



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE NICARAGUA

Escuela de Ingeniería

Monografía para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Industrial

**Escalado (Banco de Laboratorio) del Bioproceso de Producción de un
Bioinsecticida a Base de *Bacillus subtilis* (LS6-11G)**

Autores:

Br. Mario Damián Herrera Alonso

Br. Juan Manuel Sieza Alvarado

Tutor: PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua,

Julio, 2021

Dedicatoria

Con toda la humildad que puede emanar de mi corazón dedico primeramente mi trabajo monográfico a mí **Dios** el creador de todas las cosas, quien supo guiarme por el buen camino dándome fuerzas para seguir adelante y no desfallecer ante los problemas.

A mi madre **Ing. Paula Elizabeth Alvarado**, por ser mi amiga y compañera que me ha ayudado a crecer, gracias por estar siempre conmigo en cada momento, por la paciencia que has tenido para enseñarme, por los regaños que merecía y por los que no entendía, gracias madre por estar al pendiente de mí en toda esta etapa.

A mi padre **Juan Manuel Sieza Estrada** quien fue de ayuda en mi vida profesional, sentando las bases de responsabilidad, deseos de superación y apoyo para la culminación de este trabajo.

A mi abuelito **Manuel Salvador Alvarado (Q.E.P.D)**, por estar en momentos importantes de mi vida, por ser ejemplo para salir adelante y por los consejos que me han sido de gran ayuda en mi vida. Esta monografía es el resultado de lo que me enseñaste en la vida ya que fuiste una persona honesta entregada al trabajo y un gran líder, pero más que eso una persona que siempre supo salir adelante y ser un triunfador.

A mi amiga, novia y confidente **Lic. Arlen de los Ángeles Pérez**. Un día Dios te puso en mi camino para compartir gratos momentos de la vida; alegrías, sueños y metas, siendo uno la finalización de esta monografía, Te agradezco por todo tu cariño y amor indispensable que me has demostrado durante este trabajo.

Y por último y no menos importante, a mis familiares y amigos por su apoyo y consejos durante toda la carrera y principalmente en esta última etapa, en especial a mi compañero de monografía **Mario Damián Herrera**, por tu apoyo y ánimo para finalizar este trabajo.

Juan Manuel Sieza Alvarado

Dedicatoria

Dedicado al principal guía de nuestras acciones, nuestro **Padre Celestial**, que siempre nos acompaña en todo momento e impulsa a seguir cumpliendo nuestras metas. Quién siempre protege a nuestros seres queridos y nos bendice a todos con sabiduría, salud y fortaleza, Amén.

A mi madre **Aura Jhessenia Alonso Sánchez** y a mi padre **Mario José Herrera Montoya** por haberme dado una buena educación, por siempre apoyarme y aconsejarme en todas mis decisiones, enseñándome valores fundamentales para mi desarrollo personal y profesional. A mi familia por siempre contar con su apoyo y a mis amigos que hacen de todo esto una gran experiencia.

Mario Damián Herrera Alonso

Agradecimientos

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a todo aquel que fue parte de esta última etapa de nuestra carrera universitaria, con especial consideración a:

- A la **Universidad Politécnica de Nicaragua**, a través de la Vicerrectoría general y la Escuela de Ingeniería por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta monografía.
- A la Universidad Nacional de Ingeniería por medio del **Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA)** poniendo a disposición su personal e instalaciones para el desarrollo del trabajo investigativo.
- Al **PhD Leandro Alberto Páramo Aguilera** tutor de esta monografía, por compartirnos abiertamente sus conocimientos, gracias por todo su tiempo y esfuerzo.

¡Muchas Gracias!

Juan Manuel Sieza Alvarado

Mario Damián Herrera Alonso

Resumen

El uso extensivo de fertilizantes químicos plantea graves problemas colaterales, como la contaminación ambiental, el desarrollo de resistencia a las plagas y el deterioro de la seguridad alimentaria. En relación a esto, surge la necesidad de buscar alternativas biológicas para el control de plagas en los cultivos que aporten a la sostenibilidad de la agricultura en nuestro país. Mediante esta investigación se determinaron los parámetros necesarios para aumentar la producción de biomasa de la cepa *Bacillus subtilis* y así llevar la producción de un bioinsecticida a una mayor escala.

En esta investigación se estableció un medio no sintético a base de melaza de caña para el crecimiento bacteriano, dicha melaza se ajustó a un 6% de azúcares reductores definiendo así un medio funcional para el crecimiento del microorganismo. De igual manera, se evaluó la cinética de crecimiento y la viabilidad del microorganismo por recuento en placa (UFC) en medio agar-agar y melaza, además, se proyectó un diseño tecnológico de la producción de un bioinsecticida a base de la cepa *Bacillus subtilis* (LS6-11G), utilizando como criterio de escalamiento la semejanza geométrica del modelo experimental.

Como resultados del desarrollo de la presente investigación y habiéndosele dado cumplimiento a los objetivos de la misma, se determinó que es posible implementar la melaza como sustrato lo cual quedó demostrado, además de ser un medio de bajo costo. La cinética del crecimiento microbiano partiendo de un inóculo con 1.70×10^4 UFC mL⁻¹ en el tiempo cero y alcanzado 2.78×10^7 UFC mL⁻¹ al cabo de 7 horas, evidenció que es factible obtener índices celulares mayores con el medio no sintético que los obtenidos con el medio sintético, si tan solo se permite un mayor tiempo de fermentación hasta alcanzar el final de la fase exponencial. Los parámetros cinéticos calculados arrojaron una velocidad máxima de crecimiento $\mu_{max} = 49.57 \text{ min}^{-1}$, un valor para la constante de saturación $Ks = 0.49 \text{ mg/L}$ y un tiempo de duplicación de 24 minutos en el medio de producción a base de melaza, obteniéndose en este trabajo mayores velocidades de crecimiento, tiempos de duplicación y constantes de saturación similares a las reportadas. El diseño tecnológico toma como criterio de diseño, la similitud geométrica, desde la escala de laboratorio (Erlenmeyer) hasta los prototipos diseñados de 1, 10 y 100 L de volumen efectivo para la producción del bioinsecticida a base de *Bacillus subtilis* (LS6-11G).

Abstract

The extensive use of chemical fertilizers poses serious collateral problems, such as environmental contamination, development of pest resistance and deterioration of food security. In relation to this, the need arises to look for biological alternatives for pest control in crops that contribute to the sustainability of agriculture in our country. Through this research, the necessary parameters were determined to increase the biomass production of the *Bacillus subtilis* strain and thus take the production of a bioinsecticide to a larger scale.

In this research, a non-synthetic medium based on sugarcane molasses was established for bacterial growth; this molasses was adjusted to 6% reducing sugars, thus defining a functional medium for the growth of the microorganism. Likewise, the growth kinetics and viability of the microorganism were evaluated by plate count (CFU) in agar-agar medium and molasses, and a technological design for the production of a bioinsecticide based on the *Bacillus subtilis* strain (LS6-11G) was projected, using the geometric similarity of the experimental model as a scaling criterion.

As a result of the development of the present research and having fulfilled its objectives, it was determined that it is possible to implement molasses as a substrate, which was demonstrated, besides being a low-cost medium. The kinetics of microbial growth starting from an inoculum with 1.70×10^4 UFC mL⁻¹ at time zero and reaching 2.78×10^7 UFC mL⁻¹ after 7 hours, showed that it is feasible to obtain higher cell indices with the non-synthetic medium than those obtained with the synthetic medium, if only a longer fermentation time is allowed until reaching the end of the exponential phase. The kinetic parameters calculated yielded a maximum growth rate $\mu_{max} = 49.57 \text{ min}^{-1}$, a value for the saturation constant $Ks = 0.49 \text{ mg/L}$ and a doubling time of 24 minutes in the molasses-based production medium, obtaining in this work higher growth rates, doubling times and saturation constants similar to those reported. The technological design takes as design criterion, the geometric similarity, from the laboratory scale (Erlenmeyer) to the designed prototypes of 1, 10 and 100 L of effective volume for the production of the bioinsecticide based on *Bacillus subtilis* (LS6-11G).

INDICE DE CONTENIDO

<i>CAPÍTULO 1: ASPECTOS GENERALES</i>	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes.....	3
1.3 Justificación	5
1.4 Objetivos de la Investigación	6
<i>CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO</i>	7
2. Insecticidas biológicos	7
2.1 Medio no sintético.....	8
2.1.1 Melaza de caña	8
2.1.2 Prueba de Azúcares Reductores por el método Lane y Eynon	10
2.2 Crecimiento Microbiano.....	11
2.2.1 Crecimiento microbiano en cultivo discontinuo.....	12
2.2.2 Concentración celular por conteo en placa.....	13
2.2.3 Determinación de Biomasa.....	13
2.2.4 Determinación de parámetros cinéticos	14
2.2.5 Cinética de un cultivo Batch	15
2.3 Diseño tecnológico del escalamiento de un proceso biológico	16
2.3.1 Criterios del escalamiento biológico	17
2.3.2 Estrategia de escalamiento de un diseño tecnológico.....	18
<i>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA</i>	22
3.1 Localización del estudio.....	22
3.1.1 Clarificación de la Melaza.....	22
3.1.2 Determinación de Azúcares Reductores por el Método de Lane y Eynon.....	22
3.1.3 Procedimientos para la preparación del medio no sintético	23
3.1.4 Formulación del medio no sintético.....	24
3.2 Conservación de los microorganismos obtenidos.....	24
3.2.1 Procedimientos previos para la evaluación de la cinética de crecimiento microbiano	25
3.2.2 Crecimiento del microorganismo en Placa Petri	25
3.2.3 Tinción diferencial de Gram.....	26
3.2.4 Técnica de siembra en superficie.....	26
3.2.5 Preparación de condiciones para el desarrollo del inóculo	27

3.2.6 Determinación de la cinética de crecimiento microbiano.....	27
3.2.7 Técnica de siembra en superficie para el conteo de colonias microbianas	28
3.3 Diseño tecnológico para la producción de un Bioinsecticida.....	29
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
4.1 Definición del medio no sintético a base de melaza	32
4.2 Microorganismos utilizados para el desarrollo del proceso cinético.....	33
4.2.1 Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en medio no sintético.....	35
4.2.2 Determinación de parámetros cinéticos	39
4.3 Proyección del Diseño Tecnológico Prototipo.....	42
4.3.1 Diseño tecnológico prototipo del escalamiento del bioinsecticida.....	43
CAPITULO 5. CONCLUSIONES	46
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES.....	47
CAPITULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	48
CAPÍTULO 7. ANEXOS53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la cinética del crecimiento microbiano. (Fuente: Najafpour, 2015).	12
Figura 2. Curva de crecimiento por determinación Turbidemétrica. A) Representación del funcionamiento de un espectrofotómetro para la lectura de la absorbancia. (Fuente: Cantu, 2019). B) Curva de crecimiento del microorganismo. (Fuente: Úbeda y Páramo, 2018).	14
Figura 3. Representación Gráfica de la Ecuación de Monod (Castañeda, 2019).	14
Figura 4. Diseño de Biorreactor. (Fuente: Dorán, 1999).	18
Figura 5. Preparación de medio no sintético a base de melaza. A) Adición de reactivos de Fehling. B) Disolución de melaza. C) Disolución de melaza hidrolizada. D) Adición de reactivos de Fehling. E) Bureta con disolución de melaza hidrolizada para titulación. F) Punto de equivalencia de la reacción de Fehling (Fuente: Propia).	23
Figura 6. Preparación de medios de cultivo caldo y agar melaza. A) Homogenización del agar-agar con el caldo melaza. B) Preparación de Erlenmeyers con caldo melaza para la	

