los capuchones y se restó del peso inicial de los capuchones vacíos.

Tabla 7.

Diluciones realizadas para la curva de calibrado de biomasa

Medio estéril (mL)	Medio inoculado (mL)
1	12
2	11
3	10
4	9
5	8
6	7
7	6
8	5
9	4
10	3
11	2
12	1

4.2.2.5 Determinación de biomasa

La determinación de biomasa se realizó mediante el método espectrofotométrico (Arnaíz, Isac, & Lebrato, 2000). Para la curva de crecimiento se partió del medio base mencionado anteriormente, el cual se inoculó con el 10% del inóculo inicial e incubado a una temperatura de 30 °C y 150 rpm, se midió a cada hora la densidad óptica de la biomasa en términos de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm por aproximadamente 100 horas a escala de laboratorio (matraz) y 53 horas a escala de banco (biorreactor).

4.2.2.6 Curva de calibrado de proteínas totales

Se elaboró una curva de calibrado que relaciona la absorbancia (nm) con la concentración de proteína total (mg/mL). Para esto, se realizaron diluciones en microtubos de 1,5 mL (tabla 8) mediante una reacción del reactivo de Biuret

(Zheng, Wu, He, Yang, B. & Yang, Y., 2017), Se tomó como solución estándar la albúmina sérica bovina (BSA).

Tabla 8.

Diluciones para la curva de calibrado de proteína

Volumen solución estándar (uL)	Volumen agua destilada (uL)
10	90
20	80
30	70
40	60
50	50
60	40
70	30
80	20
90	10

4.2.2.7 Obtención y cuantificación de proteínas totales

Para la obtención de proteínas totales se centrifugó cada muestra obtenida del medio de cultivo por 7 min a 10000 rpm y se tomó únicamente el sobrenadante (centrífuga: Sigma® 3-18KS). A partir del sobrenadante se tomaron 0,4 mL al cual se adicionaron 0,7 mL del reactivo Biuret y se dejó reaccionar el contenido en un microtubo de 1,5 mL por 30 min con el fin de evaluar un cambio de coloración en el medio. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a cuantificar la proteína de la muestra con ayuda del espectrofotómetro mediante la medición de la absorbancia en celdas espectrofotométricas a una longitud de onda de 545 nm.

4.2.2.8 Verificaciones variables influyentes mediante Plackett-Burman

Para la determinación de las variables influyentes en la producción de toxinas mediante Plackett-Burman se realizaron 12 tratamientos con distintas

combinaciones de las variables estudiadas y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. En cada tratamiento se midió la concentración de proteína extracelular mediante el método de Biuret a las 26 horas de inoculado el matraz. La cuantificación de la proteína de la muestra se realizó con ayuda del espectrofotómetro mediante la medición de la absorbancia en celdas espectrofotométricas a una longitud de onda de 545 nm. Posteriormente los resultados se analizaron mediante el programa Minitab 17®, el cual generó 2 diagramas de Pareto, tanto para el primero como el segundo se utilizaron los mismos niveles (concentraciones) de las variables; el segundo sirvió para seleccionar las variables para realizar el Diseño Central Compuesto (DCC) rotacional 2^k .

4.2.2.9 Desarrollo del Diseño Central Compuesto (DCC) rotacional 2^k

Una vez determinadas las variables influyentes, se desarrolló el DCC rotacional 2^k que generó tres superficies de respuesta para la producción de proteína total de *Bacillus thuringiensis var kurstaki*. A la par se evaluó el crecimiento de biomasa empleando el mismo DCC, el cual generó tres superficies de respuesta. Para ello se realizaron dieciocho tratamientos con las distintas combinaciones de las variables de estudio en el medio de cultivo. Se llevaron a cabo tres repeticiones por tratamiento.

A continuación, se detallarán las condiciones de operación que se utilizaron para la producción de proteínas totales a escala de laboratorio (tabla 9).

Tabla 9.

Condiciones de operación utilizadas a escala de laboratorio

Condiciones de operación	Escala laboratorio
Agitación (rpm)	150
Temperatura (°C)	34,9
Demanda de Oxígeno (DO)	100 %

4.2.2.10 Producción de proteínas en Biorreactor (Validación y escalado en Biorreactor)

Se llevó a cabo la producción de proteínas totales de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* en un Biorreactor de 5 L que opera en modalidad Batch, con el fin de obtener masivamente las proteínas, se determinó la cinética de crecimiento del microorganismo y el rendimiento del producto obtenido (toxinas de carácter proteico). Para esto se partió del medio de cultivo en matraz en donde se obtuvo las condiciones de producción óptimas de proteínas totales. Se realizaron los cálculos de cada uno de los componentes del medio de cultivo para el biorreactor, ya montado el reactor se procedió a tomar muestras de proteína y de biomasa a cada hora, durante 60 horas aproximadamente.

A continuación, se detallan las condiciones que se utilizaron para la producción de proteínas totales a escala banco (Biorreactor) (tabla 10)

Tabla 10.

Condiciones de operación utilizadas a escala de banco

Condiciones de operación	Escala de Banco
Agitación (rpm)	150
Temperatura (°C)	34,9
Demanda de Oxígeno (DO)	100 %

4.3 Evaluación estadística de los resultados

Para el análisis de datos del diseño Plackett-Burman se utilizó el programa Minitab 17®, en donde se determinó las variables influyentes para la producción de toxinas proteicas mediante un diagrama de Pareto. Posteriormente, los valores óptimos de los diseños experimentales se determinaron mediante el programa Statistica®. Mediante este programa se obtuvieron gráficas de superficie de respuesta, gráficas de contornos y tablas de ANOVA.

5. Capítulo V. Resultados y Discusión

5.1 Caracterización e identificación del microorganismo

5.1.1 Pruebas bioquímicas

Mediante la técnica de Tinción Gram se identificó que la bacteria aislada a partir del producto NEW BT 2X (EQUAQUÍMICA, Ecuador) presenta una coloración morada bajo el microscopio, lo cual indica que es Gram positiva y su morfología es un bacilo (figura 4). Esto confirma lo mencionado por Portela, Chaparro y López (2013) en donde se indica que las células de *Bacillus thuringiensis* tienen esta coloración tras realizar una tinción Gram y presentan esta forma bacilar o de vara alargada.

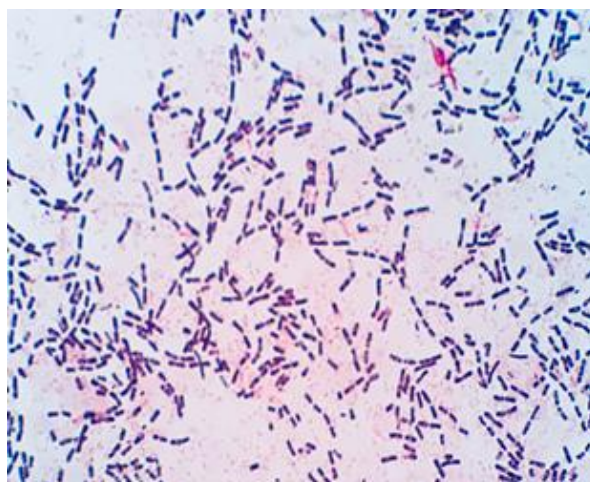


Figura 4. *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* visualizado en lente 100X usando la técnica de Tinción Gram

Para la confirmación del género *Bacillus* se realizaron 10 pruebas bioquímicas. De las 10 pruebas realizadas, se llevaron a cabo tres pruebas primarias: catalasa, oxidasa y motilidad. Las demás pruebas fueron: prueba de sulfuro de hidrógeno, prueba de indol, utilización de citrato, fermentación de manitol, hidrólisis de almidón, TSI y Ureasa.

La prueba de catalasa consistió en adicionar una gota de peróxido de hidrógeno a un frotis de una colonia aislada de *Bt* en un portaobjetos. El resultado obtenido fue positivo, es decir, se observó la formación de gas o burbujas, lo que determina que la bacteria produce la enzima catalasa, generalmente presente en bacterias aeróbicas, la cual es responsable de catalizar el proceso de descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Çınar, 2005).

Para la prueba de oxidasa se colocó un trozo de papel filtro sobre un portaobjetos que contenía un frotis de la bacteria *Bt*, al que se agregaron dos gotas del reactivo de Kovac. Se obtuvo un resultado positivo al observar un cambio de coloración a un tono violeta o morado, lo que confirma que la bacteria produce enzimas de tipo oxidasa como la citocromo oxidasa, que al entrar en contacto con el citocromo C, oxígeno atmosférico y un reactivo externo como el de Kovac (diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina - TPD), oxida el reactivo lo que da como resultado un compuesto coloreado denominado indofenol (MacFaddin, 2003, pp. 346-347).

La prueba de motilidad, indol y producción de sulfuro de hidrógeno se realizaron en un mismo tubo de ensayo con medio de cultivo SIM y se dio la siembra de la bacteria mediante una punción con asa de inoculación recta hasta el fondo del tubo. Luego de 24 horas se colocó el reactivo de Kovac. El resultado fue positivo para la motilidad de la bacteria ya que fue notoria la turbidez alrededor de la siembra y negativo para la producción de sulfuro de hidrógeno, dado que, como se observó experimentalmente y como menciona MacFaddin (2003, pp. 197-203) no se formó un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato del medio. El fundamento de esta técnica se basa en el triptófano, un aminoácido constituyente de muchas peptonas particularmente de la tripteína, que es oxidado por ciertas enzimas denominadas triptofanasas producidas por algunas bacterias para la formación indol. Luego de 48 horas no hubo producción de indol, ya que no se observó un compuesto de color rojo que, como establece MacFaddin (2003, pp. 210-214), se da por la reacción del indol con el aldehído del reactivo de Kovac.

La prueba de utilización de citrato dio un resultado negativo, dado que el medio que inicialmente era verde no tuvo un cambio de coloración a azul, lo que indica que, según MacFaddin (2003, pp. 92-93), la bacteria es incapaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo y crecimiento, por lo tanto, no hay alcalinidad resultante puesto que cuando el ácido cítrico se metaboliza se produce amonio y Na^+ . Por otro lado, al realizar la prueba de fermentación de manitol, se obtuvo un resultado negativo ya que la placa sembrada con *Bt* no cambió a una coloración amarilla, permaneció roja, y esto significa que la bacteria no es capaz de crecer en altas concentraciones de sales ni fermentar el manitol. Para la prueba de hidrólisis de almidón se cultivó la bacteria en una placa Petri con almidón y agar a 37 °C, tras 24-48 horas de crecimiento se agregó gotas de yodo a la placa quedando cubierta toda el área de la misma. El resultado fue positivo ya que se formó un halo blanco alrededor del cultivo, lo que indica que es capaz de hidrolizar el almidón mediante enzimas como las amilasas (MacFaddin, 2003, pp. 385-386).

Se realizó una prueba para determinar si la bacteria es capaz de fermentar tres carbohidratos distintos: glucosa, sacarosa y lactosa. La prueba consistió en sembrar la bacteria mediante punción con asa en punta en un tubo contenido con medio TSI (*Triple Sugar Iron Agar*). Luego de 24 horas se observó que el medio se tornó amarillo tanto en la superficie como en el fondo del tubo, lo que demuestra que la bacteria es capaz de fermentar carbohidratos como sacarosa y/o lactosa. Además, no se produjo un precipitado negro en el fondo lo que indica que la bacteria no es capaz de producir H_2S . La última prueba fue de ureasa, en donde se inoculó la bacteria en caldo de úrea en un tubo de ensayo a 37 °C y luego de 24 horas se observó un cambio de coloración del medio a rosa intenso, lo que indica que la bacteria es capaz de degradar la úrea en dos moléculas de amoníaco mediante enzimas denominadas ureasas con una alcalinidad resultante (MacFaddin, 2003, pp. 397-398).

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se resumen en la tabla 11. Algunos de estos resultados concuerdan con varias investigaciones realizadas por otros autores en donde realizan la caracterización bioquímica del microorganismo (Bok, Kim, Son y Lee, 1994; Lonc, Lecadet, Lachowicz y Panek,

1997; Drehval, Chervatiuk, Cherevach y Vinnikov, 2003; Çınar, 2005; Flores et al., 2011; Torres, 2015). Según los “Estándares para Investigaciones de Microbiología” (2015) *Bacillus thuringiensis* pertenece al grupo de *Bacillus cereus* el cual incluye a los siguientes microorganismos: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis*, Este microorganismo comparte características morfológicas y bioquímicas similares con las demás especies del grupo, que son claves para diferenciarlas de otras bacterias aeróbicas formadoras de endosporas, características como: incapacidad para producir ácido a partir del manitol y ser productoras de lecitinasa. Dos especies, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, son generalmente móviles y tres especies, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*, se describen como hemolíticas y resistentes a la penicilina.

Tabla 11.

Pruebas bioquímicas Bacillus thuringiensis var kurstaki

Prueba bioquímica	Reacción
Tinción Gram	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Motilidad	+
Presencia de H ₂ S	-
Indol	-
Utilización de citrato	-
Fermentación de manitol	-
Hidrolisis de almidón	+
TSIA (Tres azúcares y hierro)	+
Ureasa	+

5.2 Curvas de calibrado

5.2.1 Curva de calibrado de *Bacillus thuringiensis var kurstaki*

Se realizó una curva de calibrado de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* (figura 5) mediante la relación de dos métodos de medición de biomasa: densidad óptica (nm) y peso seco (g/L). Se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 3,5617x - 0,0768$ con un R^2 de 0,9968. El valor de R^2 obtenido en la curva de calibrado de biomasa se encuentra en el rango aceptable debido a que, según Suárez, Arévalo, Linares, Ustáriz, & Hernández, (2009, pp. 53-62), este coeficiente de determinación debe ser mayor a 0,95, lo que indica correspondencia entre los valores de la recta y los obtenidos de manera experimental.

