

# EFFECTO DE LA PREPARACIÓN DEL INOCULO EN EL CULTIVO POR LOTE DE *Bacillus thuringiensis* HD-73

Verónica Vázquez Cervantes, Lucila\_Valdez Castro, Ma. Teresa Rodríguez Casasola y Josefina Barrera Cortés.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV.

Av. Politécnico Nacional 2508, C.P. 07000 México, D.F. Fax: 57 47 38 00 ext. 4305

e-mail: [jbarrera@mail.cinvestav.mx](mailto:jbarrera@mail.cinvestav.mx)

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, Fermentación

**Introducción:** *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*), es uno de los microorganismos comúnmente empleados para el control biológico de plagas agrícolas. Debido a su gran aceptación, el proceso de producción de *B.t.* es estudiado con el fin de incrementar rendimientos y eficiencia de productos de la fermentación, así como reducir sus costos [3].

Para producir *B.t.* en un medio de cultivo a base de harina de soya, se determinó preparar el inóculo en dos pases a fin de asegurar su desarrollo normal. Este trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto de propagar *B.t.* en un solo pase, sobre la producción de biomasa, esporas y proteína Cry.

**Metodología:** Se determinaron cinéticas de inóculos de *B.t.* propagados en uno y dos pases. Primer pase, 0.5 mL de un stock de esporas ( $8.42 \times 10^7$  esporas/mL) se inoculó en un matraz de 500 mL con medio Gerry Rowe (GR). El matraz se incubó a 30°C y 200 r.p.m durante 12 horas. Segundo pase, 5% del cultivo contenido en el matraz 1 se inocula en un segundo matraz con 200 mL de medio basado en harina de soya (HS). La propagación se realizó bajo las mismas condiciones. De los dos matraces, cada hora se tomaron muestras de 10 mL, para determinar la cinética de bacilos (cuenta directa y peso seco), así como la morfología celular de *B.t.* (tinción de Smirnov) [2].

Se realizaron 2 fermentaciones en lote de *B.t.* con inóculo obtenido de un solo pase y 2 fermentación con inóculo obtenido de dos pases. 200 mL de inóculo fueron depositados en un fermentador Chemap de 5L (volumen de operación). La fermentación se llevó a cabo a 30°C, pH de 7.2, oxígeno disuelto > al 40% y 600 r.p.m. Cada hora se tomó muestra para determinar cinéticas de bacilos y esporas (cuenta directa), glucosa (analizador enzimático), nitrógeno (técnica de Ninhidrina) y proteína Cry (electroforesis en gel de poliacrilamida) [1].

**Resultados y Discusión:** Las cinéticas de los inóculos de *B.t.* propagados en uno y dos pases como se muestra en la Figura 1.

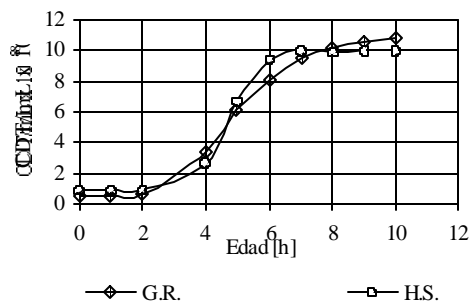


Figura 1 Cinéticas del inóculo de *B.t.* propagado en medio GR y HS.

De acuerdo a la tendencia de cada curva, la propagación de *B.t.*, en uno y dos pases, no presenta cambios significativos en su proceso de reproducción. Con relación a la morfología, la propagación de *B.t.* en medio GR mostró un desarrollo normal durante todo su ciclo. Al pasar *B.t.* del medio GR al de HS, se observó un alargamiento del bacilo durante las tres primeras horas. Posteriormente, *B.t.* se recuperó totalmente. Esta recuperación se vió reflejada en el nivel de reproducción de *B.t.* que fue de la misma magnitud que la obtenida en medio GR.

Los resultados de las 4 fermentaciones de *B.t.* en el Chemap se reportan en la Tabla 1. Aquí se observa que el número de pases en la preparación del inóculo no afecta la fermentación de *B.t.* Al cambiar el tipo de inóculo y mantener constante la Concentración Inicial de Sólidos Totales (CIST), la producción de bacterias, esporas y de proteína Cry1A(c) se mantienen prácticamente constantes.

CIST(g)	Inóc.	Bac x 10 <sup>8</sup> /ml	Esp x 10 <sup>8</sup> /ml	Cry1A(c) (g/l)
40	GR	23.60	21.50	1.523
40	HS	25.07	23.00	1.463
60	GR	40.38	34.50	2.094
60	HS	35.76	30.75	2.026

Tabla 1. Efecto de la CIST y del tipo de inóculo en la fermentación en lote de *B.t.*

**Conclusiones:** El método de propagación de *B.t.* no afecta el proceso de producción de *B.t.* HD-73, en cultivo por lote. La ventaja observada es la reducción del tiempo total de procesamiento al eliminar las 12 horas del segundo pase y 6 del primero. La posible desventaja es la prolongación, en dos horas, de la fase lag.

#### Agradecimiento:

CONACyT, proyecto 31511-B. PIFI, proyecto 200499. Dr. Fernando Esparza García, por su apoyo y asesoría.

#### Bibliografía:

- Farrera Rebollo R.R. (1998). Efecto del Medio de Cultivo sobre la Esporulación y Síntesis Cry1A(c) en *B.t.* var. *kurstaki* HD-73. Tesis de doctorado. México, D.F.
- De Urquijo Niembro E. (1987). Producción de *B.t.* para el control de ciertas plagas de importancia agrícola. Tesis de Maestría. México, D.F.
- Xiao-Ming Yang\* and Shaw S. Wang "Development of *Bacillus thuringiensis* Fermentation and Process Control From A Practical Perspective" Biotechnol. Appl. Biochem. (1998) p. 95-98