esterilización. C) Erlenmeyers con caldo melaza esterilizados. D) Agar melaza solidificado en Placas Petri (Fuente: Propia).....	24
Figura 7. Técnica de siembra de agotamiento por estrías. A) Representación del rayado en la superficie del agar. B) Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11G en medio Agar LB (Fuente: Propia).	25
Figura 8. Tinción diferencial de Gram. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Reactivos de tinción; D) Visualización en el microscopio (100X) (Fuente: Propia).	26
Figura 9. Técnica siembra en superficie (Fuente: López, et al., 2006).....	27
Figura 10. Procedimientos para el desarrollo del inóculo. A) Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en medio sintético Agar LB. B) Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en agar melaza. C) Dispersión de la suspensión sobre la superficie del medio agarizado. D) Extracción de la suspensión con una Micro pipeta. E) Pre inóculo <i>Bacillus subtilis</i> . F) Desarrollo del inóculo en Shaker a 150 rpm (Fuente: Propia).	27
Figura 11. Determinación cinética de crecimiento microbiano. A) Calibración del Espectrofotómetro UNICO UV-2100. B) Colocación de la celda en el espectrofotómetro (Fuente: Propia).	28
Figura 12. Conteo de bacterias por método de diluciones y recuento en placa (Fuente: Úbeda y Páramo, 2018).	28
Figura 13. Técnica siembra en superficie. A) Dispersión por superficie de la muestra. B) Placas Petri inoculadas. (Fuente: Propia).	29
Figura 14. Algoritmo para el diseño tecnológico del escalado) (Fuente: Propia).	31
Figura 15. Evaluación del crecimiento del microorganismo, A) Crecimiento en melaza al 6% con Agar-agar B) Crecimiento en agar Miller LB (Fuente: Propia).	33
Figura 16. Sección del Árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método NeighborJoining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo (Fuente: Flores & Roque, 2017).	34
Figura 17. A) Primera corrida experimental (Absorbancia vs Tiempo. B) Segunda corrida experimental (Absorbancia vs Tiempo). C) Tercera corrida experimental (Absorbancia vs Tiempo) (Fuente: Propia).	36

Figura 18. Comparación de los resultados de la cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en medio no sintético a base de melaza (columna izquierda) vs medio sintético Miller LB Broth (columna derecha) (Fuente: Propia).....	37
Figura 19. Comparación de los parámetros cinéticos de <i>Bacillus subtilis</i> en Medio Miller LB Broth (método de medición de turbidez por McFarland) y el medio no sintético caldo melaza (conteo UFC/mL por siembra en placa) Fuente: Propia	40
Figura 20. Modelo Experimental de escala laboratorio. A) Dimensiones de referencia del Matraz Erlenmeyer B) Condiciones de trabajo del modelo experimental (Fuente: Propia) ..	42
Figura 21. Diagrama de bloques del proceso de producción de <i>Bacillus subtilis</i> (Fuente: Propia).....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional por 100 g de melaza (Noriega, 2014).....	9
Tabla 2. Resultados de la determinación de azúcares reductores a la melaza utilizada.....	33
Tabla 3. Identificación de bacterias mediante análisis filogenético utilizando el árbol de la figura 16. En el cuadro se muestra el código de la secuencia, el código del microorganismo, muestra de donde se aisló, puntuación e identidad máxima con el vecino cercano (Fuente: Flores y Roque, 2017).....	34
Tabla 4. Datos del equipo de experimento a escala de laboratorio (Erlenmeyer) (Fuente: Propia).....	42
Tabla 5. Resultados obtenidos del prototipo del diseño tecnológico para cada volumen establecido (Fuente: Propia).....	43
Tabla 6. Factores del método de Lane & Eynon usando 10 mL de disolución de Fehling (Gaitán y García, 1998).....	58
Tabla 7. Resultados de absorbancia para cada cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11G (Fuente: Propia).....	60
Tabla 8. Resultados de Absorbancia vs Concentración del bioinsecticida en UFC/mL (Fuente: Propia).....	61

Tabla 9. Resultados Parámetros cinéticos <i>Bacillus subtilis</i> (Fuente: Propia).....	61
---	----

INDICE DE ECUACIONES

Ec. (2.1). Cálculo del porcentaje de azúcares reductores.....	11
Ec. (2.2). Ecuación de Monod.....	14
Ec. (2.3). Velocidad específica de crecimiento.....	15
Ec. (2.4). Tiempo de duplicación.....	15
Ec. (2.5). Constante de saturación.....	15
Ec. (2.6). Tasa de formación de producto.....	16
Ec. (2.7). Velocidad de formación del producto.....	16
Ec. (2.8). Fase exponencial del crecimiento microbiano en un cultivo Batch.....	16
Ec. (2.9). Concentración celular con respecto al tiempo.....	16
Ec. (2.10). Rango de los caudales.....	19
Ec. (2.11). Volumen efectivo del reactor.....	19
Ec. (2.12). Tiempo de fermentación.....	19
Ec. (2.13). Potencia consumida por el agitador por unidad de volumen del cultivo.....	19
Ec. (2.14). Relación de altura – diámetro del biorreactor.....	20
Ec. (2.15). Dimensionamiento de los impulsores.....	20
Ec. (2.16). Dimensionamiento de los impulsores.....	20
Ec. (2.17). Relaciones de escala por semejanza geométrica.....	20
Ec. (2.18). Potencia del agitador.....	20
Ec. (2.19). Calores involucrados en el biorreactor.....	20
Ec. (2.20). La energía o calor disipada por el agitador.....	21
Ec. (2.21). El calor intercambiado con la chaqueta.....	21
Ec. (2.22). El calor necesario para alcanzar la temperatura deseada.....	21
Ec. (2.23). El balance de agua para el enfriamiento.....	21
Ec. (2.24). Velocidad de agitación.....	21

Simbología

F_{max} : Flujo de operación

V : Volumen del reactor

D_{crit} : Velocidad de dilución de vaciado

$V_{\%}$: Fracción de volumen ocupado por el caldo de fermentación

F : Tasa de flujo (h^{-1})

t :Tiempo

K_S : Constante de saturación

S_{in} : Concentración de sustrato inicial ($g L^{-1}$)

S_{out} : Concentración de sustrato final ($g L^{-1}$)

μ : Tasa específica de crecimiento

X : Concentración celular

μ_{max} : Máxima velocidad específica de crecimiento ($tiempo^{-1}$)

V : Volumen del líquido en el fermentador (m^3)

D_t : Diámetro interno del reactor (m)

H : Altura del líquido en el fermentador (m)

Re : Número de Reynolds

n : Velocidad de rotación del impelente en (S^{-1})

D_i : Diámetro del impulsor (m)

ρ : Densidad (kg/m^3)

μ_L : Viscosidad dinàmica del líquido ($N \cdot s / m^2$)

n : Número de impelente

N : Velocidad del agitador (rpm)

P_g : Tipo de agitador

Np : Número de potencia de trabajo

Np' : Número de potencia calculado

I : Ancho de los baffles

Q_{ac} : Calor acumulado

Q_{gen} : Calor generado

Q_{ag} : Calor disipado por el agitador

Q_{air} : Calor por aireación

Q_{sen} : Calor sensible

Q_{int} : Calor intercambiado con la chaqueta

Q_{evap} : Calor por evaporación

U : Coeficiente global de transferencia de calor

A : Área de transferencia de calor

Δ_T : Diferencia media de temperatura entre el medio de cultivo y el medio de enfriamiento

λ : Coeficiente de conductividad térmica de la pared

Q : Flujo de calor

$a_{1,2}$: Coeficientes de transferencia de calor del fluido a la pared y de la pared al otro fluido.

$d_{1,2}$: Diámetro interior y exterior de la tubería

b : Es un coeficiente adimensional que varía en dependencia del tipo de material

L : Longitud de la pared cilíndrica

% AR: Porcentaje de azúcares reductores

μ : Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

Do_f : Densidad óptica final

Do_i : Densidad óptica inicial

T : Tiempo de la densidad óptica final (h)

TD : Tiempo de duplicación

λ : Fase lag o de adaptación

V_R : Es el volumen del cultivo

C_i : Es la concentración molar del componente

r_{fi} : Es la velocidad de formación del producto

Np : Requerimientos de potencia

rad/s : Velocidad en la punta del impulsor
 $K_L a$: Coeficiente de transferencia de oxígeno (S^{-1})
 P_δ : Potencia de agitación en un sistema gaseado (HP)
 V : Volumen del líquido en el fermentador (m^3)
 H : Altura del líquido en el fermentador (m)
 d_B : Diámetro de las burbujas del aire alimentado (mm)
 D_t : Diámetro interno del reactor (m)
 D_i : Diámetro del impulsor (m)
 H_L : Altura del líquido (m)
 H_i : Altura del fondo del reactor al impeler (m)
 L_i : Ancho del impeler (m)
 W_i : Alto del impeler (m)
 W_b : Ancho del baffle (m)
 N_b : Número de baffles
 V_C : Volumen del cilindro
 δ_C : Factor de conversión (9.8 kg m/kg S^2)
 P : Potencia
 f_c : Factor de corrección
 P_{real} : Potencia de agitación en un sistema gaseado
 N_a : Número de aireación
 q : Caudal de aire (m^3/s)
 V_S : Velocidad superficial
 ε : Retención de gas.
 V_g : Volumen de burbujas de gas en el reactor en (m^3).
 V_l : Volumen de líquido en el fermentador en (m^3)

CAPÍTULO 1: ASPECTOS GENERALES

1.1 Introducción

La producción agrícola ha aumentado gracias al crecimiento poblacional y a las exigencias actuales del mercado de consumo. Se estima que la población mundial será entre de 9,4 y 10 billones para el 2050. Como respuesta a la creciente demanda de alimentos se ha venido usando frecuentemente fertilizantes y plaguicidas para aumentar la producción y protección. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos químicos ha tenido efectos secundarios que impactan negativamente el ambiente y la salud humana (ONU, 2017).

En Nicaragua la situación actual del uso de plaguicidas según el estudio realizado por el CIRA (2020), afirma que los resultados obtenidos del muestreo en vegetales de alto consumo provenientes de zonas agrícolas de Nicaragua y comercializados en Managua, indican la presencia de residuos de plaguicidas en el 82 % de las 44 muestras analizadas, de las cuales el 36 % sobrepasan los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por el Codex alimentarius y las Normas de la Unión Europea. En un estudio realizado por Arthur & Dara (2018), proponen el uso de bioplaguicidas como una alternativa viable y sostenible para el control de plagas en los cultivos, debido a que estos bioproductos no dejan residuos tóxicos y por lo general son específicos hacia su blanco biológico.

En el Laboratorio de Microbiología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), se han realizado estudios relacionados con el aislamiento y caracterización microbiana a partir de bioinsumos comerciales. Un primer estudio fue el realizado por Flores y Roque (2017) en el cual se obtuvieron 2 cepas del género *Bacillus* (*B. subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G)) con un gran potencial antagónico frente a hongos fitopatógenos como *Alternaria Alternata*, *Fusarium sp* (aislado de papa) y *Fusarium Sp* (aislado de maní).

Un segundo estudio se realizó por Úbeda y Páramo (2018); en el cual se desarrolló a nivel de laboratorio el estudio sobre la cinética de crecimiento de las cepas en medio sintético para la formulación de un bioplaguicida con las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas y caracterizadas en el primer trabajo. Debido a lo antes explicado, el presente estudio es una continuación del trabajo ejecutado por Úbeda y Páramo (2018), por tanto, en la presente investigación se estableció un medio de cultivo no sintético de bajo costo que permitió obtener las mejores condiciones de fermentación, se tomó como criterio de evaluación la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* LS6-11G, para generar la mayor productividad de los microorganismos aislados y seleccionados procedentes del banco de aislados del PIENSA – UNI, culminando con una proyección de un diseño tecnológico para la producción de un bioinsecticida a base

de la cepa *Bacillus subtilis* (LS6-11G) utilizando como criterio de escalamiento la semejanza geométrica del modelo experimental.