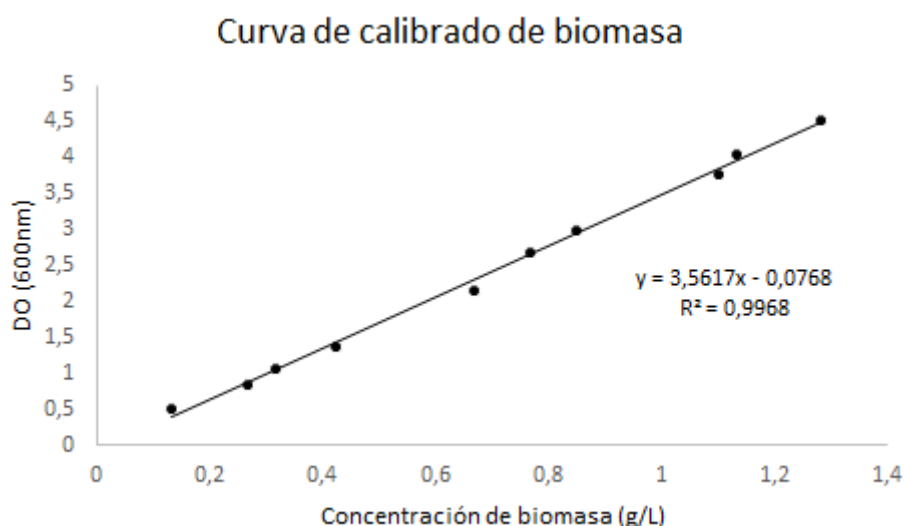


Figura 5. Curva de calibrado de *Bacillus thuringiensis var kurstaki*

5.2.2 Curva de calibrado de proteína total

Se realizó una curva de calibrado para cuantificar la proteína total obtenida a partir del extracto de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* (figura 6) mediante una reacción del reactivo Biuret, utilizando albúmina sérica bovina como solución estándar. Se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 0,0709x + 0,018$ con un R^2 de 0,997, el cual, según Suárez et al., (2009, pp. 53-62) se encuentra en el rango aceptable superior a 0,95 y con esto se determina la correspondencia

entre los valores obtenidos de manera experimental y los valores obtenidos con la recta de ajuste.

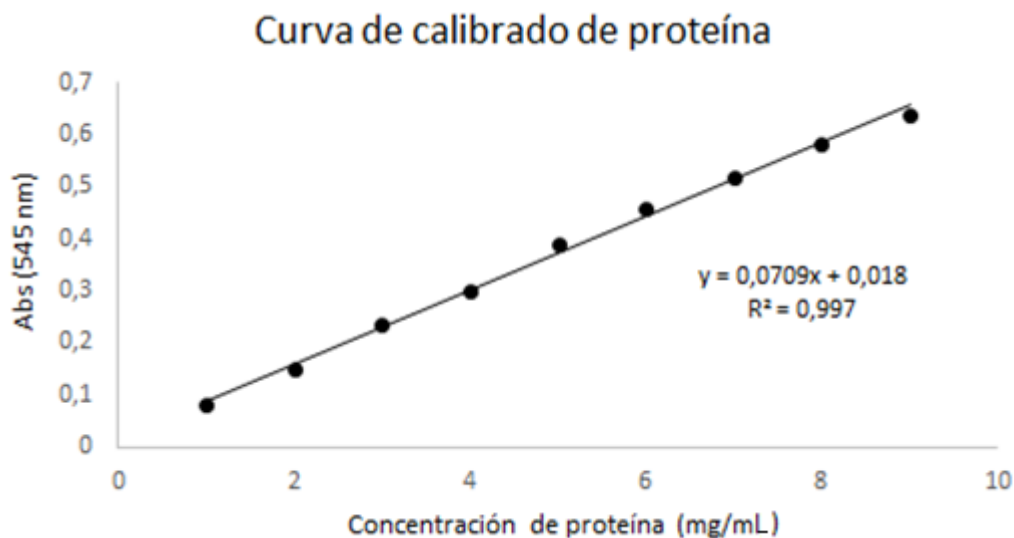


Figura 6. Curva de calibrado de proteína total

5.3 Curvas de crecimiento de biomasa

5.3.1 Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala de laboratorio

Se obtuvo una curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (figura 7) a partir de la fermentación del microorganismo en matraces Erlenmeyer, en donde se determinó la cinética de crecimiento del microorganismo tras observar sus tres fases de crecimiento en un tiempo de 100 horas. La fase de latencia, en donde el microorganismo se adapta al medio de cultivo, se produjo en un tiempo de 0 a 4 horas, la fase exponencial o logarítmica, donde se da la duplicación celular, de 5 a 14 horas aproximadamente y la fase estacionaria, cuando termina el crecimiento y empieza la producción de ciertos metabolitos, de 15 a 100 horas. Durante el tiempo transcurrido no se observó la fase de muerte del microorganismo.

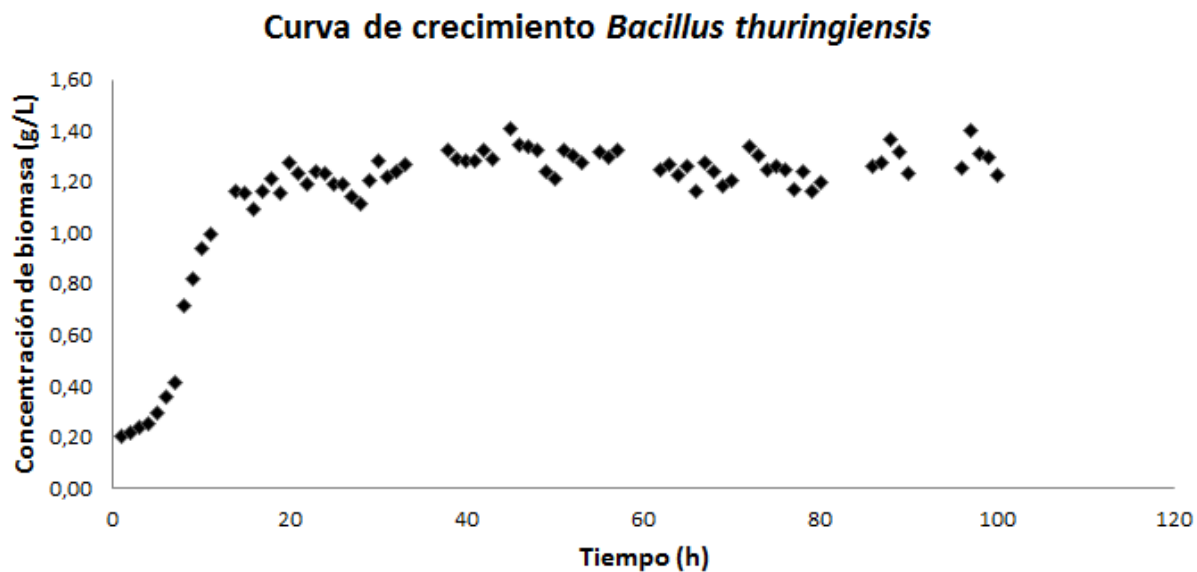


Figura 7. Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala de laboratorio

5.3.2 Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala banco

Se obtuvo una curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (figura 8) a partir de la fermentación del microorganismo en un Biorreactor de marca Applikon®, en donde se determinó la cinética de crecimiento del microorganismo tras observar sus tres fases de crecimiento en un tiempo de 53 horas. La fase de latencia se produjo en un tiempo de 0 a 3 horas, la fase exponencial o logarítmica de 4 a 10 horas aproximadamente y la fase estacionaria de 11 a 53 horas. Durante el tiempo transcurrido no se observó la fase de muerte del microorganismo.

Curva de crecimiento *Bacillus thuringiensis*

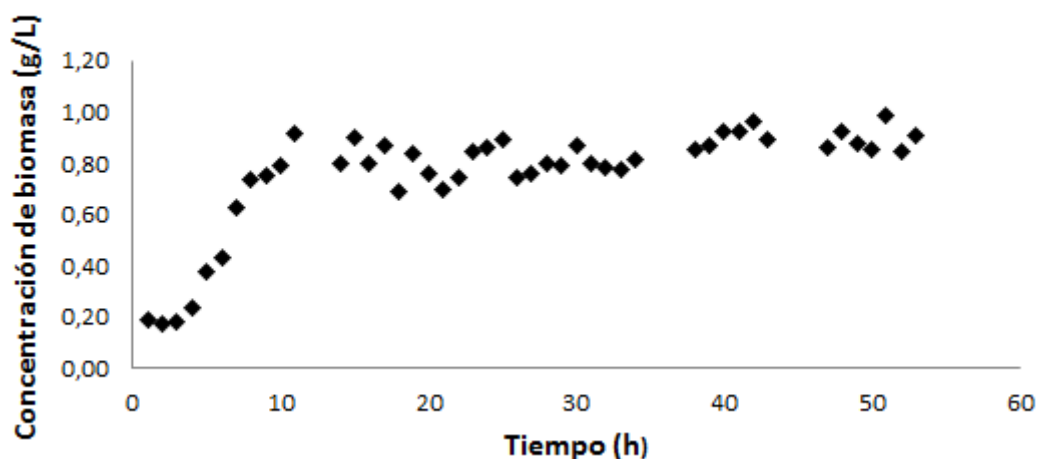


Figura 8. Curva de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala banco

Según el comportamiento observado de *Bt* tanto en la curva de crecimiento a escala de laboratorio como en la curva de crecimiento a escala banco, se deduce que, tal como lo indica Soberón et al., (2007), la bacteria presenta claramente dos fases durante su ciclo de vida: la fase vegetativa observada desde las 5 a 14 horas a escala de laboratorio y desde las 4 a 10 horas a escala de biorreactor, y la fase de esporulación observada desde las 15 a 100 horas a escala de laboratorio y de 11 a 53 horas a escala banco.

La cinética del microorganismo está determinada principalmente por la formulación del medio de cultivo que, como lo establece İçgen et al., (2002), es un paso clave en cada etapa de la bacteria, la cual obtiene todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. El medio de cultivo utilizado en esta investigación fue suplementado con los principales nutrientes como sacarosa, extracto de levadura y fosfatos, manganeso, magnesio, hierro, zinc, cobre, cobalto como sales minerales. Al suplementar sacarosa como fuente de carbono, la bacteria obtuvo la energía necesaria para los procesos anabólicos y la esporulación (Paucar, 2011). De igual manera, al suplementar extracto de levadura como fuente de nitrógeno para la formulación del mismo medio, *Bt* obtuvo los aminoácidos o péptidos necesarios para su crecimiento (Mourin et al., 2015).

En esta investigación no se observó la fase de muerte del microorganismo tras haber transcurrido 100 horas y 53 horas en escala de laboratorio y escala banco respectivamente, esto pudo deberse a que algunas fuentes se encontraban en exceso y la bacteria continuó aprovechándolas, extendiendo de esta forma su tiempo de vida al mantenerse en fase estacionaria. Otra de las posibles causas mencionada por Navarro et al., (2014) es que en la fase de esporulación no hay un consumo de fuente de carbono, por lo que esta bacteria sintetiza PHB y lo utiliza como fuente de energía para mantenerse en el medio y para la síntesis de toxinas como la proteína Cry.

En la curva de crecimiento llevada a cabo en el biorreactor, se observó que la bacteria llegó mucho más temprano a la fase de esporulación o estacionaria a comparación de la escala de laboratorio. Uno de los factores principales que pudo acelerar este proceso, además de mejores condiciones de cultivo en el tanque de fermentación, es la oxigenación controlada. Como menciona Carrera (2010), el oxígeno es la fuente principal para *Bt* para su óptimo crecimiento y producción de toxinas. Durante la fermentación se observó formación de espuma por lo que se procedió a colocar una mínima concentración de antiespumante, ya que como lo establece Fernández et al., (2009) al colocar altas concentraciones de la sustancia puede ser un limitante en la transferencia de oxígeno necesaria para la bacteria. Por esta razón, al ser mínima la cantidad añadida de antiespumante no se interrumpió la oxigenación en ningún momento de la fermentación.

5.4 Curvas de proteína total

5.4.1 Curva de proteína total producida a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala de laboratorio

A partir de un inóculo de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* en un matraz Erlenmeyer, se determinó que la mayor concentración de proteína en mg/mL producida por el microorganismo en aproximadamente 50 horas de crecimiento, es de 6,7 mg/mL en 26 horas (figura 9). Este tiempo de 26 horas se tomó como

referencia para tomar muestras del cultivo del microorganismo en todos los tratamientos llevados a cabo en los diferentes diseños experimentales.

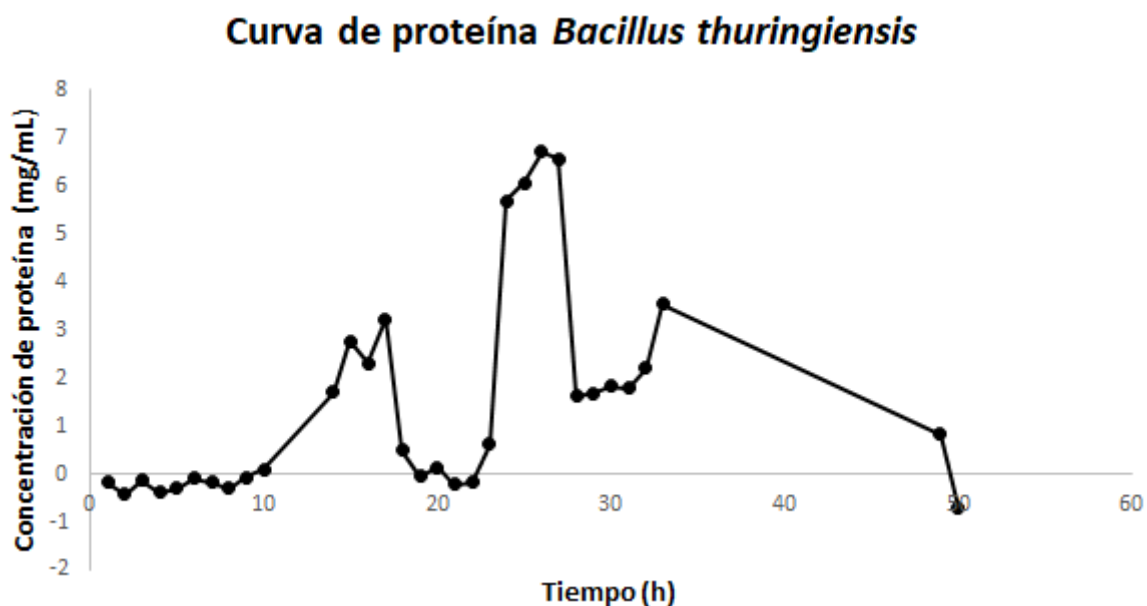


Figura 9. Curva de proteína total producida por *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala de laboratorio

5.4.2 Curva de proteína total producida a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala banco

A partir de la fermentación de *Bacillus thuringiensis* realizada en un Biorreactor de marca Applikon®, se determinó que el microorganismo llega a una alta producción de proteína, de aproximadamente 5,88 mg/mL, a las 32 horas de crecimiento y luego de este tiempo se presenta un descenso de la cantidad de producto (figura 10).