1.2 Antecedentes

Los primeros intentos de manejar plagas utilizando enemigos naturales, datan de 1930, desde que se introdujo a Singapur el parasitoide Avispita amarilla de la India (*Eretmocerus serius silvestre*) para el control de la mosca prieta de los cítricos (*Aleurocanthuswooglumi sabih*; Vázquez y Castellanos, 1997). A nivel mundial y nacional se han realizado numerosas investigaciones donde se han aislado bacterias del género *Bacillus*, a partir de muestras recolectadas en la rizósfera de distintos cultivos, así como la producción a escala piloto o industrial para la elaboración de bioinsecticidas con el fin de probar su acción antifúngica frente a fitopatógenos. Dentro de estas destacamos las siguientes:

- Un primer estudio fue la investigación realizada por Flores y Roque (2017) indicando en sus resultados el aislamiento y caracterización de dos cepas del género *Bacillus* (*B. subtilis* DCL-31 (F) y LS6-11G)), estas bacterias demostraron un gran potencial antagónico frente a hongos fitopatógenos. El presente estudio partió de la investigación realizada por Úbeda y Páramo (2018) en el que se desarrolló a nivel de escala banco laboratorio un bioplaguicida con las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas y caracterizadas por Flores y Roque (2017), obteniendo la cinética de crecimiento de las cepas en medio sintético. Otros estudios tomados como referencia son:
- De acuerdo con Miranda, *et al.*, (2020) indican la evaluación del crecimiento de *B. subtilis* a nivel de escala banco de laboratorio utilizando caldo melaza como sustrato, obteniendo un máximo crecimiento de *Bacillus subtilis* de 1.9×10^7 UFC mL⁻¹ al cabo de 8 horas de incubación y un recuento de 8.7×10^7 UFC mL⁻¹ después de transcurridas 24 horas.
- Según Magdi, *et al.*, (2010) manifiestan en su estudio en el cual utilizaron melaza de caña como sustrato a nivel de escala banco de laboratorio, que la mayor producción de biomasa bacteriana de *Bacillus subtilis* fue 7.06×10^7 UFC mL⁻¹ al cabo de 24 horas de incubación.
- En su estudio Yáñez (2012) menciona que la producción de *B. subtilis* CPA-8 en un medio de bajo costo. En dicho estudio se desarrolló un medio de cultivo no sintético que proporcionó un alto crecimiento de microorganismos y mantuvo la eficacia de biocontrol. Para dicho medio utilizaron melaza a 5 g L⁻¹ en combinación con harina de soya desengrasada al (44%) y suplementado con minerales que proporcionó una alta producción de *B. subtilis* CPA-8 en torno a 3.5×10^9 UFC mL⁻¹.
- Delgadillo, *et al.*, (2018) demuestran en sus resultados la evaluación de 3 temperaturas: 15°C, 28°C y 37°C en el crecimiento bacteriano de 3 cepas de

Bacillus subtilis en caldo de infusión de papa, en dicho estudio la temperatura óptima de crecimiento para las tres cepas de *Bacillus subtilis* fue de 28°C a una agitación de 120 rpm durante 18 horas.

1.3 Justificación

Las pérdidas en la producción de alimentos causada por la incidencia de enfermedades, además del impacto ecológico al tratar de hacer un control mediante el uso de plaguicidas químicos y la demanda insatisfecha de productos orgánicos en el mercado internacional, constituyen actualmente algunas de las principales limitantes en el sector agrícola. En Nicaragua, se estima que las pérdidas por concepto de plagas y enfermedades podrían llegar hasta el 30% de la cosecha (IICA, 1992).

En la actualidad, la bacteria *Bacillus subtilis*, es la base de diferentes estudios e investigaciones para el desarrollo o mejora de productos comerciales debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal mediante la producción de sustancias que permiten una mejor absorción de nutrientes por parte de las plantas e inhiben la aparición de microorganismos patógenos en éstas, además del interés por su esporulación lo que permite su supervivencia en ambientes adversos y por un tiempo más prolongado que otros microorganismos (Araujo, 2008). En los últimos años las industrias han estado en una constante búsqueda para desarrollar productos biológicos aplicables a la agricultura, pues el interés por éstos ha ido incrementando considerablemente (Bashan, 1998).

Debido a lo anterior, se incluyeron métodos volumétricos y técnicas microbiológicas para establecer un medio de cultivo no sintético a base de melaza para la evaluación de las condiciones de la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* en el medio no sintético. Además, se proyectó un diseño tecnológico para la producción del bioinsecticida en escalas superiores.

1.4 Objetivos de la Investigación

General:

- Desarrollar a Escala Banco de Laboratorio el Proceso de Producción de un Bioinsecticida a Base de *Bacillus subtilis* (LS6-11G).

Específicos

- Establecer un Medio No Sintético a Base de Melaza para el Crecimiento Bacteriano.
- Evaluar las Condiciones de la Cinética de Crecimiento Microbiano de *Bacillus subtilis* (LS6-11G) en el Medio No Sintético.
- Proyectar un Diseño Tecnológico de la Producción de un Bioinsecticida a Base de la cepa *Bacillus subtilis* (LS6-11G), utilizando como Criterio de Escalamiento la Semejanza Geométrica del Modelo Experimental.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2. Insecticidas biológicos

Fernandez (2002), argumenta que los bioinsecticidas son productos que atacan a los insectos u otro tipo de plagas, y que contienen como ingrediente activo un microorganismo o una sustancia extraída de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Del mismo modo, relata en sus artículos que los productos biológicos presentan ciertas ventajas como la especificidad en su actuación y que no causan ningún impacto negativo sobre el medio ambiente. Además, contrario a los productos químicos, no se presenta generación de resistencia.

Los bioinsecticidas presentan algunas desventajas frente a los productos químicos comerciales, como una efectividad de control en general menos rápida, mayor exigencia técnica en la producción a nivel comercial y por ser partículas vivas o proteínas en medio natural, son relativamente sensibles a las condiciones de almacenamiento y al ambiente como la temperatura, la radiación UV y la humedad (Borges, 1998).

***Bacillus subtilis* como agente de control biológico:** *Bacillus subtilis* es la principal especie que produce antibiótico llamado subtilina; un péptido que contiene lantionina y que poseen una alta actividad antimicrobiana frente a varias bacterias Gram positivas, debido a sus puentes de sulfuro: meso-lantionina y 3- metillantion (Ñacato & Valencia, 2016). Según Obiageli & Laing (2007) indican que por el efecto antifúngico que produce la bacteria, y la capacidad de producir endosporas, se utiliza en la industria ya que contribuye al biocontrol y para su obtención esta es aislada del medio ambiente, especialmente del suelo y tiene la gran ventaja de no ser perjudicial para la salud humana, además de ser resistentes a la desecación, por lo que puede formularse fácilmente en productos estables para venta comercial.

Estos microorganismos, se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobias estrictos o anaerobias facultativas que en condiciones estresantes forman una endospora central, que deforma la estructura de la célula. Esta forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis, *et al.*, 2006).

Estas bacterias promueven la mejora en el rendimiento de los cultivos por medio de tres mecanismos: (1) promoción de la nutrición y crecimiento de la planta hospedera; (2) antagonismo contra hongos, bacterias, nematodos, patógenos, insectos y (3) estimulación de

los mecanismos de defensa de la planta. Se ha encontrado que promueven la resistencia sistémica inducida (RSI) (Maheshwari, 2010). Debido a estas características, las bacterias de este género pueden considerarse como promotoras del crecimiento y por lo tanto tienen potencial en la implementación de tecnologías de agricultura sustentable.

2.1 Medio no sintético

Tortora, *et al.*, (2007). Argumentan que los medios no sintéticos generan una alta productividad de microorganismos y contienen ingredientes de origen natural cuya composición no es completamente conocida. Generalmente los substratos utilizados son fuentes de nitrógeno orgánico como extracto de levaduras, carne o plantas o digeridos de proteínas de estas y otras fuentes. Estos substratos satisfacen los requerimientos de energía, carbono, nitrógeno y azufre de los microorganismos y proporcionan aminoácidos, oligoelementos, vitaminas y factores de crecimiento orgánicos para una alta producción (Tortora, *et al.*, 2007). Los subproductos usados en el medio de cultivo deben satisfacer los requisitos básicos de cada microorganismo para la producción de biomasa y metabolitos, al proporcionar un suministro adecuado de nutrientes y energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular (Stanbury, *et al.*, 1995).

2.1.1 Melaza de caña

Es un subproducto proveniente de la elaboración del azúcar, a partir de la caña de azúcar y en menor grado de la remolacha azucarera. Se recomienda su uso debido al bajo costo y a su composición rica en azúcares fermentables (principalmente de sacarosa en un 50 %), sustancias nitrogenadas, vitaminas del grupo B y abundantes minerales como hierro, fósforo, potasio, zinc, sodio, cobre y magnesio que dichos minerales constituye una de las fuentes de carbono más utilizadas para la producción industrial de microorganismos (Younis, *et al.*, 2010).

En el ámbito Nacional se tomará como referencia un estudio elaborado por Ivanova (1995), donde se realizó una caracterización a la melaza que se encontraba en Nicaragua, demostrando mediante valores obtenidos la posibilidad de utilizar la melaza como sustrato ya que cumple con todos los requisitos necesarios desde el punto de vista nutricional para los microorganismos, además de poder emplearla en procesos fermentativos individuales o compuestos, ya que a través de dichos valores se demostró que no presentó diferencias sustanciales y haciendo énfasis en la utilización de dicha miel como sustrato en procesos biotecnológicos debido a su bajo costo y fácil obtención en el mercado Nacional.

Composición de la melaza: Según Castro (1993), sostiene que la melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles. Las melazas contienen sustancias reductoras no fermentables las cuales están compuestas por 33% de sustancias inorgánicas (Fe, K, Na, Ca, Mg, Zn, As, Cd, Hg, Pb, Cl, NO₃, S₀₂); el 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes); y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos). La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos de 68-75% y un pH de 5.0-6.1%.

Tabla 1. Composición nutricional por 100 g de melaza (Noriega, 2014).

Composición	Cantidad (gr)	CDR (%)
Kcal	242	12.60%
Carbohidratos	69.6	22.40%
Proteínas	2.4	5%
Fibra	0	0%
Grasas	0.1	0.20%
Minerales	Cantidad (mg)	CDR (%)
Sodio	43	2.70%
Calcio	218	18.20%
Hierro	6.7	83.80%
Magnesio	0	0%
Fósforo	45	6.40%
Potasio	1,238	61.90%

Ph: En el estudio realizado por Swan & Karalazos (1990) relata que las melazas de caña son ligeramente ácidas, tienen un pH entre 5.5 y 6.5, un pH bajo es atribuible a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH de la clarificación, si es ácida. El pH de las melazas cambia con la temperatura y depende también de su naturaleza. La acción estabilizadora del pH tiene efecto sobre la melaza para resistir la adición de ácidos o álcalis sin cambiar su naturaleza

ácida o básica. En la melaza la acción estabilizadora depende del contenido de no azúcares y de las características de la melaza. La estabilización del pH en las melazas de caña tiene un patrón uniforme, es decir, no existen variaciones irregulares debidas a relaciones de cambio de peso entre las sustancias que intervienen, por lo tanto, la actividad estabilizadora se modifica.

Ácidos: El ácido aconítico, es el más abundante de los ácidos orgánicos presentes en la caña que se acumula en las melazas, representando aproximadamente el 6% del peso de sólidos en la melaza. Los ácidos málico y cítrico están presentes en cantidades apreciables en las melazas. El ácido fórmico está presente como producto de descomposición, la mayoría de estos ácidos son metabolizados por los microorganismos, como fuente de carbono y no presentan problemas de inhibición de crecimiento (Castro, 1993).

Clarificación de Melaza: La clarificación de la melaza está comprendida por operaciones de sedimentación y decantación para la separación de los compuestos no fermentables. Gaitán y García (1998) definen que una concentración de azúcares reductores del 4 al 6% es el rango óptimo para dar inicio a un proceso fermentativo.

2.1.2 Prueba de Azúcares Reductores por el método Lane y Eynon

Los monosacáridos constituyen uno de los componentes de interés en las fermentaciones y se encuentran presentes en cantidades importantes en la melaza de caña nacional. En los procesos fermentativos estos constituyen junto con la sacarosa incristalizable la fuente principal de carbono y energía para el crecimiento de los microorganismos. La presencia de los azúcares reductores es muy beneficiosa desde el punto de vista biológico, debido a que esta materia orgánica es fácilmente utilizable por los microorganismos, pues sirve como fuente de carbono y energía para su metabolismo (Ivanova, 1995).

En soluciones alcalinas, la glucosa, la fructosa y otros azúcares reductores tienen la propiedad de oxidarse a sus respectivos ácidos carboxílicos, reduciendo el cobre en estado cúprico a óxido cuproso. El método volumétrico de Lane y Eynon calcula el volumen de una solución de prueba que se requiere para precipitar todo el cobre presente en una cierta cantidad de solución de Fehling de concentración conocida (Herrera, 2011)

El Reactivo de Fehling opera la oxidación alcalina de aldosas y de cetosas que van a transformarse en ácido glucónico. Está compuesto de dos soluciones A y B que deben mezclarse al momento de su uso. La solución A contiene (CuSO_4) . La solución B contiene tartrato de sodio en (NaOH) . El tartrato tiene la función de acomplejar al (Cu^{2+}) produciendo coloración azul. La especie oxidante es el (Cu^{2+}) que se reduce a (Cu^+) precipitando como óxido de cobre (Cu_2O) rojo. En condiciones especificadas, la cantidad de cobre reducido está

en proporción con la cantidad de azúcares reductores presentes. Los métodos de reducción del cobre para determinar la cantidad de azúcares reductores no son estequiométricos, la cantidad de cobre reducido depende de las condiciones de la medición. Por esta razón, en todos los métodos de reducción del cobre deberán cumplir exactamente las condiciones analíticas (Herrera, 2011).

A partir de la titulación por Fehling el cálculo del porcentaje de azúcares reductores en la disolución se realiza con la siguiente Ecuación.

$$\% AR = \frac{\text{Factor}}{((V_{\text{muestra}})(T_{\text{título}}))} \times 10 \quad \text{Ec. (2.1)}$$

Dónde: *V_{muestra}* es el volumen de la muestra, *T_{título}* representa el volumen de disolución de azúcar (Titulante) utilizados en la valoración y *Factor* es el valor correspondiente al *Título*. En el Cuadro 4 en la sección de Anexos se representa la relación entre el *Título* y *Factor* (Azúcar invertido no sacarosa).

2.2 Crecimiento Microbiano

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último, se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación (Úbeda y Páramo, 2018).

Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones, ya que en los microorganismos debido a su pequeño tamaño no se hacen estudios de crecimiento individual sino estudios de crecimiento de poblaciones. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica. La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación (G) y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días (Úbeda y Páramo, 2018).

2.2.1 Crecimiento microbiano en cultivo discontinuo

El cultivo discontinuo se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables, que produce una serie de eventos característicos denominada **Curva de Crecimiento**, la cual se representa por una gráfica del peso seco celular o biomasa (x), (g/L) contra el tiempo de incubación en horas (h). La curva resultante tiene cuatro fases diferentes, tal como se muestra en la **Figura 1**. (Úbeda y Páramo, 2018).

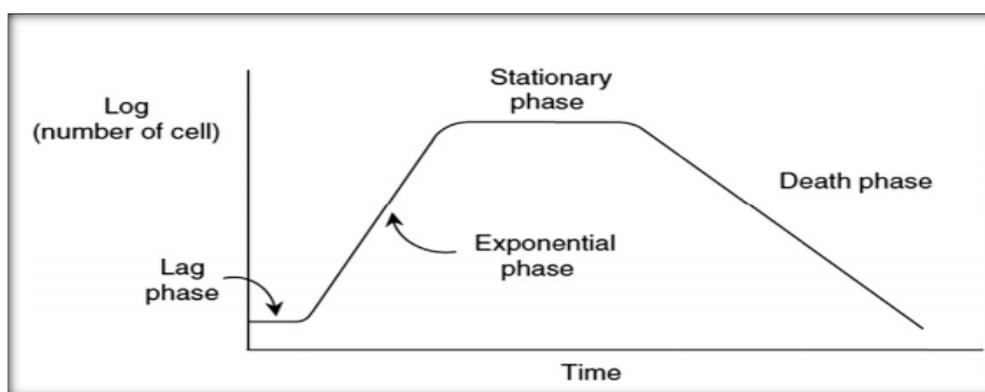


Figura 1. Fases de la cinética del crecimiento microbiano. (Fuente: Najafpour, 2015).

Fase Lag o latencia: La fase Lag, no muestra casi ningún crecimiento celular aparente. Este es el tiempo que representa la adaptación de los microorganismos al nuevo entorno, sin mucha replicación celular y sin signos de crecimiento. La duración de la fase de retraso depende del tamaño de los inóculos. También es el resultado del impacto en el medio ambiente cuando no hay período de aclimatación. Incluso las concentraciones altas de nutrientes pueden causar un retraso prolongado en la fase Lag. Se ha observado que los estimulantes del crecimiento y los metales traza como los iones de magnesio pueden reducir drásticamente la fase de Lag (Najafpour, 2015). Sin embargo, si las células provienen de un medio idéntico y si han sido obtenidas de un cultivo joven o en fase de crecimiento exponencial, la fase de latencia será corta o inexistente (Apella & Araujo, 2005).

Fase de crecimiento exponencial: Es la fase en que las células comienzan a dividirse y entran en un periodo de crecimiento o de incremento logarítmico, razón por la cual es denominada como fase logarítmica o de crecimiento exponencial (Tortora, *et al.*, 2010). Frecuentemente se habla de ésta como la fase de “crecimiento equilibrado”, donde la síntesis

de todos los constituyentes celulares aumenta con rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares (Scragg, 1999).

Fase estacionaria: La fase estacionaria se presenta como consecuencia del agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, lo cual disminuye la velocidad de crecimiento hasta que llega a detenerse. La transición entre la fase exponencial y estacionaria implica una etapa de crecimiento desequilibrado, durante el cual los componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. En consecuencia, las células en fase estacionaria tienen una composición química diferente a la de las células en fase exponencial (Apella & Araujo, 2005).

Fase de muerte: En esta fase se produce una reducción del número de células viables del cultivo. Después del período estacionario las células mueren más rápidamente, siendo mayor el número de células que mueren y menor el número de células que se producen. Gran variedad de condiciones contribuye a la muerte de la célula, pero las más importantes son el agotamiento de sustancias nutritivas esenciales y la acumulación de productos inhibidores como ácidos. (Scragg, 1999).

2.2.2 Concentración celular por conteo en placa

La forma de cuantificar las células viables más utilizada en microbiología, es la de hacer diluciones y cuenta en placa con medio de cultivo específicos para la población de interés. Esta técnica se basa en la suposición de que cada bacteria incluida en un medio de agar o en su superficie se multiplicará y producirá una colonia visible, en consecuencia el número de colonias que se observarán a simple vista será igual al número de bacterias viables o unidades formadoras de colonias (UFC) inoculadas en el agar multiplicadas por la dilución (Ramos y Pérez, 2004).

2.2.3 Determinación de Biomasa

Sandoval (2019), expresa que existen varios métodos de cuantificación de biomasa y uno de los más usados es el método espectrofotométrico. Sin embargo, la espectrofotometría es un método indirecto, por lo cual es necesario realizar una curva de calibración con un método directo para determinar la concentración celular (**Figura 2 B**). De acuerdo (Úbeda y Páramo, 2018), el mecanismo de función de un espectrofotómetro se basa en el hecho de que un cultivo de bacterias actúa como una suspensión coloidal que intercepta la luz que pasa a través de ella (**Figura 2 A**). Dentro de ciertos límites, la cantidad de luz que es absorbida es directamente proporcional a la concentración de células; es decir que la densidad óptica es una medida de la luz absorbida y/o dispersada por la muestra.

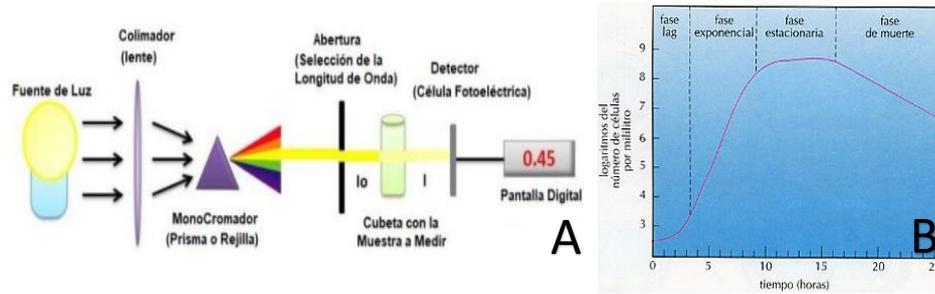


Figura 2. Curva de crecimiento por determinación Turbidimétrica. A) Representación del funcionamiento de un espectrofotómetro para la lectura de la absorbancia. (Fuente: Cantu, 2019). B) Curva de crecimiento del microorganismo. (Fuente: Úbeda y Páramo, 2018).

2.2.4 Determinación de parámetros cinéticos

Castañeda (2019) relata que Jacques Monod describió en el año 1940 una ecuación que relaciona (μ) con la concentración de sustrato limitante (S), la cual conocemos en la actualidad como ecuación de Monod (**Ecuación 2.2**). Esta ecuación trata de describir las observaciones de varios experimentos que él realizó donde percibió que a bajas concentraciones de sustrato (μ) variaba, mientras que a mayores concentraciones (μ) era independiente de la concentración de sustrato. Esto lo expresó matemáticamente, por medio de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad \text{Ec. (2.2)}$$

Esta representación gráfica de la ecuación de Monod (**Figura 3**) es muy similar a la ecuación de Michaelis-Menten, la cual posee dos constantes (μ_{max}) y (K_s). Por un lado, (K_s) se denomina constante de saturación media y es la concentración de sustrato limitante para la cual la velocidad específica de crecimiento es la mitad de (μ_{max}). Por su parte, (K_s) es un parámetro que brinda información acerca de la afinidad de un microorganismo por un sustrato en particular, bajo determinadas condiciones de cultivo. El microorganismo será más afín a un sustrato cuanto menor sea el (K_s) de ese sustrato en las condiciones de crecimiento.

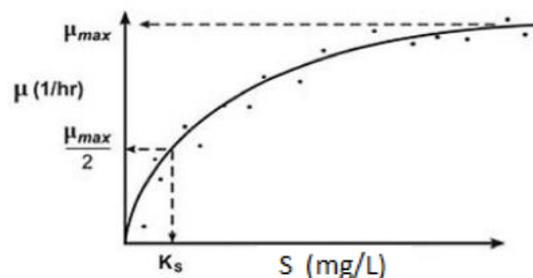


Figura 3. Representación Gráfica de la Ecuación de Monod (Fuente: Castañeda, 2019).