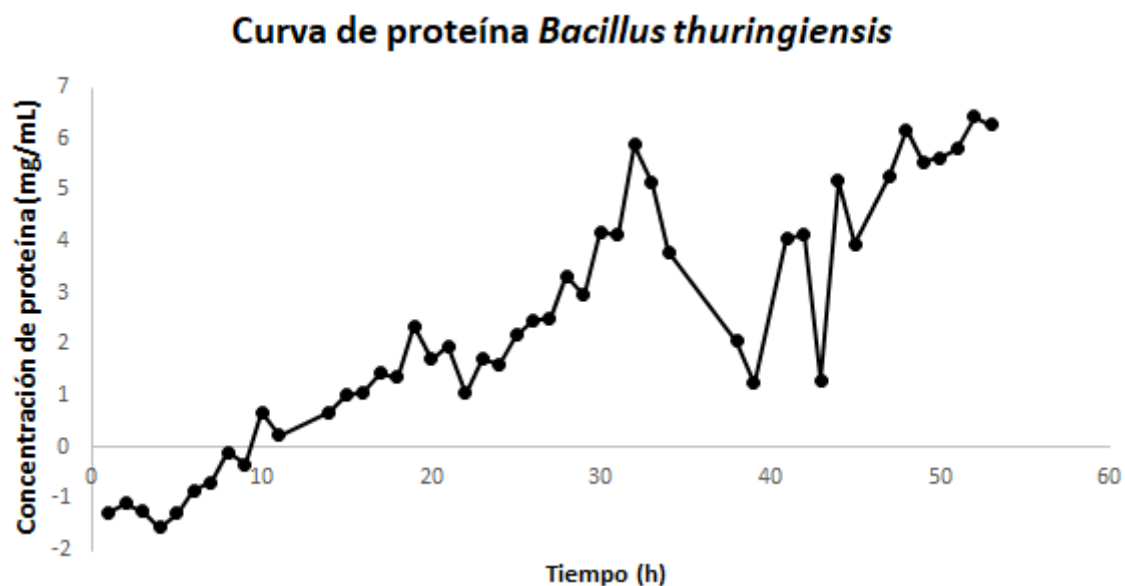


Figura 10. Curva de proteína total producida por *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* a escala banco

Como se observa en ambas curvas, la producción de proteína extracelular de *Bt* no presenta una tendencia exponencial, es decir, existen altas y bajas representadas a manera de picos, en las concentraciones obtenidas. Este fenómeno se debe a que la bacteria sintetiza precursores de proteína que son nuevamente aprovechados por la misma para formar una proteína o complejo proteico final (Navarro et al., 2014). Debido a este comportamiento, se vio la necesidad de medir experimentalmente la concentración de proteína a cada hora durante 56 horas, con el fin de determinar en qué momento la bacteria produce una mayor cantidad de proteína extracelular. En el caso de la producción de proteína evaluada a escala de laboratorio se obtuvo una mayor concentración a las 26 horas de crecimiento de *Bt*. Por otro lado, a escala de banco se observó que hubo una alta producción de proteína a las 32, 48, 52 y 53 horas, siendo a las 52 horas la máxima concentración de proteína observada. Sin embargo, se tomó como referencia la proteína obtenida a las 32 horas ya que resulta en un menor tiempo y costo de producción.

5.5 Parámetros cinéticos de *Bacillus thuringiensis var kurstaki*

Tabla 12.

Parámetros cinéticos de Bacillus thuringiensis var kurstaki

Parámetro	Fórmula	Resultados	
		Escala de laboratorio	Escala banco
Velocidad específica de crecimiento	$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{\Delta t}$	0,02 h ⁻¹	0,03 h ⁻¹
Velocidad máxima de crecimiento	$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$	0,15 h ⁻¹	0,24 h ⁻¹
Tiempo de duplicación	$td = \frac{\ln 2}{\mu}$	4,62 h ⁻¹	2,88 h ⁻¹
Productividad global de biomasa	$Y_{X_{global}} = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{t_f - t_0}$	0,01 gL ⁻¹ h ⁻¹	0,01 gL ⁻¹ h ⁻¹
Productividad máxima de biomasa	$Y_{X_{max}} = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}$	0,09 gL ⁻¹ h ⁻¹	0,09 gL ⁻¹ h ⁻¹
Productividad específica máxima de proteína	$q_p = \frac{dP}{dt} * \frac{1}{X}$	0,22 h ⁻¹	0,16 h ⁻¹
Productividad volumétrica máxima de proteína	$Q_p = \frac{dP}{dt}$	1,47 gL ⁻¹ h ⁻¹	0,95 gL ⁻¹ h ⁻¹

Se han realizado investigaciones de *Bacillus thuringiensis* en donde se evalúan los parámetros cinéticos de este microorganismo probando diferentes requerimientos nutricionales. Este es el caso de Paucar (2011), en donde se obtuvo una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0,132 h⁻¹, una velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) de 0,177h⁻¹ y un tiempo de duplicación (Td) de 5,25 h en una escala de 1 y 7 litros, en donde se utilizó un medio de cultivo basado principalmente de melaza y dos fuentes de nitrógeno: extracto de levadura y harina de soya. Al comparar con los resultados obtenidos tanto a

escala de laboratorio como a escala banco, se demuestra que *Bt* utiliza las diferentes fuentes ya sea para su crecimiento o para producir toxinas proteicas. La melaza es una hexosa la cual contiene aminoácidos y vitaminas que potencian su crecimiento y es por ello que existe una mayor concentración de células en menor tiempo. En esta investigación se observó que la cantidad de biomasa obtenida en ambas curvas de crecimiento fue baja con respecto a otras investigaciones, por lo tanto, los parámetros cinéticos de μ y μ_{max} son valores bajos. Se asumió que el medio de cultivo fue adecuado para potenciar la producción de proteínas más no el crecimiento de *Bt*, de esta forma se determinó que la cantidad de proteína no depende de la biomasa. Existen otras condiciones que afectan la concentración de las células durante la fermentación, una de ellas es la oxigenación. Según Carrera (2010), el oxígeno es la principal fuente de *Bacillus thuringiensis*, debido a que necesita gas especialmente en la fase exponencial de crecimiento. No obstante, a escala de laboratorio es difícil colocar oxígeno en un matraz. A escala de banco se proporcionó oxígeno a la bacteria, sin embargo, hubo un problema técnico con el funcionamiento del biorreactor con respecto a la salida de oxígeno, por ende, no se logró controlar este factor importante para el crecimiento de *Bt*.

5.6 Determinación de variables influyentes a partir del diseño Plackett-Burman

5.6.1 Plackett-Burman 1

Se obtuvo un primer diagrama de Pareto de efectos estandarizados mediante el programa Minitab 17® (figura 11), en donde se determinó que, de las 11 variables establecidas en el diseño experimental, siete de ellas resultaron influyentes para la producción de proteína a partir de *Bacillus thuringiensis*: KCl, FeSO₄, MnSO₄, Agitación, Extracto de levadura, CoCl₂ y temperatura.

Según Carrillo et al., (2014), el diseño Plackett-Burman, es un método estadístico en donde se evalúa la influencia de las variables de estudio de manera individual con respecto a la variable de respuesta. En esta investigación se analizaron 11

variables consideradas las más importantes tanto para el crecimiento como para la producción de toxinas. Según el mismo autor este método es el más adecuado para conocer si la variación de un factor afecta al resultado de un proceso experimental. Se seleccionaron estas 11 variables debido a que, según Hernández, (2014) los requerimientos nutricionales como la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, KCl, FeSO₄, MnSO₄, CoCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, y de operación como temperatura y agitación son indispensables para este microorganismo, siendo algunas variables de mayor importancia para la producción de proteínas.

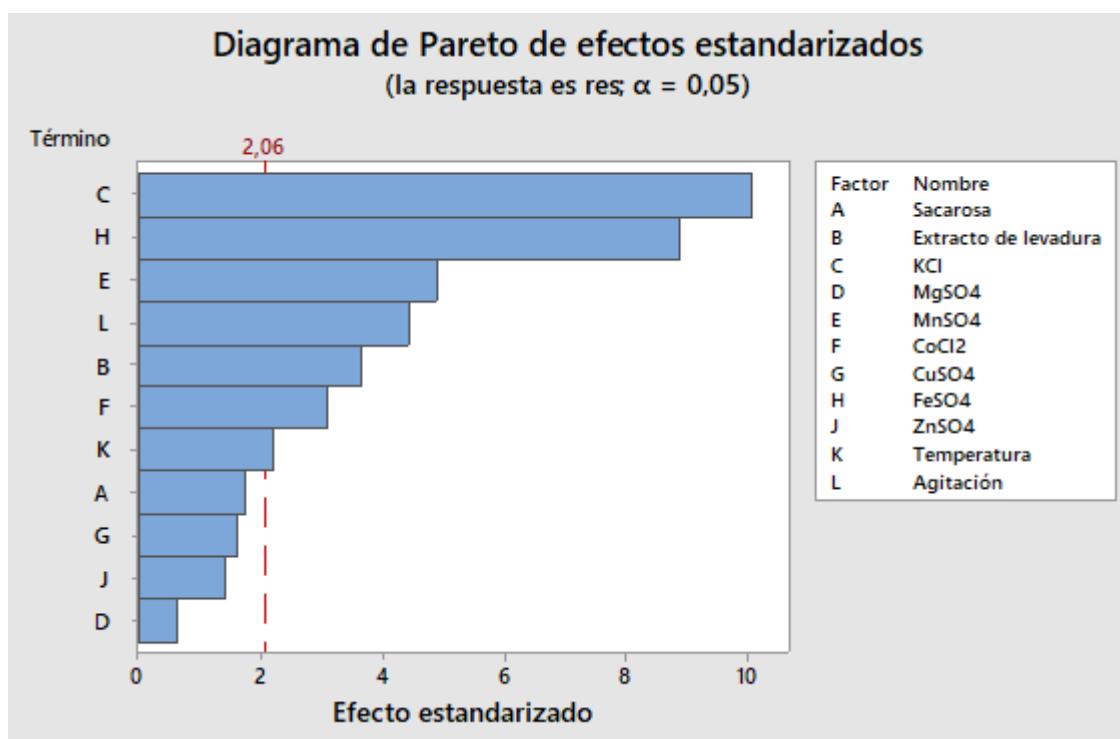


Figura 11. Primer diagrama de Pareto de las variables influyentes para la producción de proteína total a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*

5.6.2 Plackett-Burman 2

Se obtuvo un segundo diagrama de Pareto para definir las variables influyentes en la producción de proteína a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*, en donde se mantuvieron los mismos niveles utilizados en el primer diseño de Plackett-Burman (figura 12). Se obtuvo que, de las siete variables resultantes del primer diagrama de Pareto, cuatro fueron las influyentes para la producción de

proteína, de las cuales se seleccionaron tres: CoCl_2 , FeSO_4 y temperatura, para llevar a cabo los Diseños Centrales Compuestos.

Según varias investigaciones, las variables resultantes influyentes tienen algunos efectos importantes para *Bacillus thuringiensis*. La primera variable influyente fue CoCl_2 . Guerra et al., (2012), mencionan que el Co^{2+} de manera general, promueve el crecimiento de algunos microorganismos. Por otro lado, Luo et al., (2013) encontraron que CoCl_2 incrementa la actividad proteasa de la proteína Bmp 1 producida por *Bt*, que es considerada una metaloproteinasa tóxica para nemátodos. Sin embargo, no existen otras investigaciones que impliquen únicamente el efecto de esta variable en *Bacillus thuringiensis*.

La segunda variable influyente fue FeSO_4 en donde Ennouri et al., (2015) mencionan que la ausencia de este mineral limita el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y altas concentraciones de FeSO_4 inhibe tanto la producción de endotoxinas como promover la actividad de proteasas, es por ello que en esta investigación se utilizó concentraciones en orden de mg/L de hierro, debido a las repercusiones que causa altas cantidades de este mineral al microorganismo. Guerra et al., (2015) también indican que las concentraciones adecuadas de hierro para *Bacillus thuringiensis* varían entre 10^{-5} y 10^{-8} M, lo que concuerda con la concentración utilizada en esta investigación.

La tercera variable resultante influyente es la temperatura. Portela-Dussán et al., (2013), indican que la temperatura óptima para el crecimiento, formación de esporas y endotoxinas es entre 30 y 35°C. De acuerdo con una investigación realizada por Ignatenko et al., (1983), temperaturas mayores a 40°C inhiben la producción de esporas y según este mismo autor la temperatura óptima para este microorganismo está un rango muy amplio entre 20 a 35°C dependiendo de la variedad de *Bacillus thuringiensis*.

Finalmente, la cuarta variable influyente es KCl. Beltrán & Zamora, (1998) mencionan que este mineral es indispensable para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y la formación de esporas y endotoxinas, cabe recalcar que KCl no fue tomado en cuenta como variable de estudio de los diseños centrales

compuestos debido a su baja influencia frente a la producción de proteína. Únicamente las tres primeras variables influyentes se estudiaron en los siguientes diseños.

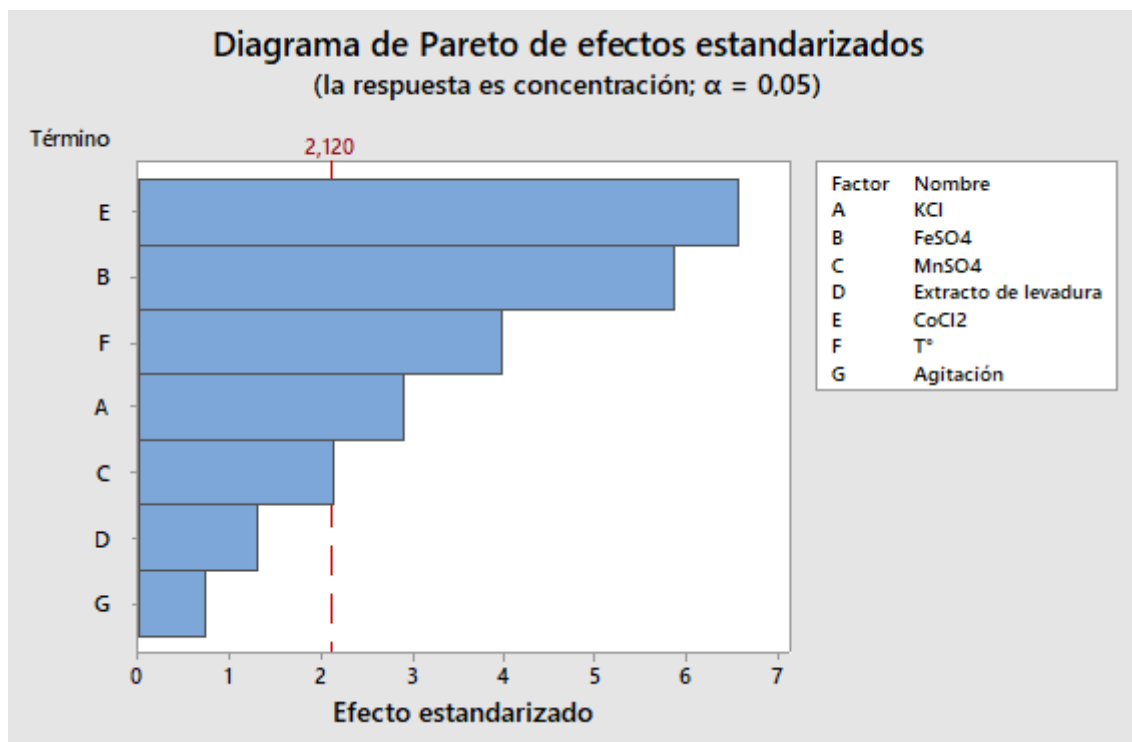


Figura 12. Segundo diagrama de Pareto de las variables influyentes para la producción de proteína total a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*

5.7 Diseño Central Compuesto (DCC) para la producción de proteína total a partir de *Bacillus thuringiensis*

5.7.1 Concentración de proteína total en los tratamientos del DCC

Se realizó un gráfico de barras con las concentraciones de proteína total obtenidas en cada tratamiento del diseño central compuesto (figura 13), en donde las mayores concentraciones de proteína se obtuvieron en los tratamientos 15, 16, 17 y 18 los cuales son los puntos centrales del diseño experimental. De igual manera, se realizó barras de error con la desviación estándar presentando un error bajo en todos los tratamientos.

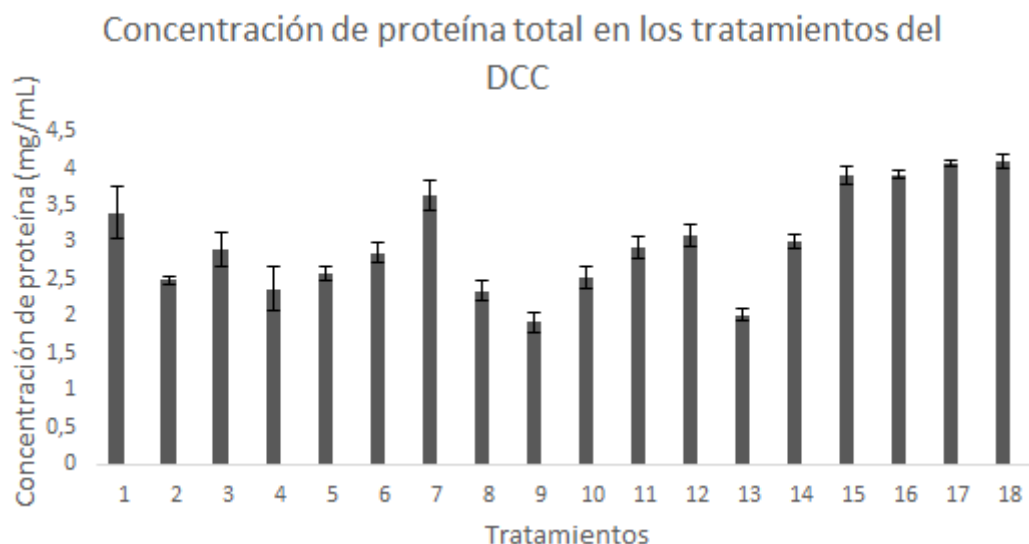


Figura 13. Concentración de proteína total de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* en los tratamientos del DCC con barras de error

5.7.2 Superficies de respuesta

A partir del Diseño Central Compuesto se obtuvieron tres superficies de respuesta con respecto a la proteína total producida a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (figuras 14, 16 y 18). Estas gráficas se obtuvieron mediante el programa Statistica®.

En la primera gráfica de superficie de respuesta la variable dependiente es la proteína total (eje Z) y las variables independientes son FeSO_4 (eje Y) y CoCl_2 (eje X) (figura 14). Mediante la gráfica se determinó que el valor máximo de proteína fue 4,09 mg/mL, representado en la zona roja más oscura de la gráfica. Para alcanzar esta concentración de proteína los rangos recomendados de CoCl_2 y FeSO_4 en el medio de cultivo son 25-35 mg/L y 1,2-1,6 mg/L respectivamente, siendo los valores óptimos cercanos a 30 mg/L CoCl_2 y 1,35 mg/L de FeSO_4 . Lo detallado anteriormente se visualiza de manera más clara en la figura 15 (Gráfica de contornos).

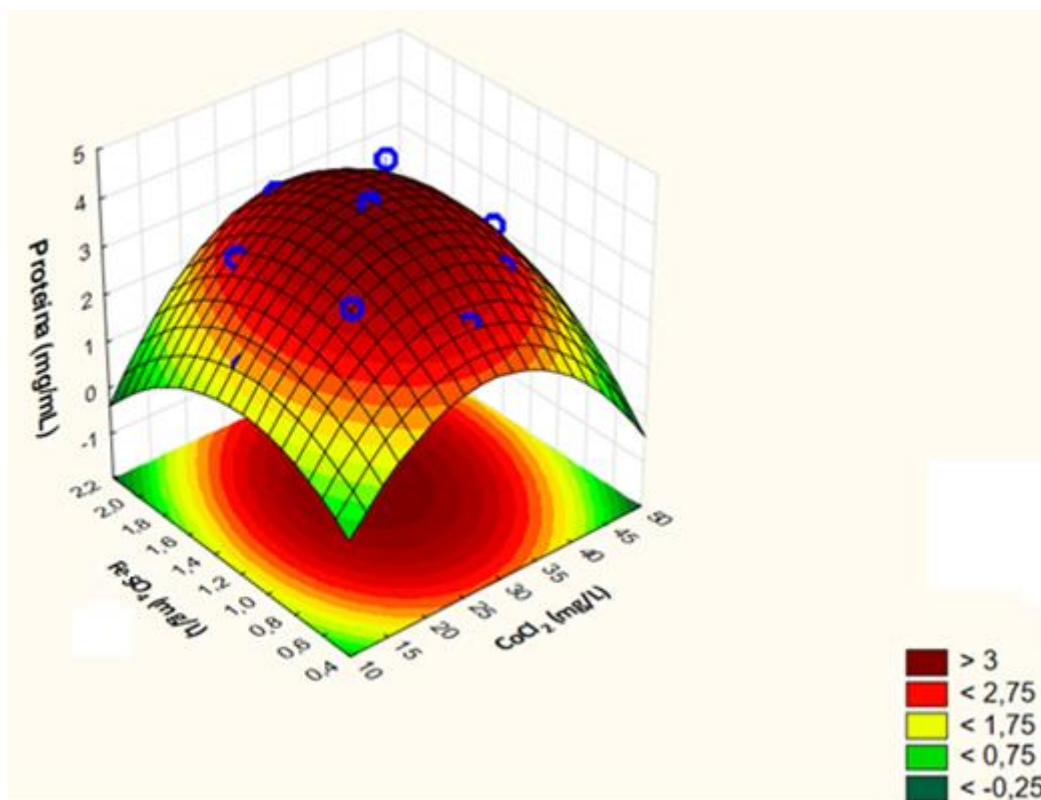


Figura 14. Superficie de respuesta obtenido a partir del diseño central compuesto donde la variable dependiente es la proteína total (eje Z) y las variables independientes son FeSO₄ (eje Y) y CoCl₂ (eje X)

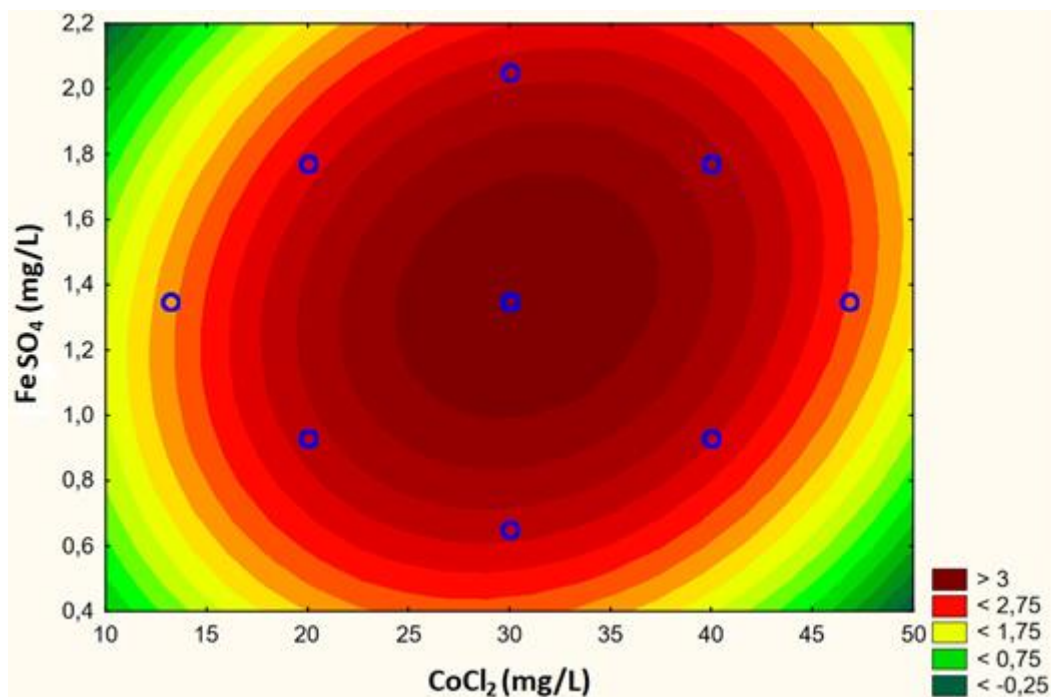


Figura 15. Gráfica de contornos de las variables independientes (FeSO₄ y CoCl₂) con respecto a la variable dependiente (proteína total)

En la segunda gráfica de superficie de respuesta, la variable dependiente es la proteína total (eje Z) y las variables independientes son temperatura (eje Y) y CoCl_2 (eje X) (figura 16). Mediante la gráfica se determinó que el valor máximo de proteína fue 4,09 mg/L, representado en la zona roja más oscura de la gráfica. Para obtener tal concentración de proteína los rangos recomendado de CoCl_2 y temperatura en el medio de cultivo son 25-35 mg/L y 34,5-35,5°C respectivamente, siendo los valores óptimos cercanos a 30 mg/L CoCl_2 y 35 °C de temperatura. Lo detallado anteriormente se visualiza de manera más clara en la figura 17 (Gráfica de contornos).

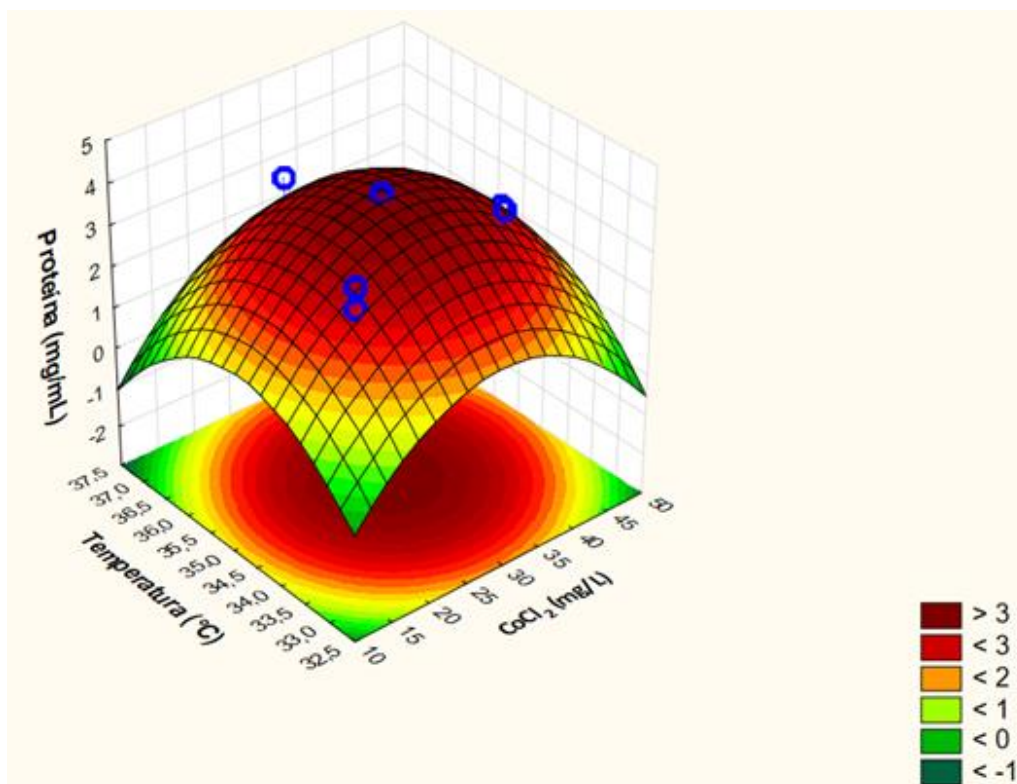


Figura 16. Superficie de respuesta obtenido a partir del diseño central compuesto donde la variable dependiente es la proteína total y las variables independientes son temperatura y CoCl_2

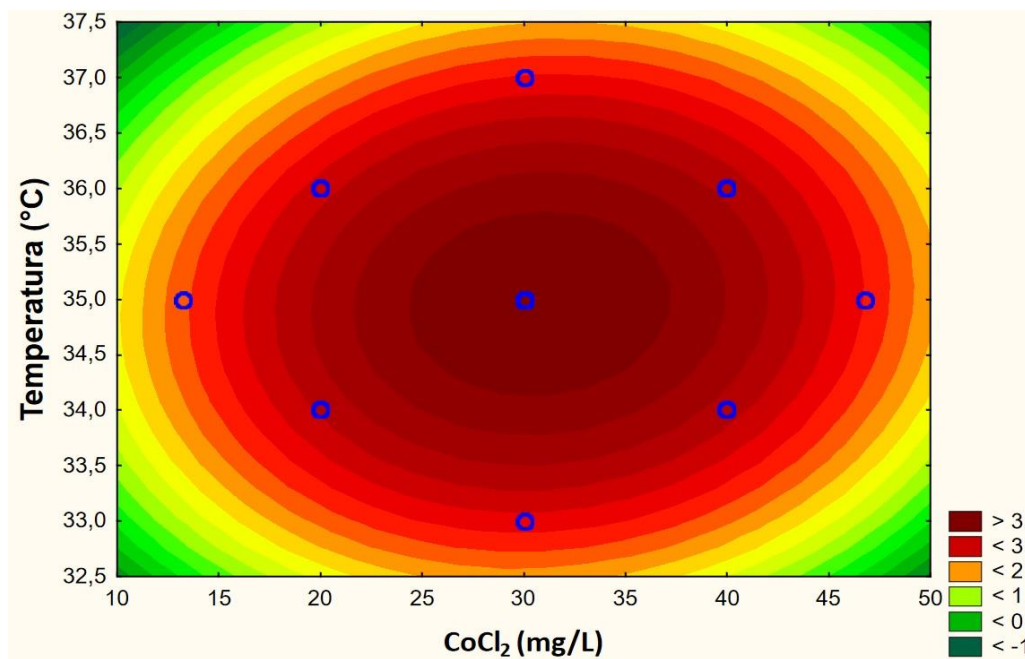


Figura 17. Gráfica de contornos de las variables independientes (temperatura y CoCl_2) con respecto a la variable dependiente (proteína total)

En la tercera gráfica de superficie de respuesta, la variable dependiente es la proteína total (eje Z) y las variables independientes son FeSO_4 (eje Y) y temperatura (eje X) (figura 18). Se determinó que el valor máximo de proteína fue 4,09 mg/L, representado en la zona roja más oscura de la gráfica. Para alcanzar esta concentración de proteína los rangos recomendado de FeSO_4 y temperatura en el medio de cultivo son 1,0-1,6 mg/L y 34,5-35,5 $^{\circ}\text{C}$ respectivamente, siendo los valores óptimos cercanos a 1,35 mg/L de FeSO_4 y 35 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura. Lo detallado anteriormente se observa de manera más clara en la figura 19, representado por zona roja más oscura (Gráfica de contornos).