La velocidad específica de crecimiento está influenciada por factores ambientales y factores endógenos. Entre los factores endógenos está la organización morfológica, la regulación y el control intracelular. Por ello, no es ilógico pensar que la velocidad máxima a la cual puede reproducirse un microorganismo dependerá esencialmente de la complejidad del sistema celular y por ende, del tipo de microorganismo que se trate. (μ_{max}) Como vemos está relacionada con el tiempo que tarda un microorganismo en duplicarse. A este tiempo se lo denomina tiempo de duplicación (TD) (Castañeda, 2016).

Arana, *et al.*, (2016) describen las Ecuaciones para determinar la velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación y constante de saturación (K_s).

$$\mu = \frac{[\ln(N_f) - \ln(N_o)]}{\Delta T} \quad \text{Ec. (2.3)}$$

Dónde:

μ : Es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

$\ln(N_f)$: Logaritmo natural de la densidad celular final

$\ln(N_o)$: Logaritmo natural de la densidad celular inicial

ΔT : Variación del tiempo

$$TD = \ln 2 / \mu_{max} \quad \text{Ec. (2.4)}$$

Dónde:

TD : Tiempo de duplicación

μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento

$$K_s = \mu_{max} / 2 \quad \text{Ec. (2.5)}$$

2.2.5 Cinética de un cultivo Batch

Najafpour (2015), detalla que el cultivo Batch, se desarrolla en un recipiente simple y bien controlado en el que la concentración de nutrientes, células y productos varía con el tiempo a medida que avanza el crecimiento del microorganismo. El balance de materiales en el reactor puede ayudar a seguir las reacciones bioquímicas que ocurren en el medio. En la fermentación por lotes (Batch), las células vivas se propagan y muchos parámetros de los medios desaparecen a través de cambios secuenciales con el tiempo a medida que crecen las células. Los siguientes parámetros se monitorean mientras continúa el proceso:

- Células y subproductos celulares

- Concentración de nutrientes
- Productos deseables e indeseables
- Inhibición
- pH, temperatura, concentración de sustrato

El objetivo de un buen diseño de proceso es minimizar el período de la fase de retraso (Lag) y maximizar la duración de la fase de crecimiento exponencial. El balance de sustrato en un cultivo por lotes para el componente (i) en el volumen de cultivo de (V_R) y el cambio de concentración molar de (C_i) es igual a la tasa de formación de producto:

$$\frac{d}{dt}(V_R \times C_i) = V_R \times r_{fi} \quad \text{Ec. (2.6)}$$

Donde (V_R) es el volumen del cultivo, el cual se asume constante mientras no se remueva o agregue líquido al medio, (C_i) es la concentración molar del componente (i) y (r_{fi}) es la velocidad de formación del producto. La ecuación anterior es reducida a:

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} \quad \text{Ec. (2.7)}$$

La tasa de formación de producto, (r_{fi}), depende del estado de la población celular, las condiciones ambientales, la temperatura, el pH, la composición del medio y la morfología con la distribución de la edad celular del microorganismo. (Baily & Ollis, 1986). La fase exponencial del crecimiento microbiano en un cultivo Batch es definido por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ec. (2.8)}$$

Al no presentar eliminación de células el recipiente del lote y la tasa de propagación de células es proporcional a la tasa de crecimiento específica, μ (h^{-1}), utilizando la ecuación de crecimiento diferencial se obtendría la concentración celular con respecto al tiempo es:

$$X(t) = X_o e^{\mu t} \quad \text{Ec. (2.9)}$$

2.3 Diseño tecnológico del escalamiento de un proceso biológico

Generalidades del escalado: Gonzalez (2018) describe que el escalado es el proceso mediante el cual se logra la exitosa puesta en marcha y la operación económica de una unidad a escala comercial basándose, al menos en parte, en resultados de investigaciones realizadas a una escala más pequeña.

Factores del diseño tecnológico: Dorán (1999) determina que los principales factores que intervienen en el diseño de un modelo tecnológico son:

1. Determinar el volumen requerido del rendimiento obtenido a escala de banco (o en una escala piloto anterior) y la capacidad de producción deseada.
2. Calcular las dimensiones del equipo mayor por semejanza geométrica.
3. Escoger una estrategia de escalado en vista de que la de uso más común actualmente en fermentaciones aeróbicas es la de $(K_L a) = \text{constante}$ (Gaitán y García, 1998).

Modo de operación: La Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana (2014) describe que el modo de operación de un sistema de cultivo, es sinónimo del modo de operar del biorreactor o fermentador. Este no solo influye en el diseño propio del reactor, también, en el modelo cinético de crecimiento del cultivo y en el proceso de producción. Existen tres modos de cultivo aunados a tres modos básicos de operación:

- **Discontinuo (batch):** por lotes o tandas, sin alimentación (F); se coloca dentro del biorreactor la carga total de cada proceso (tanda o lote) de cultivo o fermentación y se dejar que se lleve a cabo el proceso productivo o la fermentación por el tiempo que sea necesario; el cuál se denomina tiempo de retención.
- **Semicontinuo (fed-batch):** por lotes alimentados, con alimentación de entrada (F1); se alimenta una línea de entrada o alimentación (F1) para que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo de crecimiento (exponencial) y aumente la productividad.
- **Continuo (continuos):** por quimiostato, se alimenta una línea de entrada F1 o alimentación y se drena una línea de salida F2 o lavado; de manera que los flujos o caudales de ambas líneas sean iguales y la producción sea continua.

2.3.1 Criterios del escalamiento biológico

Según Quintero (1981), en la práctica se utilizan varios criterios para efectuar el cambio de escala, todos ellos basados en resultados empíricos, y de esta forma, existen relaciones que resumen los criterios empleados para cambio de escala en tanques agitados por medios mecánicos y las relaciones entre variables de operación y diseño.

Existen diversos criterios de escalamiento, los cuales asignan parámetros que deben mantenerse constantes en cada una de las escalas, entre ellos:

- Requerimientos de potencia (Np).
- Circulación del líquido (Q/V).
- Velocidad en la punta del impulsor (rad/s).
- Número de Reynolds (Re).

- Coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L a$)
- Similitud geométrica

Stanbury, *et al.*, (1995), argumenta que, en cualquiera de estos casos, se deben tener en cuenta tres aspectos determinantes en la realización del escalamiento.

- Identificar el parámetro ambiental que resulta principalmente afectado por la aireación y agitación.
- Identificar una variable de proceso que afecte la anterior variable.
- Calcular el valor de la variable de proceso que al utilizarse en gran escala permita obtener las mismas condiciones ambientales que en pequeña escala.

Biorreactor. Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Según indica la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana (2014). Este proceso puede ser aeróbico o anaerobio. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable.

Hubbard (1987) argumenta que el escalado de un bioproceso en un biorreactor involucra mantener las condiciones requeridas para el crecimiento sin importar en que volumen se esté llevando a cabo la fermentación. Esto implica que, si las condiciones son las mismas y no ocurre ninguna alteración que pueda cambiar el desarrollo de la cinética o de los productos metabólicos, la producción por unidad de volumen será la misma. Esto estará relacionado a prestar atención a las variables de mezclado, aireación, pH y temperatura.

2.3.2 Estrategia de escalamiento de un diseño tecnológico

Durango (2007), argumenta que antes de realizar el escalado, es necesario conocer algunos datos de operación y de diseño del biorreactor utilizado, así como las propiedades del medio de cultivo y datos básicos de diseño de los biorreactores a utilizar en la escala siguiente.

- D_t : Diámetro interno del reactor
- D_i : Diámetro del impulsor
- H_L : Altura del líquido
- H_i : Altura del fondo del reactor al impulsor
- L_i : Ancho del impulsor
- W_i : Alto del impulsor
- W_b : Ancho del baffle

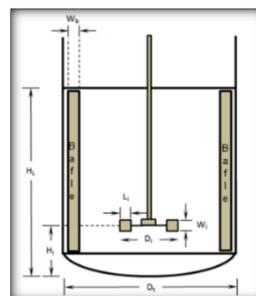


Figura 4. Diseño de Biorreactor. (Fuente: Dorán, 1999).

N_b : Número de baffles

V_c : Volumen del cilindro

Alfonso, *et al.*, (2019), describe que determinar el volumen del reactor y el rango de caudales se hace relacionando el volumen del reactor (V) y el rango de los caudales a utilizar (F_{max}), son parámetros directamente proporcionales.

$$F_{max} = K V \quad \text{Ec. (2.10)}$$

Donde (K) representa un valor lo suficientemente pequeño como para prevenir el vaciado celular cuando se opera en dicho (F_{max}). Para esto, se debe establecer una proporción entre el límite superior del rango de caudales a utilizar y el volumen efectivo del reactor, donde se obtenga una proporción en la que no se produzca el vaciado celular. Esta proporción se ve determinada por:

$$\frac{F_{max}}{V} = D_{crit} \times V_{\%} \quad \text{Ec. (2.11)}$$

Para establecer el tiempo de fermentación y las relaciones de magnitudes en el reactor modelo o banco, se buscan los criterios de escalado más apropiados para el caso de estudio. En el sistema se mantiene el principio de semejanza entre el modelo y el prototipo, pero en procesos biológicos es necesario además un criterio de escalado, que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo, y este criterio sería el régimen de cambio entre ambas escalas (Muñoz, 2016).

$$t = \int_{X_0}^X \frac{Ks+S}{\mu_{max} * X * S} * dX \quad \text{Ec. (2.12)}$$

Alfonso, *et al.*, (2019) describen que una vez establecido el tiempo de fermentación y las relaciones de magnitudes en el fermentador modelo o banco, se busca los criterios de escalado más apropiado para el caso de estudio. En el sistema se mantiene el principio de semejanza entre el modelo y el prototipo, pero en procesos biológicos es necesario además un criterio de escalado, que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo, y este criterio sería el régimen de cambio entre ambas escalas. El criterio de escalado que marca el régimen de cambio es el de potencia consumida por el agitador por unidad de volumen del cultivo P_g/V , donde para que sea llevado a efecto en la práctica existe la relación:

$$\frac{P_{g1}}{V_1} = \frac{P_{g2}}{V_2} \quad \text{Ec. (2.13)}$$

Dónde:

P_{g1} : Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor modelo (W)

P_{g2} : Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor prototipo (W)

V_1 : Volumen del biorreactor modelo (m^3)

V_2 : Volumen del biorreactor prototipo (m^3)

Alfonso, *et al.*, (2019), sostienen que para el cálculo del dimensionamiento hay que tener en cuenta el espacio disponible en la planta. Las dimensiones se calculan con una relación de altura - diámetro (H: D) de 2:1 mediante la siguiente ecuación:

$$V_F = \frac{\pi * D^2 * H}{4} \quad \text{Ec. (2.14)}$$

El dimensionamiento de los impulsores se calcula en base al tipo de impeller a utilizar, siendo el caso de un impeller del tipo rushton, las ecuaciones son las siguientes:

$$D_i = \frac{D_F}{3}; A_i = \frac{D_i}{5}; D_d = \frac{2D_i}{3}; L_i = \frac{D_i}{4} \quad \text{Ec. (2.15)}$$

$$H_a = 1 * D_i; H_b = 2 * D_i; H_c = 3 * D_i \quad \text{Ec. (2.16)}$$

Para completar el diseño de un biorreactor prototipo se debe estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Alfonso, *et al.*, (2019), argumentan que la potencia de consumo para la agitación se establece a partir de relaciones de escala por semejanza geométrica definiéndose por la siguiente ecuación:

$$Re: \frac{\rho * N * D^2}{\mu_m} \quad \text{Ec. (2.17)}$$

El régimen de transición de laminar a turbulento ocurre cuando $Re \approx 100$ y el régimen turbulento ocurre cuando $Re \geq 1000$. Para el cálculo de la potencia se emplea el valor descrito para el número de potencia (N_p), se obtiene a partir de correlaciones empíricas para cada tipo de agitador, siendo que:

$$P_g = n * N_p * \rho * N^3 * D^5 \quad \text{Ec. (2.18)}$$

Alfonso, *et al.*, (2019) describen que los calores involucrados en el biorreactor se definen como:

$$Q_{ac} = Q_{ag} + Q_{gen} + Q_{air} - Q_{sen} - Q_{int} + Q_{evap} \quad \text{Ec. (2.19)}$$