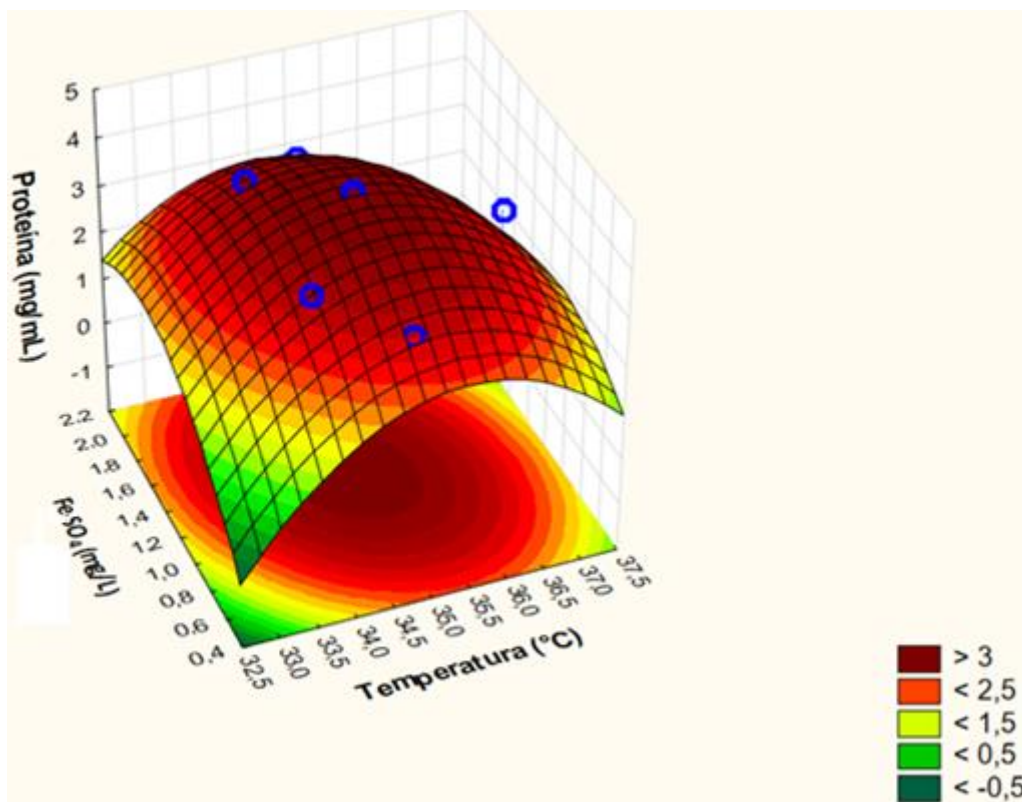


Figura 18. Superficie de respuesta obtenido a partir del diseño central compuesto donde la variable dependiente es la proteína total y las variables independientes son FeSO_4 y temperatura

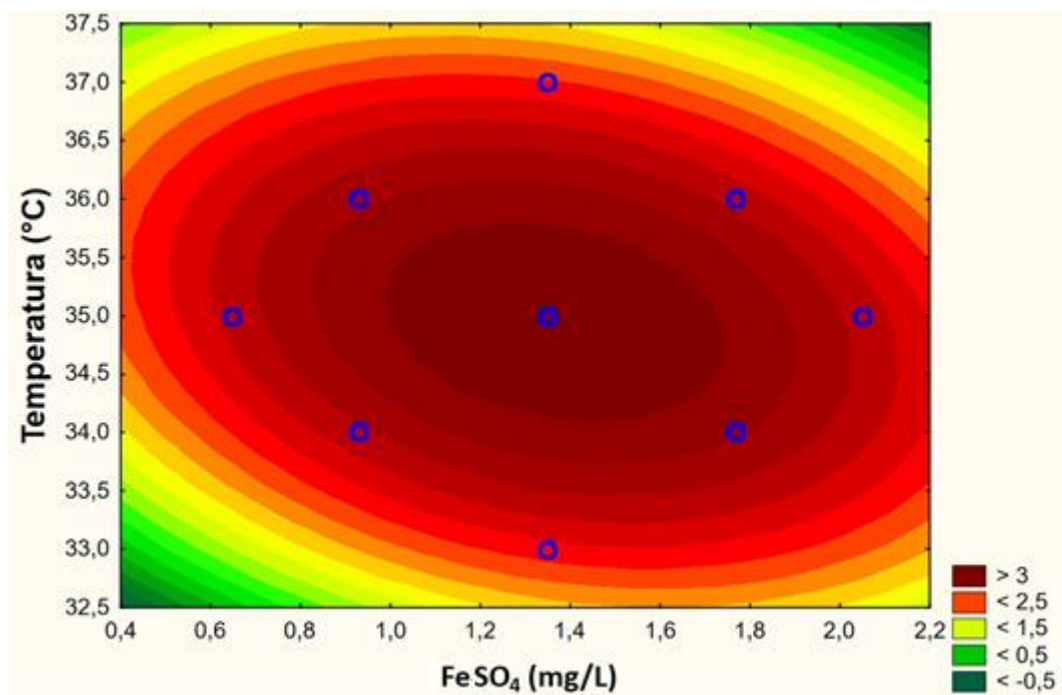


Figura 19. Gráfica de contornos de las variables independientes (FeSO_4 y temperatura) con respecto a la variable dependiente (proteína total)

Las tres gráficas de superficie de respuesta obtenidas tras el DCC reflejan un resultado satisfactorio, ya que mediante la determinación de su curvatura y un modelo matemático (5.7.4), se obtuvieron los valores óptimos tanto de las variables independientes como de la variable dependiente. Estos valores óptimos arrojados por el DCC coinciden con los valores centrales establecidos para llevar a cabo el diseño, lo que indica la reproducibilidad del mismo.

5.7.3 Análisis estadístico

A partir del análisis de varianza (ANOVA) obtenido de los DCC se determinó que existe diferencia significativa para la variación cuadrática (Q) en algunas variables estudiadas, con relación a la producción de proteína a partir de *Bacillus thuringiensis* como se observa en las zonas resaltadas de la tabla 13. Según lo mencionado por Cumming, Fidler & Vaux (2007) tanto la temperatura como la concentración de CoCl_2 son estadísticamente significativos para la producción de proteína total debido a que el valor de probabilidad p es $<0,05$. En la misma tabla se observa que el diseño se ajusta al modelo matemático en un 76,32%. De acuerdo a lo indicado por Valderrama, (2003) el valor obtenido de coeficiente de determinación (R^2) es totalmente aceptable debido a que se trata de procesos biológicos, que presentan cambios de idealidad, por lo tanto, cuando se trata de un diseño central compuesto, es decir de un modelo cuadrático se acepta hasta un R^2 0,70 (70%). No obstante, no existe diferencia significativa lineal (L) de las tres variables estudiadas (CoCl_2 , FeSO_4 y temperatura) debido a que el valor de probabilidad es \geq que 0,05. Asimismo, no hay relación entre las tres variables, es decir, son independientes una de otra para la producción de proteína total de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla 13.

Análisis de varianza del DCC para la producción de proteína a partir de Bacillus thuringiensis var kurstaki

ANOVA					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) CoCl ₂ (mg/L) (L)	0,118	1	0,118	0,486	0,505
CoCl ₂ (mg/L) (Q)	4,251	1	4,251	17,539	0,003
(2) FeSO ₄ (mg/L) (L)	0,003	1	0,003	0,011	0,921
FeSO ₄ (mg/L) (Q)	1,172	1	1,172	4,837	0,059
(3) Temperatura (°C) (L)	0,014	1	0,014	0,059	0,814
Temperatura (°C) (Q)	2,794	1	2,794	11,527	0,009
1L by 2L	0,168	1	0,168	0,694	0,429
1L by 3L	0,022	1	0,022	0,091	0,771
2L by 3L	0,180	1	0,180	0,743	0,414
Error	1,939	8	0,242		
Total SS	8,188	17			

Var.:Proteína (mg/mL); R-sqr=0,76321;
3 factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Residual=0,2423588
DV: Proteína (mg/mL)

5.7.4 Determinación del valor óptimo

El valor óptimo se obtuvo a partir de los coeficientes determinados en el diseño central compuesto y mediante la siguiente ecuación (modelo de segundo orden con 3 variables):

Modelo de segundo orden con 3 variables

$$\mu_y = \beta_0 + \beta X + \beta Y + \beta Z + \beta XY + \beta XZ + \beta YZ + \beta X^2 + \beta Y^2 + \beta Z^2 \quad (\text{Ecuación 1})$$

en donde μ_y es la variable dependiente o de respuesta, β_0 es el intercepto en la ordenada y X, Y, Z son los coeficientes que representan las variables

independientes. Por lo tanto, este modelo según Quevedo y Pérez (2014) es utilizado cuando las variables de estudio no intervienen entre sí. Se reemplazó cada uno de los coeficientes y a partir de ello se realizó un proceso matemático denominado derivación. Derivada la fórmula se realizó un sistema de ecuaciones de tres incógnitas en donde obtuvo el valor de X, Y, Z, dando como resultado los valores óptimos de las variables analizadas (tabla 14).

Tabla 14.

Valor óptimo de las variables analizadas en el diseño central compuesto de proteína total

CoCl ₂ (X)	FeSO ₄ (Y)	Temperatura (Z)
30, 83 mg/L	1, 37 mg/L	34.9°C

Ya obtenidos los valores de X, Y, Z, es decir CoCl₂, FeSO₄ y temperatura respectivamente, se reemplazó los datos en la ecuación 5.1 para obtener el valor óptimo de proteína. El valor óptimo de proteína total obtenido a partir del diseño central compuesto fue de 4.0 mg/mL

El modelo matemático generado por las superficies de respuesta permitió deducir que, a una concentración de 30, 83 mg/L de CoCl₂, 1,37 mg/L de FeSO₄ y a 34,9 °C, la producción de proteína total calculada fue máxima y tomó un valor de 4 mg/mL. De manera experimental, al utilizar estas condiciones de cultivo y de operación, se obtuvieron concentraciones de proteína entre 3,6 y 4,5 mg/mL, lo que demuestra que el modelo matemático es una representación aproximada de la influencia del CoCl₂, FeSO₄ y la temperatura frente a la producción de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*.

Los valores óptimos de las variables independientes obtenidos tras realizar el DCC, coincidieron con los valores seleccionados a partir de varios trabajos realizados por otros autores, en donde se muestran las concentraciones de los nutrientes presentes en el medio de cultivo para la producción de toxinas por parte de *Bacillus thuringiensis* (Bok et al., 2003; Ben, Jaoua, Zouari, 2013;

Ennouri y et al., 2013; Navarro et al., 2014). Se realizaron repeticiones con estas concentraciones con el fin de verificar los valores obtenidos, determinando de esta forma que el rango de experimentación para cada variable fue el adecuado para obtener una máxima concentración de proteína a partir de *Bt*.

5.8 Diseño Central Compuesto (DCC) para la obtención de biomasa de *Bacillus thuringiensis*

5.8.1 Concentración de biomasa en los tratamientos del DCC

Se realizó un gráfico de barras con las concentraciones de biomasa obtenido en cada tratamiento del diseño central compuesto (figura 20), en donde se obtuvieron concentraciones similares en todos los tratamientos, sin embargo, los tratamientos con mayor concentración son los 15, 16, 17, los cuales fueron los puntos centrales del diseño experimental. De igual manera, se realizó barras de error con la desviación estándar presentando un error bajo en todos los tratamientos.

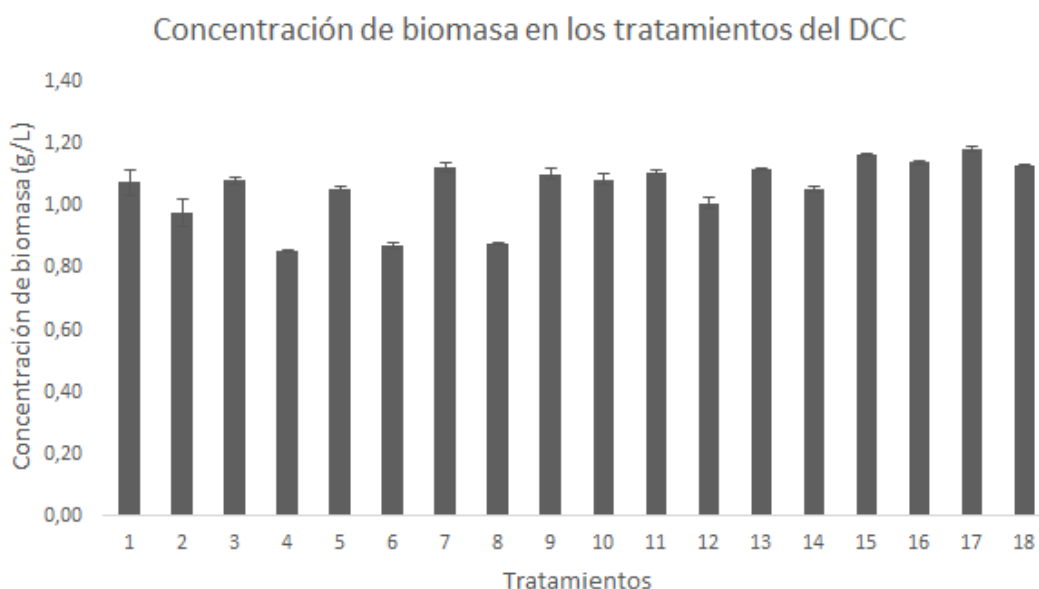


Figura 20. Concentración de biomasa de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* en los tratamientos del DCC con barras de error

5.8.2 Superficies de respuesta

A partir del diseño central compuesto se obtuvieron tres superficies de respuesta con respecto a la biomasa obtenida partir de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* (figuras 21, 23 y 25). Estas gráficas se obtuvieron mediante el programa Statistica®.

En la primera gráfica de superficie de respuesta la variable dependiente es la biomasa (eje Z) y las variables independientes son FeSO_4 (eje Y) y CoCl_2 (eje X) (figura 21). Mediante la gráfica se determinó que el valor máximo de biomasa fue 1,1846 g/L, representado en la zona roja más oscura de la gráfica. Para alcanzar esta concentración de biomasa los rangos recomendados de CoCl_2 y FeSO_4 en el medio de cultivo son 25-32 mg/L y 1,2-1,4 mg/L respectivamente, siendo los valores óptimos cercanos a 30 mg/L CoCl_2 y 1,35 mg/L de FeSO_4 . Lo detallado anteriormente se visualiza de manera más clara en la figura 22 (Gráfica de contornos).

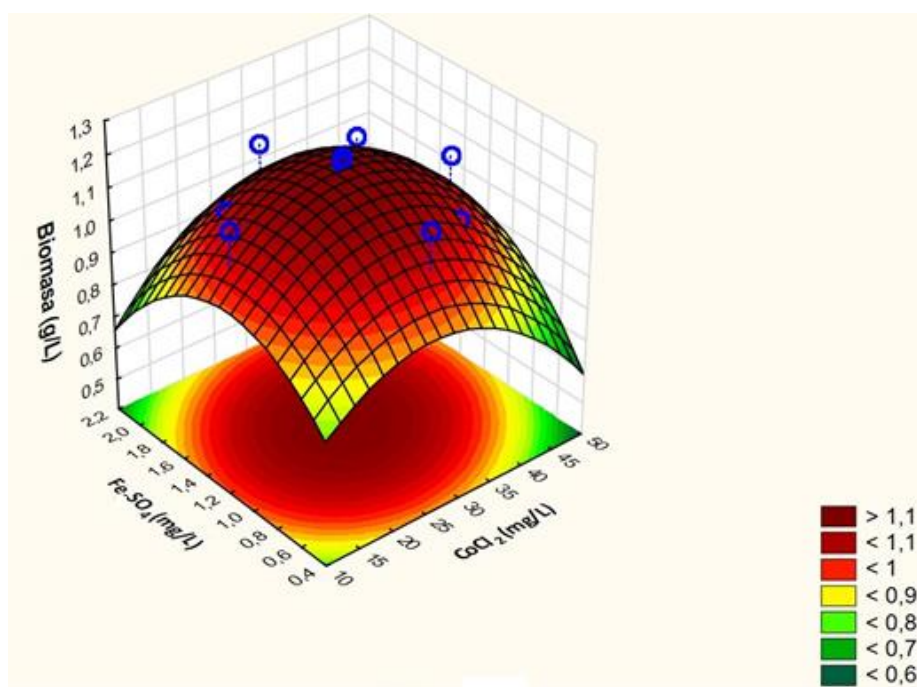


Figura 21. Superficie de respuesta obtenido a partir del diseño central compuesto donde la variable dependiente es la biomasa (eje Z) y las variables independientes son FeSO_4 (eje Y) y CoCl_2 (eje X)

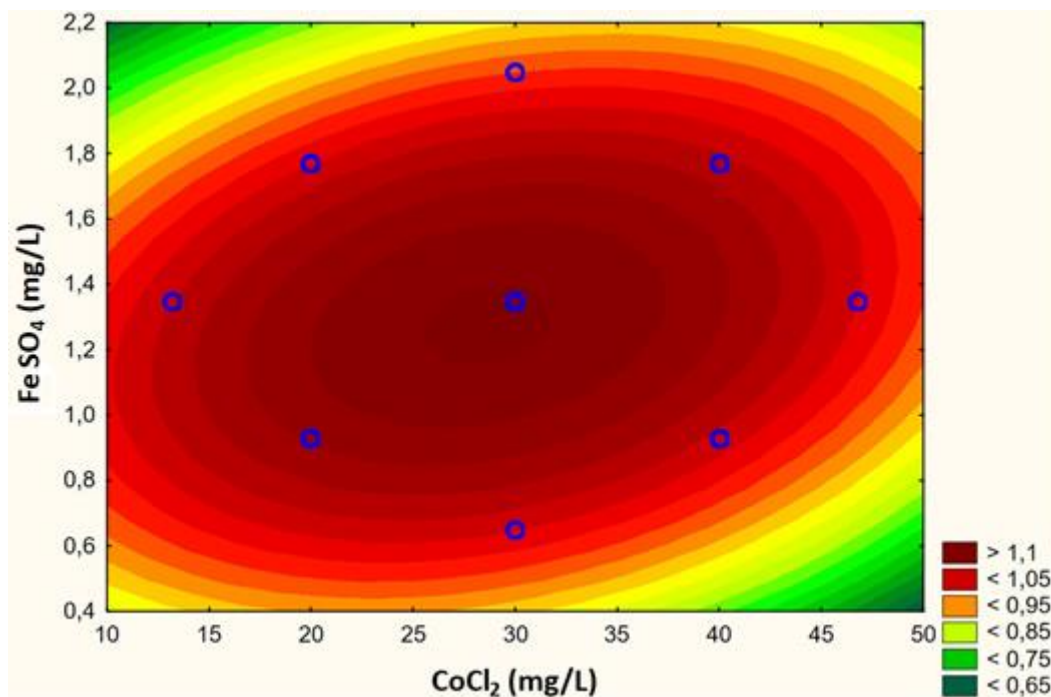


Figura 22. Gráfica de contornos de las variables independientes (FeSO_4 y CoCl_2) con respecto a la variable dependiente (biomasa)

En cuanto a la segunda gráfica de superficie de respuesta, la variable dependiente es la biomasa (eje Z) y las variables independientes son temperatura (eje Y) y CoCl_2 (eje X) (figura 23). Mediante la gráfica se determinó que el valor máximo de biomasa fue 1,1846 g/L, representado en la zona roja más oscura de la gráfica. Para obtener tal concentración de biomasa los rangos recomendados de CoCl_2 y temperatura en el medio de cultivo son 27-35 mg/L y 33,5-35°C respectivamente, siendo los valores óptimos cercanos a 30 mg/L CoCl_2 y 35 °C de temperatura. Lo detallado anteriormente se visualiza de manera más clara en la figura 24 (Gráfica de contornos).

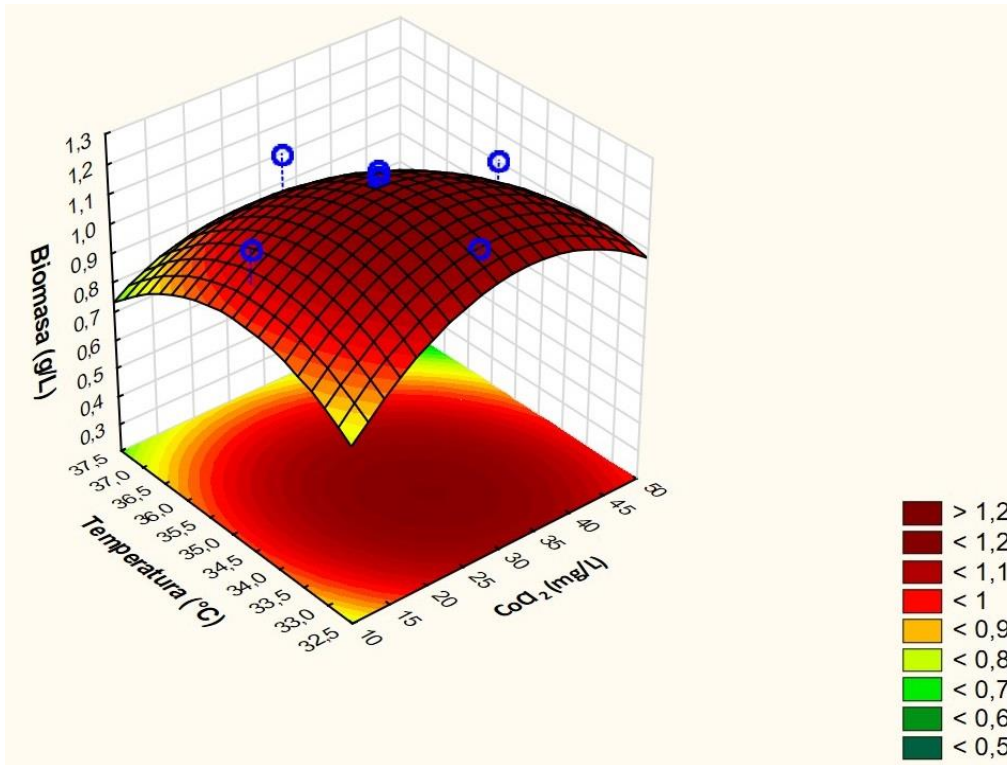


Figura 23. Superficie de respuesta obtenido a partir del diseño central compuesto donde la variable dependiente es la biomasa y las variables independientes son temperatura y CoCl_2

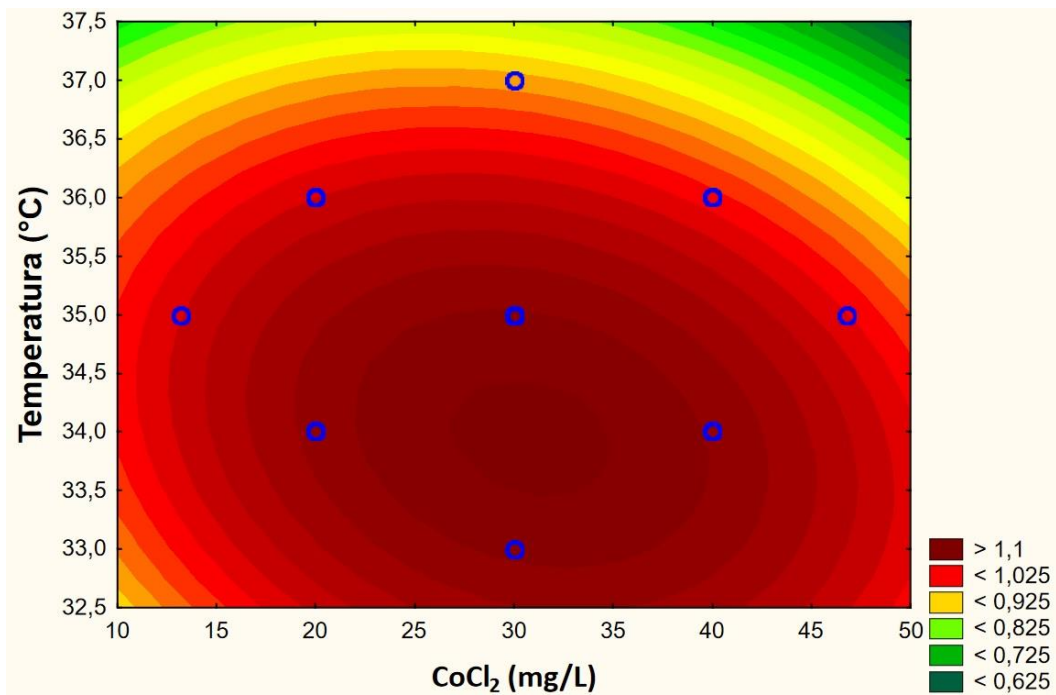


Figura 24. Gráfica de contornos de las variables independientes (temperatura y CoCl_2) con respecto a la variable dependiente (biomasa)

En la tercera gráfica, la variable dependiente es la biomasa (eje Z) y las variables independientes son FeSO_4 (eje X) y temperatura (eje Y) (figura 25). Se determinó que el valor máximo de biomasa fue 1,1846 g/L, representado en la zona roja más oscura de la gráfica. Para alcanzar esta concentración de biomasa los rangos recomendados de FeSO_4 y temperatura en el medio de cultivo son 1,3-1,5 mg/L y 33,5-35 °C respectivamente, siendo los valores óptimos cercanos a 1,35 mg/L de FeSO_4 y 35 °C de temperatura. Lo detallado anteriormente se visualiza en detalle en la figura 26, representado por zona roja más oscura (Gráfica de contornos).

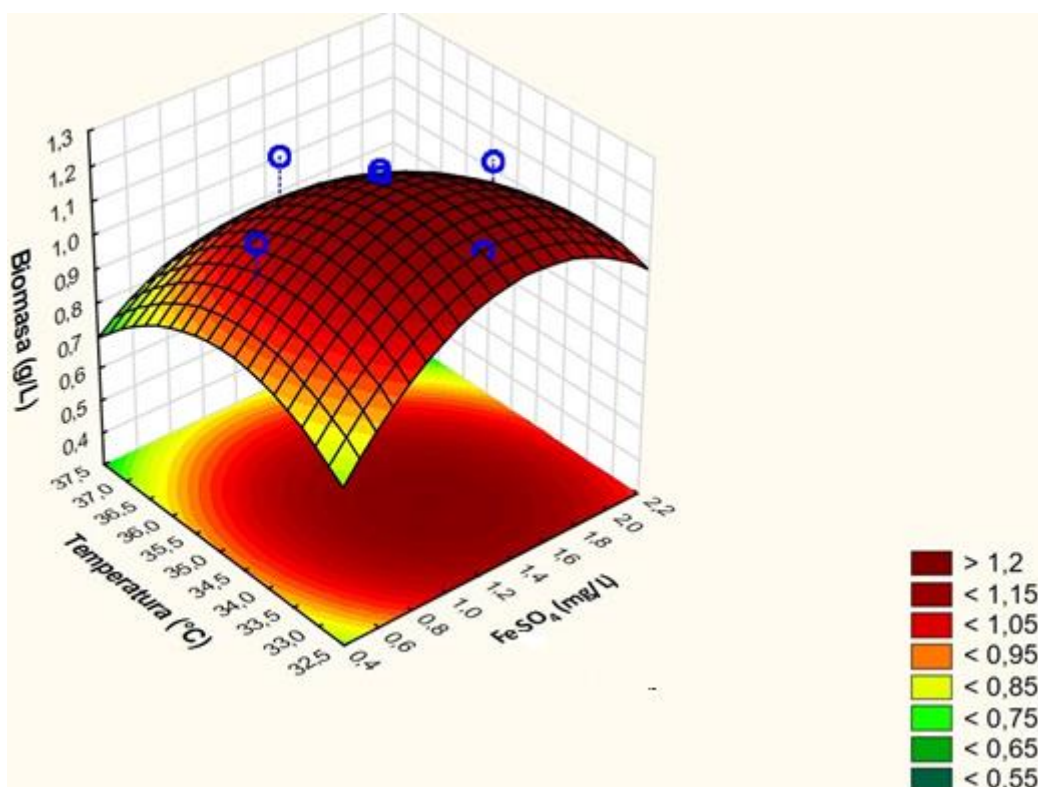


Figura 25. Superficie de respuesta obtenido a partir del diseño central compuesto donde la variable dependiente es la biomasa y las variables independientes son temperatura y FeSO_4