Dónde:

Q_{ac} : Calor acumulado

Q_{ag} : Calor disipado por el agitador

Q_{gen} : Calor generado

Q_{air} : Calor por aireación

Q_{sen} : Calor sensible

Q_{int} : Calor intercambiado con la chaqueta

Q_{evap} : Calor por evaporación

La energía o calor disipado por el agitador, se formula con la energía específica que suministra el agitador, para una velocidad de giro específica:

$$Q_{ag} = \frac{P_g}{V} \quad \text{Ec. (2.20)}$$

El calor intercambiado con la chaqueta se define por medio de un balance de calor en el sistema de proceso fluido térmico en la chaqueta, por medio de la siguiente expresión:

$$Q_{int} = U * A * \frac{\Delta T}{V} \quad \text{Ec. (2.21)}$$

Para el calor sensible se define como el calor necesario para alcanzar la temperatura deseada:

$$Q_{sen} = m * C_p * (\Delta T) \quad \text{Ec. (2.22)}$$

El balance de agua para el enfriamiento se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$m_{H_2O} = \frac{Q_{int}}{C_{P(H_2O)} * \Delta T} \quad \text{Ec. (2.23)}$$

Alfonso, *et al.*, (2019), sostienen que la velocidad de agitación y potencia consumida por el agitador se debe calcular para que no exista muerte celular por agitación excesiva, para esto es necesario calcular la velocidad de agitación que deberá tener el biorreactor prototipo, por lo que el valor (N_p) se establece a partir de la siguiente ecuación:

$$N_{p=} N_p \frac{\left(\frac{D}{D_l}\right)^{0.5} \left(\frac{H}{D_l}\right)^{0.5} \left(\frac{I}{D_l}\right)^{0.3}}{\left(\frac{D}{D_l}\right)^{0.5} \left(\frac{H}{D_l}\right)^{0.5} \left(\frac{I}{D_l}\right)^{0.3}} = \frac{\text{Condiciones de trabajo}}{\text{Condiciones estándar}} \quad \text{Ec. (2.24)}$$

En el biorreactor la agitación genera una mezcla homogénea y aumenta la velocidad de transferencia de masa y calor dentro del mismo. Una adecuada velocidad de agitación da lugar al aumento de la productividad del proceso además que favorece la suspensión de sólidos, evitándola la precipitación de los mismos. Debe evitarse altas tasas de agitación para prevenir daño en la estructura celular (González, *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Localización del estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Simón Bolívar, en la Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua (Coordenadas 12°07'42.2"N 86°16'11.5"W). Esto como continuación de una investigación realizada por Úbeda y Páramo (2018), los cuales desarrollaron a nivel de laboratorio un bioplaguicida en medio sintético con el microorganismo *Bacillus subtilis*, el cual fue previamente aislado y caracterizado por Flores y Roque (2017).

3.1.1 Clarificación de la Melaza

Se tomó como referencia el procedimiento descrito por Parajón (2001) para la clarificación de la melaza. La melaza fue diluida en agua destilada en proporción 1:4, para esto se utilizaron probetas graduadas de 500 mL y 3 beakers de 1,000 mL. Los Beakers que contenían la dilución de melaza fueron colocados en baño termostático a una temperatura de 80°C durante 3 horas usando un baño maría a temperatura de 85°C. Seguidamente, los beakers se trasladaron a la cabina de flujo laminar TELSTAR AV-100, se taparon con gasa y se dejaron en exposición a luz UV durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se decantó el sobrenadante y se desechó el precipitado. El sobrenadante fue refrigerado por 24 horas y sellado con papel de aluminio, luego se decantó nuevamente la dilución de melaza en la cámara de flujo laminar TELSTAR AV-100 previamente esterilizada para evitar contaminación (**Figura 5A**). Finalmente, se sellaron los Beakers con papel de aluminio y se almacenó la melaza clarificada en el refrigerador a temperatura aproximada de 9°C hasta el momento de su utilización.

3.1.2 Determinación de Azúcares Reductores por el Método de Lane y

Eynon

La determinación de azúcares reductores en la melaza fue ejecutada mediante las recomendaciones de Gaitán y García (1998). Utilizando la melaza clarificada se realizó una hidrólisis mediante el siguiente procedimiento: en un matraz aforado de 100 mL se agregaron 50 mL de agua destilada y 1 mL de muestra de la melaza clarificada (**Figura 5B**). Se colocó el matraz en baño termostático a una temperatura de 68°C, se añadieron 10 mL de HCl al 21 % calentando por media hora a la misma temperatura. Se enfrió, y adicionó dos gotas de fenolftaleína; llevando a un pH alcalino con NaOH al 40%. Enfriándose nuevamente y aforándose respectivamente (**Figura 5C**).

Para la determinación de azúcares reductores se llenó una bureta de 50 mL con la melaza clarificada. En un Erlenmeyer se agregaron 5 mL de reactivo de Fehling A y 5 mL del B, luego se añadió 5 mL de disolución de melaza de la bureta (**Figura 5D**). Se agitó y calentó el Erlenmeyer hasta que el líquido burbujeó suavemente durante 90 segundos. Transcurrido ese tiempo, se añadió 4 gotas de azul de metileno al 1% y se inició la adición de disolución de melaza a razón de 0.25 mL cada 15 segundos. El líquido se agitó y mantuvo en constante ebullición. Se continuó con las adiciones de disolución de azúcar hasta la desaparición del color azul (**Figura 5F**). La valoración se determinó dentro de los siguientes tres minutos del comienzo de la ebullición. Cabe desatacar que el procedimiento se realizó por triplicado.

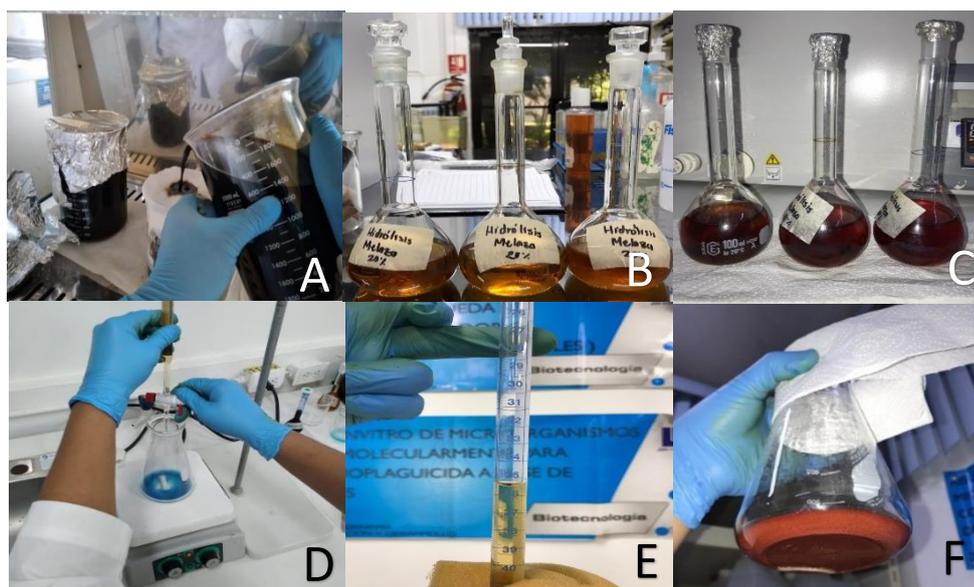


Figura 5. Preparación de medio no sintético a base de melaza. A) Decantación de la dilución de melaza. B) Disolución de melaza. C) Disolución de melaza hidrolizada. D) Adición de reactivos de Fehling. E) Bureta con disolución de melaza hidrolizada para titulación. F) Punto de equivalencia de la reacción de Fehling (Fuente: Propia).

3.1.3 Procedimientos para la preparación del medio no sintético

El sustrato seleccionado para la preparación del medio no sintético fue la melaza. Yáñez (2012) argumenta que la melaza es una excelente opción para ser utilizada como sustrato para el crecimiento de microorganismos, ya que es un subproducto agroalimentario barato y de fácil obtención con una fuente rica en carbono y nitrógeno. Durante su estudio analizó diferentes subproductos agroalimentarios, siendo los formulados a base de melaza los que presentaron un alto crecimiento del microorganismo *Bacillus subtilis*.

3.1.4 Formulación del medio no sintético

Primeramente, se procedió a preparar el caldo y agar melaza, para esto se pesaron 20 gramos de agar-agar y se añadió 1 litro de caldo de melaza a una concentración de un 6% de azúcares reductores y se colocó en un Hot Plate CORNING PC-620D para homogenizar y calentar el medio (**Figura 6A**). Una vez homogenizados, se transfirió el medio en volúmenes de 50 mL a los Erlenmeyers con capacidad de 250 mL, luego fueron sellados con tapones hechos con algodón y se recubrieron con papel aluminio, posteriormente los Erlenmeyers conteniendo el medio no sintético se trasladaron al autoclave YAMATO SQ810C para esterilizar. Al finalizar del periodo de esterilización se vertió el agar melaza en las Placas Petri cerca de un mechero y una vez que el medio de las placas solidificó fue almacenado con el caldo melaza en un refrigerador a temperatura aproximada de 9°C.

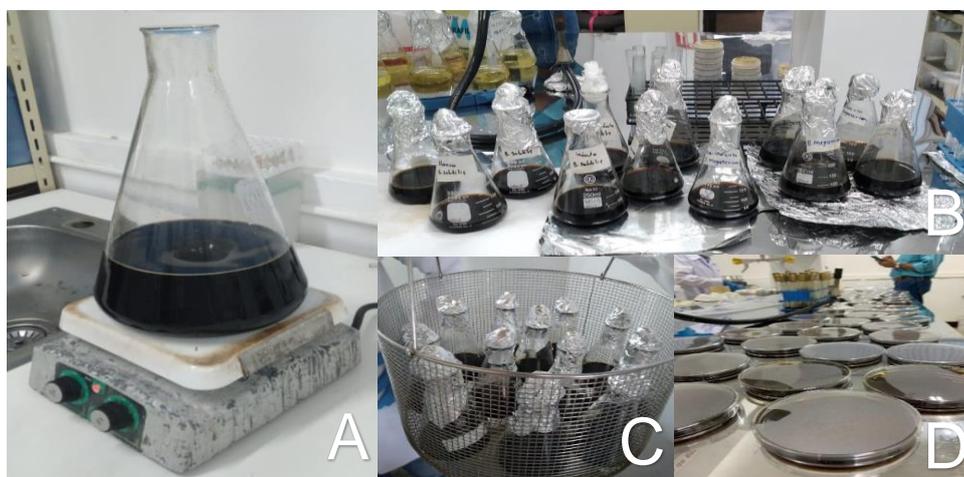


Figura 6. Preparación de medios de cultivo caldo y agar melaza. A) Homogenización del agar-agar con el caldo melaza. B) Preparación de Erlenmeyers con caldo melaza para la esterilización. C) Erlenmeyers con caldo melaza esterilizados. D) Agar melaza solidificado en Placas Petri (Fuente: Propia).