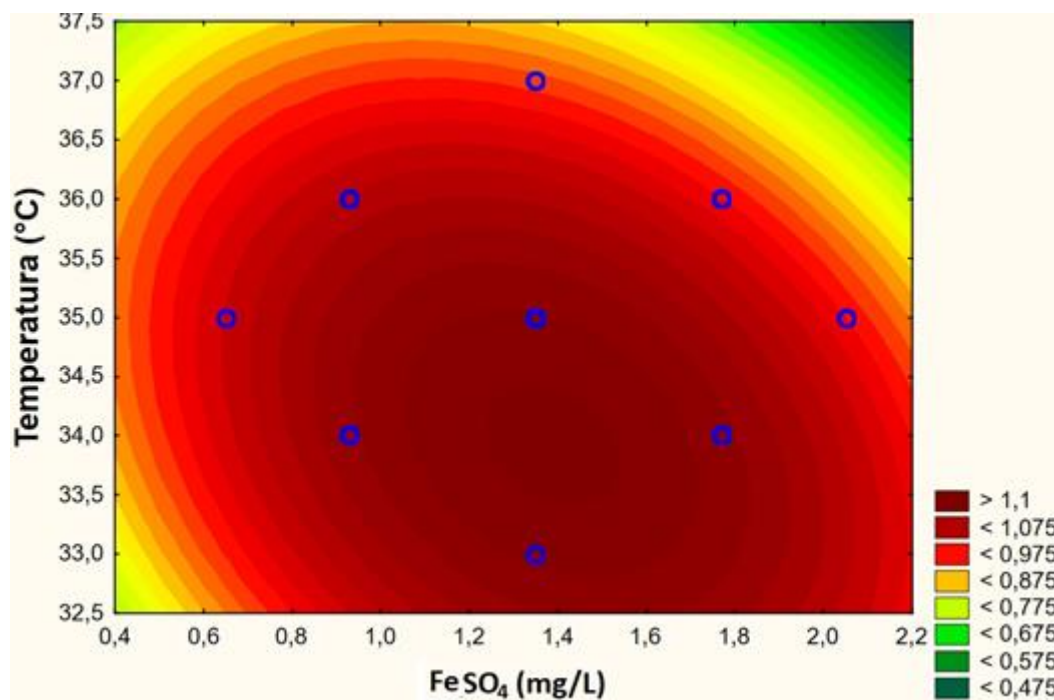


Figura 26. Gráfica de contornos de las variables independientes (temperatura y FeSO₄) con respecto a la variable dependiente (biomasa)

Las tres gráficas de superficie de respuesta obtenidas tras el DCC de biomasa reflejan un resultado satisfactorio al poder determinar tras su curvatura los valores óptimos aproximados tanto de la variable independiente como dependiente. En la sección (5.8.3), se encuentran las ecuaciones para obtener los valores óptimos reales de biomasa. Sin embargo, los valores óptimos observados de las gráficas coinciden con los valores centrales establecidos en el diseño, lo que determina la reproducibilidad del mismo.

5.8.3 Ecuaciones para determinación de valores óptimos de biomasa

Mediante el DCC de biomasa, el programa Statistica® generó tres ecuaciones de segundo orden (tabla 15), las cuales fueron utilizadas para determinar los valores óptimos reales de las variables de estudio. La primera ecuación representa la interacción entre FeSO₄ y CoCl₂ (figura 21). La segunda ecuación la temperatura y CoCl₂ (figura 23) y la tercera ecuación representa la interacción entre la temperatura y FeSO₄ (figura 25) todas con respecto a la biomasa, la cual es la variable dependiente.

Tabla 15.

Ecuaciones generadas por el programa Statistica ® para el DCC para cada superficie de respuesta

Superficie de respuesta	Ecuación
Figura 21	$Biomasa (g/L) = 0,6702 + 0,0104X + 0,4799Y - 0,0003X^2 + 0,0056XY - 0,254Y^2$
Figura 23	$Biomasa (g/L) = -18,3074 + 0,0621X + 1,111Y - 0,0003X^2 - 0,0013XY - 0,0161Y^2$
Figura 25	$Biomasa (g/L) = -22,8545 + 2,6063X + 1,3253Y - 0,2561X^2 - 0,0558XY - 0,0186Y^2$

5.8.4 Análisis estadístico

A partir del análisis de varianza (ANOVA) obtenido de los DCC se determinó que existe diferencia significativa lineal (L) en una variable con relación a la biomasa de *Bacillus thuringiensis* como se observa en la zona resaltada de la tabla 16. Según Cumming, Fidler & Vaux (2007), la temperatura es estadísticamente significativa para la producción de biomasa debido a que el valor de probabilidad p es <0,05, sin embargo, cuando existe significancia en una variable lineal, significa que no se ajusta al modelo cuadrático y esto se comprueba con el coeficiente de determinación. En la misma tabla se observa que el diseño se ajusta al modelo matemático en un 65,93%. Según lo indicado por Valderrama, (2003), el valor de coeficiente de determinación obtenido se acerca al valor aceptable, el cual es 0,70 (70%), esto puede deberse a factores externos que alteran la integridad del microorganismo o procesos propios de la bacteria. Sin embargo, es importante mencionar que el objetivo principal de esta investigación fue la producción de proteína total, por lo que el estudio de obtención de biomasa no se realizó con mayor profundidad. Además, se observa en la misma tabla que no existe diferencia significativa para la variación cuadrática (Q) de las tres variables estudiadas debido a que el valor de la probabilidad es \geq que 0,05. De igual manera se determinó que no hay relación entre las tres variables

estudiadas, es decir, son independientes una de otra para la obtención de biomasa de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla 16.

Análisis de varianza del DCC para la obtención de biomasa a partir de Bacillus thuringiensis

ANOVA					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) CoCl ₂ (mg/L) (L)	0,001	1	0,001	0,083	0,781
CoCl ₂ (mg/L) (Q)	0,020	1	0,020	2,809	0,132
(2) FeSO ₄ (mg/L) (L)	0,003	1	0,003	0,461	0,516
FeSO ₄ (mg/L) (Q)	0,036	1	0,036	4,912	0,058
(3) Temperatura (°C) (L)	0,049	1	0,049	6,709	0,032
Temperatura (°C) (Q)	0,016	1	0,016	2,233	0,173
1L by 2L	0,004	1	0,004	0,615	0,456
1L by 3L	0,001	1	0,001	0,189	0,676
2L by 3L	0,004	1	0,004	0,605	0,459
Error	0,058	8	0,007		
Total SS	0,170	17			

Var.:Biomasa (g/L); R-sqr=0,65939;
3 factors, 1 Blocks, 18 Runs; MS Residual=0,0072517
DV: Biomasa (g/L)

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvieron las máximas concentraciones de proteína extracelular a las 26 horas de crecimiento de *Bt* a escala de laboratorio y a las 32 horas a escala de banco con el medio de cultivo propuesto.

A partir del diseño experimental Plackett Burman se determinó que las variables influyentes para la producción de la proteína total a partir de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* fueron concentración de CoCl_2 , FeSO_4 , KCl y temperatura. Según lo observado en el diagrama de Pareto la concentración de KCl tiene una baja influencia con respecto a las otras variables frente a la producción de proteína, por lo cual, en este estudio fue descartada como variable de estudio.

Mediante el Diseño Central Compuesto se obtuvieron los valores óptimos de las variables resultantes influyentes. El diseño se realizó tanto para la producción de la proteína total como para la biomasa de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. Por lo tanto, para obtener la máxima concentración de proteína (4,0 mg/mL), se necesita una concentración de 30,83 mg/L de CoCl_2 , 1,37 mg/L de FeSO_4 y una temperatura de 34,9 °C. En este estudio se demostró de manera experimental que, bajo las mismas condiciones de cultivo y operación, las concentraciones de proteína oscilaron entre 3,6 y 4,5 mg/mL. De esta manera, tanto el modelo matemático como los valores obtenidos experimentalmente son una representación aproximada de la influencia de la concentración de CoCl_2 , FeSO_4 y la temperatura frente a la producción de proteínas totales a partir de *Bacillus thuringiensis*.

Se demostró que *Bt* alcanza la fase de esporulación en un menor tiempo a escala de banco (Biorreactor) con respecto a la escala de laboratorio, debido a que las condiciones de operación son más controladas. En escala de banco existe una mayor oxigenación (fuente principal de *Bacillus thuringiensis*) y una mejor homogenización del medio.

Se observó que la bacteria produce altas concentraciones de proteína en la fase de esporulación, debido a que en esta fase es capaz de sintetizar otros compuestos como el PHB y ciertos precursores de proteínas, que contribuyen para la formación de las toxinas de *Bt* y su mantenimiento en el medio.

6.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio complementario en donde se determinen los tipos de proteína obtenidos en el extracto, mediante técnicas de purificación y separación de proteínas.

Se sugiere realizar un estudio de la toxicidad de la proteína obtenida tanto a las 26 horas a escala de laboratorio como a las 32 horas a escala de banco, en las mismas condiciones de cultivo y de operación, con insectos como lepidópteros, coleópteros, dípteros y también con nematodos.

Para asegurar la actividad insecticida de las proteínas producidas por *Bt* es recomendable realizar pruebas de toxicidad con la concentración de proteína obtenida en un rango de 1 a 56 horas de crecimiento.

En el Biorreactor, es recomendable controlar el flujo de oxígeno, de manera que se mantenga estable y la bacteria pueda aprovechar la aireación suministrada al medio de cultivo en el tanque de fermentación.

REFERENCIAS

- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). *How does Bacillus thuringiensis produce so much insecticidal crystal protein?*. Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC177438/pdf/1776027.pdf>
- Agrocalidad. (2013). Listado de plaguicidas registrados. Recuperado el 13 de noviembre del 2017 de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2013/04/07/PLAGUICIDAS%20REGISTRADOS.pdf>
- Analytical Methods Committee. (2013). *Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman designs. Analytical Methods*, 5(8), 1901.
- Akiba, Y. (1986). *Microbial ecology of Bacillus thuringiensis VI. Germination of Bacillus thuringiensis spores in the soil*. Recuperado el 10 de octubre del 2017 de: https://www.jstage.jst.go.jp/article/aez1966/21/1/21_1_76/_pdf/-char/en
- Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. L. (2013). *Bacillus thuringiensis is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches*. doi: 10.3390/insects5010062.
- Arnaíz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). *Determinación de biomasa en procesos biológicos*. Sevilla: Universidad de Sevilla. Recuperado el 11 de septiembre del 2017 de: http://bibliotecagbs.com/archivos/ta_205_1.pdf
- Badii, M. H., & Landeros, J. (2015). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT*, 19 (4). Recuperado el 10 de octubre del

2017 de:
<http://openjournal.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/454>

Badii, M. H., & Varela, S. (2015). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. *CULCyT*, 28(5). Recuperado el 29 de octubre del 2017 de:
<http://openjournal.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/375>

Beltrán, L., & Zamora, A. (1998). Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus thuringiensis*. doi: 10.15446/rev.colomb.biote

Ben-Dov, E. (2014). *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* and its dipteran-specific toxins. doi: 10.3390/toxins6041222

Ben Khedher, S., Jaoua, S., & Zouari, N. (2013). *Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless Bacillus thuringiensis strain on cheap medium*. Recuperado el 25 de septiembre del 2017 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910214/>

Benson, T. A., Dahod, S., Dave, A. H., Nair, A., & Adams, R. (2013). *U.S. Patent No. 8,551,757*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Recuperado el 11 de septiembre del 2017 de: <https://www.uspto.gov/>

Bok, S. H. J., Kim, S. U., Son, K. H., & Lee, H. H. (1994). *Characterization of Bacillus thuringiensis Strain BT-14 having Insecticidal Activity against Plutella xylostella*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Recuperado el 28 de noviembre del 2017 de:
https://www.researchgate.net/publication/277040741_Characterization_of_Bacillus_thuringiensis_isolates_of_western_ghats_and_their_insecticidal_activity_against_diamond_back_moth_Plutella_xylostella_L

- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García- Gómez, B. I., Rodríguez- Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2013). *Evolution of Bacillus thuringiensis Cry toxins insecticidal activity. Microbial biotechnology.* doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Butko, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology.* doi: 10.1128/AEM.69.5.2415-2422.2003
- Carrera, M. (2010). Producción de *Bacillus thuringiensis*, berliner a nivel de laboratorio. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado el 10 de septiembre del 2017. <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf>
- Castro Franco, R. (1994). *Desarrollo de un bioinsecticida a partir de Bacillus thuringiensis y extracto de Agave lechuguilla para el control de Spodoptera frugiperda (JB Smith).* Recuperado el 12 de agosto del 2017 de: <http://eprints.uanl.mx/5754/1/1020112264.PDF>
- Careaga, M. G. J. (2015). Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. *Revista Varianza*, 11, 31–36. Recuperado el 30 de septiembre del 2017 de: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S9876-67892015000100007&script=sci_arttext
- Cortés, P. (2013). *Diseño Factoriales Fraccionarios y Metodología Del Diseño Robusto de Parámetros.* Recuperado el 18 de noviembre del 2017 de: http://masteres.ugr.es/moea/pages/tfm1213/tfm_cortescarvajalpublico/

- Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A. & Dean D.H. (2014) *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- Çinar, Ç. (2005). *Isolation and characterization of Bacillus thuringiensis from olive tree-related habitats*. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03571.x
- Cumming, G., Fidler, F., & Vaux, D. L. (2007). *Error bars in experimental biology*. *The Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611141>
- Del Toro de León, G. (2010). Caracterización del espectro de acción de la toxina Cry1AbMod, activa contra insectos resistentes, y su comparación con la toxina convencional Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*. Recuperado el 14 de noviembre del 2017 de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Fomento-investigacion/Tesis/Caracterizacion-espectro-de-accion-toxina-Cry1AbMod.pdf>
- Del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387. Recuperado el 10 de diciembre del 2017 de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010
- Devidas, P. C., Pandit, B. H., & Vitthalrao, P. S. (2014). *Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous Bacillus thuringiensis and Their Application against Larvae of Aedes aegypti*. <https://doi.org/10.1155/2014/273030>
- Donovan, W. P., Engleman, J. T., Donovan, J. C., Baum, J. A., Bunkers, G. J., Chi, D. J. & Krasomil-Osterfeld, K. C. (2006). *Discovery and*

characterization of Sip1A: A novel secreted protein from Bacillus thuringiensis with activity against coleopteran larvae.
doi:10.1007/s00253-006-0332-7

- Drehval, O. A., Chervatiuk, N. V., Cherevach, N. V., & Vinnikov, A. I. (2003). *Effect of mineral nutrition sources on the growth and toxin formation of the entomopathogenic bacteria Bacillus thuringiensis. Mikrobiolohichnyi zhurnal.* Recuperado el 24 de agosto del 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6664310>
- Ennouri, K., Ben Hassen, H., Ben Khedher, S., & Zouari, N. (2013). *Concomitant production of delta-endotoxins and proteases of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki in a low-cost medium: effect of medium components.* Recuperado el 29 de noviembre del 2017 de: <https://www2.sci.u-szeged.hu/ABS/2013/Acta%20HP/5713.pdf>
- Ennouri, K., Ayed, R. B., Hassen, H. B., Mazzarello, M., & Ottaviani, E. (2015). *Experimental design and Bayesian networks for enhancement of delta-endotoxin production by Bacillus thuringiensis. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 62(4), 379-392.* <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.3>
- Ennouri, K., Ayed, B., & Hassen, B. (2015). *Mathematical screening of nutritional parameters for enhancement of insecticidal proteins production by Bacillus sp.* Recuperado el 30 de noviembre del 2017 de: <http://www.jnsciences.org/agri-biotech/24-volume-16/66-mathematical-screening-of-nutritional-parameters-for-enhancement-of-insecticidal-proteins-production-by-bacillus-sp.html>
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). *Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proceedings of the National Academy of Sciences.* Recuperado el 15 de agosto del 2017 de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC39256/pdf/pnas01512-0226.pdf>

Fang, Y., Li, Z., Liu, J., Shu, C., Wang, X., Zhang, X. & Zhang, J. (2011). A *pangenomic study of Bacillus thuringiensis*. *Journal of Genetics and Genomics*. doi: 10.1016/j.jgg.2011.11.001

Fernández-Larrea Vega, O., Cejas Valencia, A., & Márquez Gutiérrez, M. E. (2009). 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. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092009000300008

Flores, A., Alcarraz, M., Woolcott, J. C., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D. & Patiño, A. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. *Ciencia e Investigación*. Recuperado el 28 de septiembre del 2017 de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3235/2702>

Galvis Serrano, F. (2013). Caracterización molecular de genes *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4* en aislados de *Bacillus thuringiensis* y determinación de su actividad bioinsecticida en larvas de *Aedes aegypti*. *Interciencia*, 38(2). Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5428611>

Gebeshuber, I. C., Aumayr, M., Hekele, O., Sommer, R., Gösselsberger, C. & Gruenberger, C. (2010). *Bacilli, green algae, diatoms and red blood cells-how nanobiotechnological research inspires architecture*. Recuperado el 24 de octubre del 2017 de: http://www.iap.tuwien.ac.at/~gebeshuber/Gebeshuber_bionanotechnology_inspiring_architecture_1st_submission_final.pdf

- Gohar, M., & Perchat, S. (2001). *Sample preparation for β -exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5373>
- Guerchicoff, A., Delécluse, A., & Rubinstein, C. P. (2001). *The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family*. *Applied and environmental microbiology*. doi: 10.1128/AEM.67.3.1090-1096.2001
- Guerra, A. C., Abascal, E. N., Pacheco, S. V., Alonso, M. P., & Cruz, C. V. (2012). El Hierro, elemento importante en la vida. Recuperado el 19 de agosto del 2017 de: <http://www.elementos.buap.mx/num85/pdf/41.pdf>
- Hernández, C. (2014). Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*. Recuperado el 13 de septiembre del 2017 de: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/622/1/235011.pdf>
- Hussien, A. I. (2012). Evaluación de la bacteria transformada *Paenibacillus polymixa*, que expresa la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis*, como insecticida y biofertilizante en algodón. Recuperado el 3 de noviembre del 2017 de: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/8135/2012000000627.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Içgen, Y., Içgen, B., & Özcengiz, G. (2002). *Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH*. *Elsevier*, 153(9) 599-604. doi: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01367-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01367-0)

Ibrahim MA, Griko N, Junker M & Bulla LA (2010) *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*. doi: 10.4161/bbug.1.1.10519.

Ignatenko, I., Sakharova, Z., Khovrychev, M., & Shevtsov, V. (1983). *Effect of temperature and aeration on Bacillus thuringiensis growth and sporulation*. Recuperado el 10 de octubre del 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/6664310/>

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2011). *Insecticidas de uso agrícola en el Ecuador*. INIAP. Recuperado el 15 de noviembre del 2017 de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1253/1/INIAP%20bolet%20C3%ADn%20divulgativo%20401.pdf>

Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2015). *Información ambiental en la agricultura*. INEC. Recuperado el 22 de septiembre del 2017 de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec>

Izquierdo, R. L. (2012). *Actividad de las toxinas de Bacillus thuringiensis para el control de Tuta absoluta*. (Tesis de maestría). Universidad de Valencia, Valencia, España. Recuperado el 14 de noviembre del 2017 de: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15610/TesinaMaster_Lucialzquierdo.pdf?sequence=1

Jacas Miret, J. A. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades*. Navarra: Publicacions de la Universitat Jaume, 67-70.

Kennedy, M. J., Reader, S. L., Krouse, D., & Hinkely, S. (2009). *Process optimization strategies for biotechnology products: from discovery to production*. Recuperado el 27 de octubre del 2017 de: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c17/E6-58-04-04.pdf>

- Kuehl, R. (2001) *Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. México: Thomson learning, 433-437.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., & Chen, J. S. (2003). *The mode of action of the Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin*. *Applied and Environmental Microbiology*.
<https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.69.8.4648-4657.2003>
- Li, Y., Hu, X., Tian, S., Li, Y., Zhang, G., Zhang, G., & Liu, S. (2014). *Polyion complex micellar nanoparticles for integrated fluorometric detection and bacteria inhibition in aqueous media*. *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.077
- Liu, X., Ruan, L., Peng, D., Li, L., Sun, M., & Yu, Z. (2014). *Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from Bacillus thuringiensis with insecticidal activity against a wide range of insects*. doi: 10.3390/toxins6082229.
- Lonc, E., Lecadet, M. M., Lachowicz, T. M., & Panek, E. (1997). *Description of Bacillus thuringiensis wratislaviensis (H- 47), a new serotype originating from Wrocław (Poland), and other soil isolates from the same area*. *Letters in applied microbiology*. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00039.x
- López-Pazos, S. A., & Cerón, J. (2010). *Proteínas Cry de Bacillus thuringiensis y su interacción con coleópteros*. Recuperado el 10 de octubre del 2017 de:
http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_ARTORIG5.pdf
- Lorenz, T., & Biegler. (2010). *Introduction to process optimization. Nonlinear Programming: Concepts, Algorithms, and Applications to Chemical*

process. Recuperado el 28 de abril del 2017 de:
<http://cepac.cheme.cmu.edu/pasilectures/biegler/BieglerLecture.pdf>

Luo, X., Chen, L., Huang, Q., Zheng, J., Zhou, W., Peng, D. & Sun, M. (2013). *Bacillus thuringiensis metalloproteinase Bmp1 functions as a nematocidal virulence factor*. *Applied and environmental microbiology*. doi: 10.1128/AEM.02551-12

Marzban, P. U. (2012). *Investigation on the suitable isolate and medium for production of Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biopesticides*. Recuperado el 16 de septiembre del 2017 de:
http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Vol_5_2_144-147-12013.pdf

MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Madrid, España: Medica Panamericana.

Melo, A. L. D. A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review*. *Critical reviews in biotechnology*.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>

Milne, R., Liu, Y., Gauthier, D., & Van Frankenhuyzen, K. (2008). *Purification of Vip3Aa from Bacillus thuringiensis HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (Choristoneura fumiferana) and gypsy moth (Lymantria dispar)(Lepidoptera)*. doi: 10.1016/j.jip.2008.05.002

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2017) *MAGAP interviene con fumigaciones para controlar plagas que afectan al maíz*. MAGAP. Recuperado el 22 de abril del 2017 de:
<http://www.agricultura.gob.ec/magap-interviene-con-fumigaciones-para-controlar-plagas-que-afectan-al-maiz/>

- Mishra, K., Sharma, R. C., & Kumar, S. (2012). *Contamination levels and spatial distribution of organochlorine pesticides in soils from India. Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 215-225. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.014>
- Mourin, M., Shishir, A., Nargis, S., & Hoq, M. (2015). *Regulation of major cultural components for designing a cost effective medium to increase endotoxin synthesis by Bacillus thuringiensis. Bangladesh: University of Dhaka*.doi:10.5897/AJB2014.14340
- Montgomery. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (Segunda edición). México DF: Limusa Wiley.
- Mourin, M., Shishir, A., Nargis, S., & Hoq, M. (2015). *Regulation of major cultural components for designing a cost effective medium to increase endotoxin synthesis by Bacillus thuringiensis. Bangladesh: University of Dhaka*.doi:10.5897/AJB2014.14340
- Muniady, S., Rathinam, X., & Subramaniam, S. (2011). *Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel Bacillus thuringiensis strains from chicken manure samples. African Journal of Microbiology Research*. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.649>
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Recuperado el 10 de mayo del 2017 de: <http://www.redalyc.org/html/461/46125177003/>
- Navarro-Mtz, A. K., & Pérez-Guevara, F. (2014). *Construction of a biodynamic model for Cry protein production studies. AMB Express*, 4(1),79. doi: 10.1186/s13568-014-0079-y

- Nisnevitch, M., Cohen, S., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Sofer, Y., & Cahan, R. (2006). *Cyt2Ba of Bacillus thuringiensis israelensis: activation by putative endogenous protease. Biochemical and biophysical research communications*, Recuperado el 26 de abril del 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630537>
- Padilla Martín, V. (2017). *Bioinsecticidas* (tesis de grado). Universidad de La Laguna, La Laguna. Recuperado el 18 de junio del 2017 de: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/4277/Bioinsecticidas.pdf?sequence=1>
- Palma, L., Hernández-Rodríguez, C. S., Maeztu, M., Hernández-Martínez, P., de Escudero, I. R., Escriche, B... & Caballero, P. (2012). *Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis. Applied and environmental microbiology*, 78(19), 7163-7165. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01360-12>
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. doi:10.3390/toxins6123296
- Paucar, A. (2011). Optimización de la concentración inicial del inóculo y medio de cultivo para la producción de un bioacaricida a partir de *Bacillus thuringiensis* en un biorreactor discontinuo a escala piloto. Recuperado el 14 de julio del 2017 de: <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/3136>
- Portela Dussán, D. D., Chaparro Giraldo, A., & López Pazos, S. A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. Recuperado el 21 de agosto del 2017 de: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v11n20/v11n20a09.pdf>

- Quevedo Urías, H. and Pérez Salvador, B. (2014). *Estadística para ingeniería y ciencias*. México: Patria.
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. doi: 10.1007/978-3-319-56678-8_1
- Rosas García, N. M. (2014). *Bacillus thuringiensis*: una aplicación de la ciencia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 5-6. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47665>
- Saleh, S. M., Harris, R. F., & Allen, O. N. (1970). *Fate of Bacillus thuringiensis in soil: effect of soil pH and organic amendment*. *Canadian journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m70-116>
- Sarrafzadeh, M. (2012). *Nutritional Requirements of Bacillus thuringiensis During Different Phases of Growth, Sporulation and Germination Evaluated by Plackett-Burman Method*. Recuperado el 24 de mayo del 2017 de: http://www.ijcce.ac.ir/article_5936_534c05ed85b6e8191aea6991d31a7ffc.pdf
- Sattar, S., & Maiti, M. K. (2011). *Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from Bacillus thuringiensis effective against sap-sucking insect pest*. *J. Microbiol.* doi: 10.4014/jmb.1105.05030
- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología*, 40(2), 124-140. Recuperado el 25 de agosto del 2017 de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412008000200013

- Sellami, S., Zghal, T., Cherif, M., Zalila- Kolsi, I., Jaoua, S., & Jamoussi, K. (2013). *Screening and identification of a Bacillus thuringiensis strain S1/4 with large and efficient insecticidal activities. Journal of basic microbiology*. doi: 10.1002/jobm.201100653
- Schnepf, H. E., & Whiteley, H. R. (1985). *Delineation of a toxin-encoding segment of a Bacillus thuringiensis crystal protein gene. Journal of Biological Chemistry*, 260(10), 6273-6280. Recuperado el 15 de noviembre del 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98934/>
- Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J. & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and molecular biology reviews*. Recuperado el 13 de mayo del 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729609>
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). *Mode of action and specificity of Bacillus thuringiensis toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/135675>
- Soberón, M & Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas*. Cuernavaca: Instituto de Biotecnología/ Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 19 de abril del 2017 de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf
- Soberón, M., López-Díaz, J. A., & Bravo, A. (2013). *Cyt toxins produced by Bacillus thuringiensis: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms*. doi: 10.1016/j.peptides.2012.05.023
- Suárez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F., & Hernández, G. (2009). *Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario*. Recuperado el 12 de septiembre del 2017 de: <http://www.redalyc.org/pdf/933/93313204001.pdf>

Torres, T. (2015). *Bacillus thuringiensis*. *Microbewiki.kenyon.edu*. Recuperado el 21 de septiembre del 2017 de: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Tina_Torres_Bacillus_thuringiensis#Author

Uk Standards for Microbiology Investigations. (2015). *Identification of Bacillus species*. Recuperado el 15 de mayo del 2017 de: <https://www.gov.uk/government/publications>

Upadhyay, R. (2013). *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation*. New York: Springer.

Valderrama, J. (2003). *Información tecnológica*. Recuperado el 11 de junio del 2017 de: <https://books.google.com.ec/books?id=NC0YB1d6sbwC>

Valicente, F. H., Tuelher, E., Leite, M. I., Freire, F., & Vieira, C. M. (2010). *Production of Bacillus thuringiensis biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources*. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. doi: 10.18512/1980-6477/rbms.v9n1p1-11

Velooralappil, J., Robinson, S. & Sailas, B. (2013). *An overview on the crystal toxins from Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 3(05), 462. doi: 10.4236/aim.2013.35062

Warren, G. W., Koziel, M. G., Mullins, M. A., Nye, G. J., Carr, B., Desai, N. M. & Estruch, J. J. (1998). *U.S. Patent No. 5,770,696*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Recuperado el 25 de noviembre del 2017 de: <http://www.mgmullinsco.com/FHAAproved>

Xu, Y., Nagai, M., Bagdasarian, M., Smith, T. W., & Walker, E. D. (2001). *Expression of the p20 gene from Bacillus thuringiensis H-14 increases Cry11A toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in*

recombinant gram-negative bacteria. Applied and environmental microbiology. doi: 10.1128/AEM.67.7.3010-3015.2001

Yu, X., Liu, T., Sun, Z., Guan, P., Zhu, J., Wang, S. & Li, P. (2012). *Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis.* *Current microbiology.* doi: 10.1007/s00284-011-0070-7

Yu, Z., Luo, H., Xiong, J., Zhou, Q., Xia, L., Sun, M., & Li, L. (2014). *Bacillus thuringiensis Cry6A exhibits nematocidal activity to Caenorhabditis elegans bre mutants and synergistic activity with Cry5B to C. elegans.* *Letters in applied microbiology.* doi: 10.1111/lam.12219

Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., & Yang, Y. (2017). *Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation.* *Measurement.* <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.08.013>

Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., & Balcazar, J. L. (2014). *Administration of Bacillus subtilis strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against Vibrio harveyi infection in juvenile white shrimp, Litopenaeus vannamei.* *Fish & shellfish immunology.* doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.007