3.2 Conservación de los microorganismos obtenidos

La cepa de *Bacillus subtilis* que se utilizó en este estudio fue suministrada por el laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales PIENSA – UNI. Esta cepa se conservó mediante el método de transferencia periódica. La transferencia de la bacteria se efectuó cada 30 días utilizando el medio Agar Miller (LB). El microorganismo se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 10°C. Según Hernández y Loaiza (2014), relatan que con este método la cepa microbiana permanece activa en el medio en el que ha crecido, este consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo.

3.2.1 Procedimientos previos para la evaluación de la cinética de crecimiento microbiano

Los procedimientos realizados comprenden la preparación de las condiciones para el desarrollo del inóculo a nivel de placa petri mediante la técnica de siembra en superficie, partiendo de un cultivo en medio Agar Miller LB y transfiriéndolo al Medio no sintético formulado con Agar Melaza para el proceso de adaptación del microorganismo. Se establecieron procedimientos para el desarrollo progresivo de *Bacillus subtilis* desde placa petri, preinóculo e inóculo.

3.2.2 Crecimiento del microorganismo en Placa Petri

La multiplicación para la cepa *B. subtilis* (LS6-11 (G)) se realizó en Medio Agar Miller LB, se dejó crecer por 24 horas a 35°C en una incubadora MEMMERT IF750plus. Para esto se utilizó la técnica de siembra de agotamiento por estrías descrito por Sanz (2011) para la obtención de cultivos puros, ver (Figura 7).

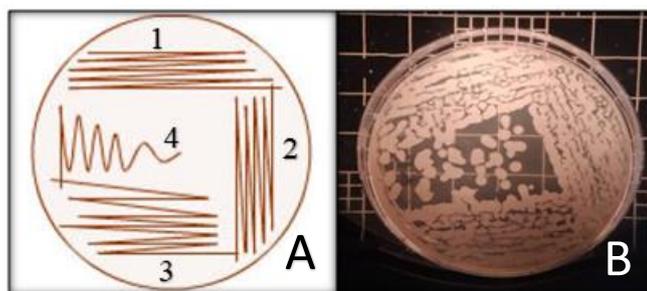


Figura 7. Técnica de siembra de agotamiento por estrías. A) Representación del rayado en la superficie del agar. B) Crecimiento de *Bacillus subtilis* LS6-11G en medio Agar LB (Fuente: Propia).

En principio se esterilizó el asa flameándola en el mechero hasta conseguir un rojo incandescente, seguidamente se enfrió el asa en la proximidad de la llama y se tomó una porción del inóculo de la muestra para luego transferirlo a una placa con medio fresco, colocando el inóculo en un área pequeña de la superficie de la placa próxima al borde. Enseguida se extendió el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa y se flameó de nuevo el asa y enfrió. Luego tomando como inóculo el obtenido mediante el rozamiento del asa de siembra con las estrías sembradas la primera vez, se realizó sobre una porción virgen de la placa una segunda tanda de estrías cuidando que no toque la primera para luego flamear y enfriar nuevamente el asa, repitiendo exactamente la operación descrita anteriormente para cada cuadrante. Finalmente se flameó

el asa y se taparon las placas de Petri dejándolas en incubación a una temperatura de 35°C y en posición invertida.

3.2.3 Tinción diferencial de Gram

A partir de los microorganismos de trabajo otorgados, se cultivaron en medio LB y se incubaron en posición invertida a 35°C durante 24 horas. Una vez listos se procedió a realizar la técnica de Tinción de Gram para asegurar la pureza de los microorganismos siguiendo el procedimiento descrito por Úbeda y Páramo (2018). A partir de los inóculos preparados, se realizó un frotis en placas (**Figura 8A**) y se fijó la muestra utilizando la llama del mechero (**Figura 8B**). Primeramente, se agregó cristal violeta y se esperó un minuto, al cabo de este tiempo se enjuagó cuidadosamente con agua destilada. Posteriormente se añadió Lugol, se esperó un minuto, y se enjuagó con agua destilada. Seguidamente, se adicionó alcohol cetona, se esperó 20 segundos y se enjuagó con agua destilada nuevamente; en última instancia se agregó safranina y se esperó un minuto para enjuagar con agua destilada. Se dejó secar la muestra para luego realizar la descripción de las bacterias utilizando el microscopio óptico OLYMPUS BH-2 ajustado a 100X de zoom y utilizando una gota de aceite de inmersión (**Figura 8D**).



Figura 8. Tinción diferencial de Gram. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Reactivos de tinción; D) Visualización en el microscopio (100X) (Fuente: Propia).

3.2.4 Técnica de siembra en superficie

Para la técnica de siembra en superficie se tomó como referencia el procedimiento descrito por López, *et al.*, (2006). A partir de la muestras de *Bacillus subtilis* otorgadas por el Laboratorio de Biotecnología del PIENSA, se realizó el recultivo de el microorganismo en medio fresco Agar Miller LB siguiendo la técnica siembra en superficie (**Figura 9**). Para esto se pipeteó 3.5 mL de la muestra del microorganismo asépticamente sobre el medio fresco agarizado, luego se esterilizó el asa de Drigalsky introduciéndola en alcohol, se flameó y enfrió para esparcir la suspensión sobre la superficie del medio.

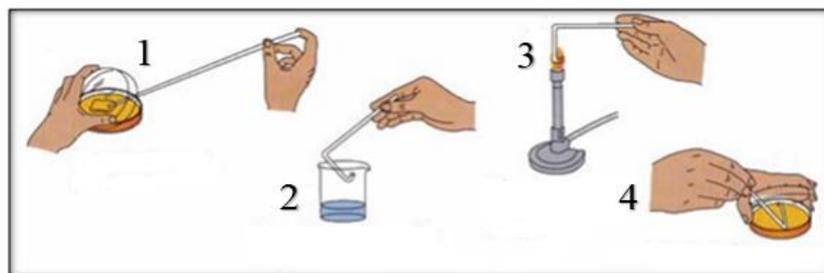


Figura 9. Técnica siembra en superficie (Fuente: López, et al., 2006).

3.2.5 Preparación de condiciones para el desarrollo del inóculo

Para la preparación del inóculo, primeramente se transfirió las bacterias inoculadas en el medio sintético Agar Miller LB al medio no sintético Agar Melaza, para la transferencia de *B. subtilis* se realizó la técnica siembra en superficie ya antes detallada. Seguidamente en un frasco de Erlenmeyer con capacidad de 250 mL que contenía una solución con 50 mL de caldo melaza estéril, se transfirió el microorganismo para su posterior crecimiento dejando en agitación en un shaker de laboratorio marca SCIOLOGEX SK-0330-PRO, a una velocidad de 150 rpm durante 16 horas y una temperatura de 30°C. Ver a continuación (Figura 10).

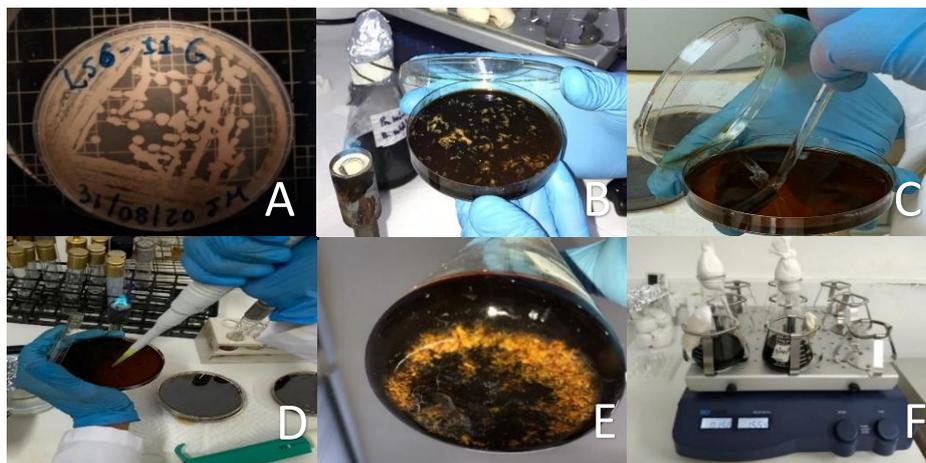


Figura 10. Procedimientos para el desarrollo del inóculo. A) Crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio sintético Agar LB. B) Crecimiento de *Bacillus subtilis* en agar melaza. C) Dispersión de la suspensión sobre la superficie del medio agarizado. D) Extracción de la suspensión con una Micro pipeta. E) Pre inóculo *Bacillus subtilis*. F) Desarrollo del inóculo en Shaker a 150 rpm (Fuente: Propia).

Una vez realizado el desarrollo del microorganismo en caldo melaza se transfirieron 10 mL del inóculo a un matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, conteniendo 90 mL de caldo melaza y colocando en un shaker marca SCIOLOGEX SK-0330-PRO a una velocidad de 150 rpm durante 7 horas con una temperatura de 30°C basándonos en la referencia de Úbeda y Páramo (2018).

A continuación se procedió a realizar las mediciones cinéticas tomando muestras de 1 mL cada 30 minutos para determinar el crecimiento cinético del microorganismo, en este caso para medir la absorbancia se utilizó un Espectrofotómetro UNICO UV-2100 a una longitud de onda de 650 nm. Para realizar las mediciones de la cinética de crecimiento en el espectrofotómetro se realizó una dilución 1:10 en un tubo de ensayo con agua destilada, luego se agitó en un Vortex JANKE & KUNKEL y con una micropipeta se extrajo 3.5 mL de la muestra y se colocó en la celda para medir la absorbancia en el espectrofotómetro (**Figura 11 A y B**). Este procedimiento se llevó a cabo debido a que la oscuridad del caldo melaza al momento de medir la absorbancia registraba los datos fuera de los rangos del equipo.



Figura 11. Determinación cinética de crecimiento microbiano. A) Calibración del Espectrofotómetro. B) Colocación de la celda en el espectrofotómetro (Fuente: Propia).

3.2.7 Técnica de siembra en superficie para el conteo de colonias

microbianas

Úbeda y Páramo (2018), describen el procedimiento que se tomó como referencia. Se prepararon 6 tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, los cuales se marcaron con las diluciones 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5} dependiendo la muestra tomada (**Figura 12**). De cada una de las muestras a las cuales se les midió la absorbancia en el ensayo de curva de crecimiento por determinación turbidimétrica, con ayuda de una micropipeta estéril se tomó un 1 mL y se transfirió al tubo de dilución 1:10, mezclando en un Vortex JANKE & KUNKEL y descartando la punta de pipeta y repitiendo el proceso hasta la solución 1:100000; con una nueva punta de pipeta se depositó 0.1 mL de la dilución 1:10000 en una placa Petri previamente etiquetada con el número de muestra y dilución correspondiente luego se agregó al medio de cultivo agar melaza (siembra en superficie) esparciendo el inóculo

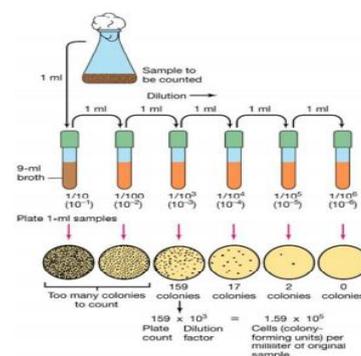


Figura 12. Conteo de bacterias por método de diluciones y recuento en placa (Fuente: Úbeda y Páramo, 2018).

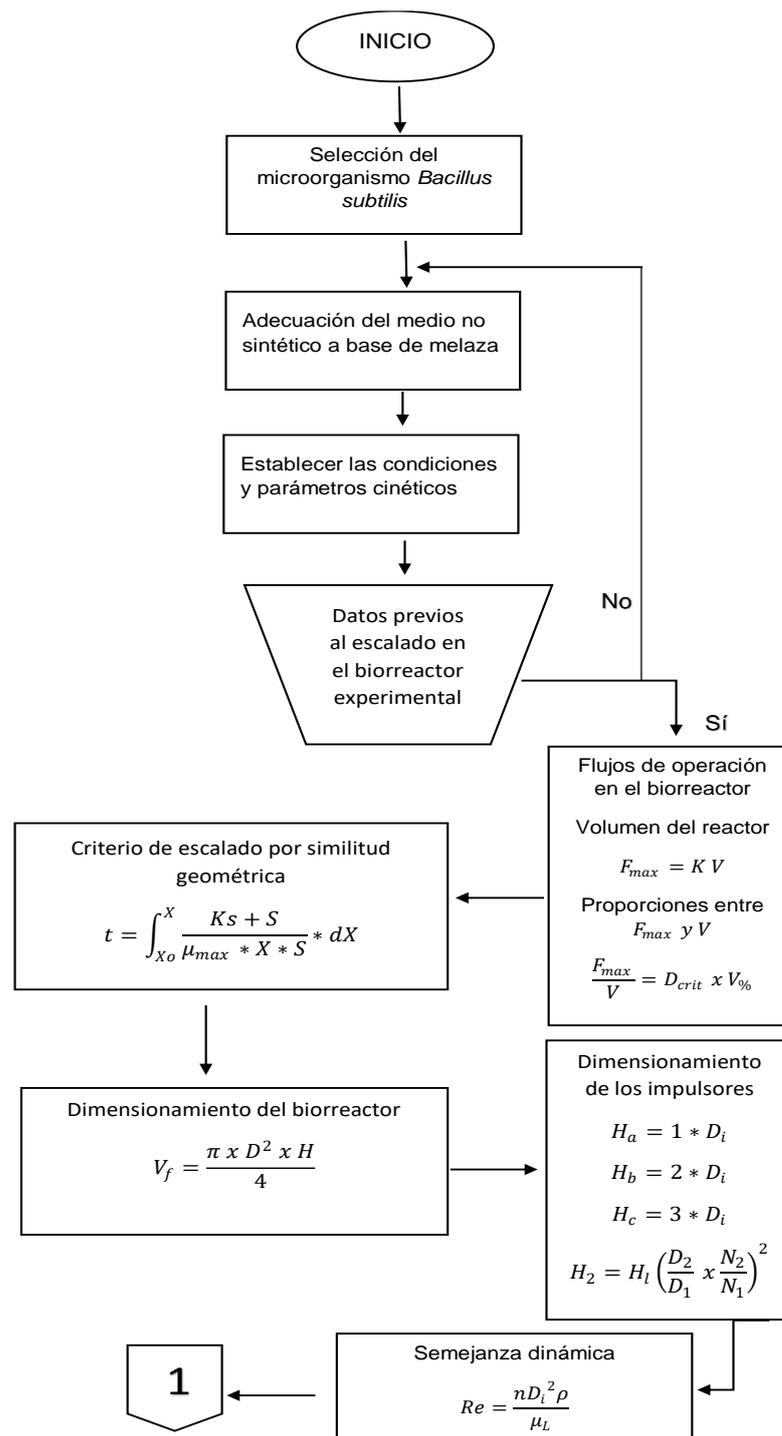
homogéneamente en el medio de cultivo agitando la placa con movimiento oscilatorios (**Figura 13**). Una vez las placas Petri inoculadas y el medio de cultivo solidificado, se dejaron incubando en posición invertida por 12 horas.



Figura 13. Técnica siembra en superficie. A) Dispersión por superficie de la muestra. B) Placas Petri inoculadas. (Fuente: Propia).

3.3 Diseño tecnológico para la producción de un Bioinsecticida

La proyección del diseño tecnológico está basada en las ecuaciones descritas en la sección de fundamentos teóricos, sintetizándolo en este apartado mediante la representación de un algoritmo (**Figura 14**) que engloba las operaciones sucesivas que se deben cumplir para el diseño tecnológico, tomando en cuenta la semejanza geométrica del modelo experimental de la escala banco de laboratorio para el correcto funcionamiento del bioproceso en escala mayores.



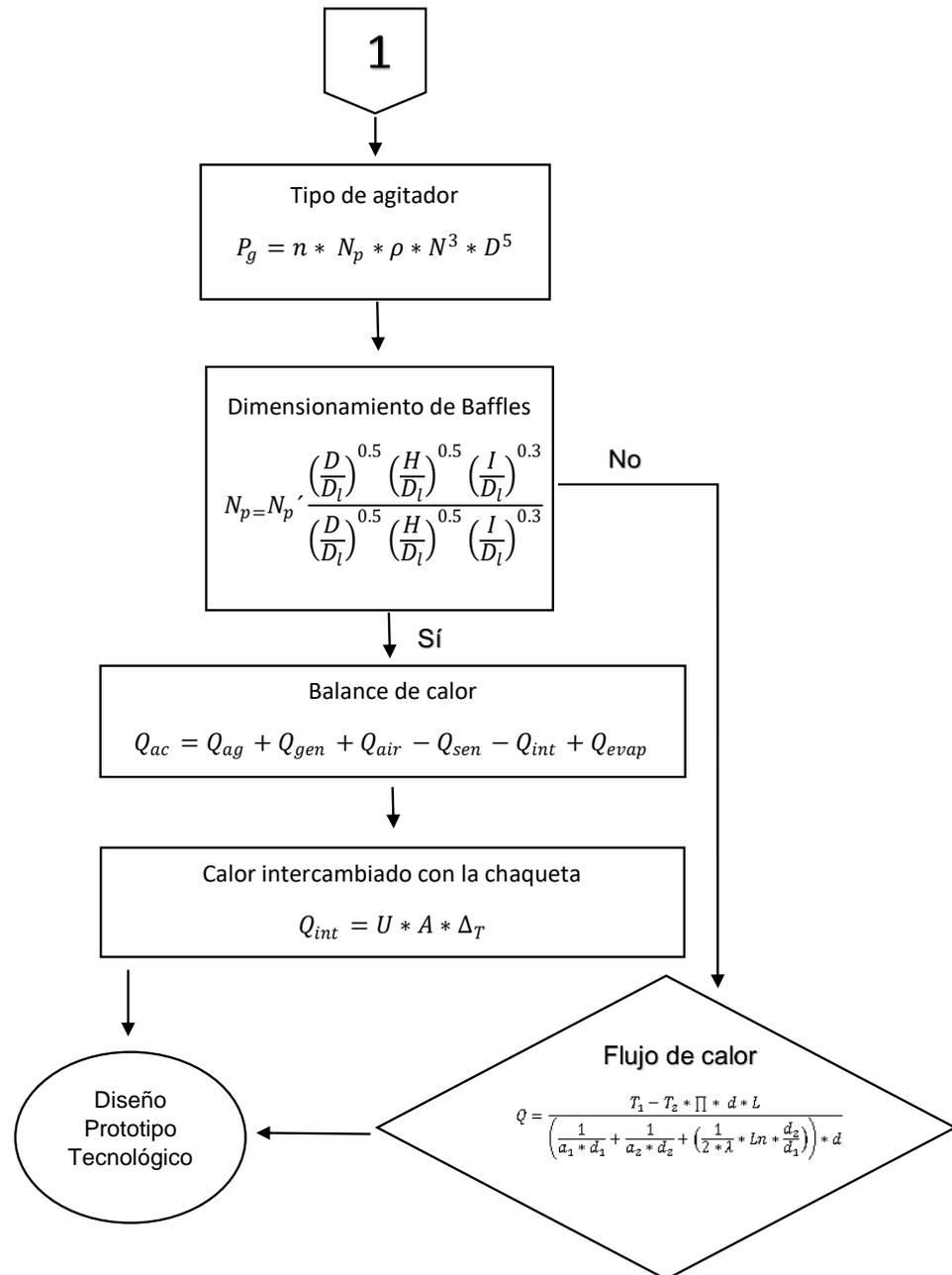


Figura 14. Algoritmo para el diseño tecnológico del escalado) (Fuente: Propia).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSION

Una vez realizados cada uno de los objetivos planteados se logró establecer un medio no sintético a base de melaza para las condiciones de adaptabilidad de *Bacillus subtilis*. Del mismo modo, se evaluaron las condiciones de la cinética de crecimiento del microorganismo mencionado en el medio no sintético y se culminó con la proyección de un diseño tecnológico para la producción de un bioinsecticida utilizando como criterio de escalamiento la semejanza geométrica del modelo experimental (matraz Erlenmeyer) de la escala banco de laboratorio con el fin de establecer un modelo prototipo ajustable a los requerimientos del microorganismo en estudio.

4.1 Definición del medio no sintético a base de melaza

Ivanova (1995) demostró en su estudio de caracterización de melazas nicaragüenses, que las concentraciones de nutrientes como fuentes de carbono, nitrógeno y energía que éstas contienen, son suficientes para promover el desarrollo de los microorganismos, de esta manera en los procesos fermentativos es posible implementar la melaza como sustrato ya que cumple con todos los requisitos necesarios desde el punto de vista nutricional para los microorganismos. Otros estudios como el de Magdi, *et al.*, (2010), Shasaltaneh, *et al.*, (2013) y Miranda, *et al.*, (2020) describen la melaza como un sustrato ideal para el crecimiento de *Bacillus subtilis*.

Para la formulación del medio no sintético se realizaron procedimientos experimentales para la clarificación y decantación. Posteriormente, se siguió con el método volumétrico de Lane y Eynon utilizando melaza de caña clarificada como fuente de azúcar para determinar el porcentaje de azúcares reductores, la titulación de Fehling se realizó por triplicado obteniendo tres valoraciones (**Tabla 2.**). Para las valoraciones se determinó un promedio de 34.7 mL de disolución de azúcar gastados, los datos se ingresaron en la (**Ecuación 2.1**) para obtener el valor de azúcar invertido, presentando un valor equivalente a un **14.9%** de azúcares reductores. Es así como se determinó el porcentaje de azúcares reductores presentes en la melaza.

Tabla 2. Resultados de la determinación de azúcares reductores a la melaza utilizada.

Valoración	Titulación (mL)	Azúcares Reductores (%)
1	35.2	14.8
2	34.1	15.1
3	34.9	14.8

En este estudio se utilizó la melaza para la elaboración del medio no sintético, ya que según Gaitán y García (1998), reportan que el medio de cultivo de caldo de melaza ha demostrado ser altamente competitivo para el crecimiento del microorganismo. Shasaltaneh, *et al.*, (2013), describen en su estudio que el óptimo crecimiento obtenido para la producción de *Bacillus subtilis* fue a una concentración de 6% de azúcares reductores utilizando melaza de caña como sustrato. De igual forma para esta investigación el valor de la concentración de azúcares reductores fue ajustado a un 6% de azúcares reductores para la formulación del medio no sintético y la evaluación del crecimiento del microorganismo, en la (**Figura 16**) se muestra el crecimiento y adaptabilidad del *B. subtilis*, luego de transferirlo del medio sintético al medio no sintético.



Figura 15. Evaluación del crecimiento del microorganismo, A) Crecimiento en melaza al 6% con Agar-agar B) Crecimiento en agar Miller LB (Fuente: Propia).

4.2 Microorganismos utilizados para el desarrollo del proceso cinético

Para el proceso de la cinética de *Bacillus subtilis* de este estudio los microorganismos utilizados fueron suministrados por el Laboratorio de Biotecnología del PIENSA. Flores y Roque (2017), seleccionaron 20 microorganismos para ser identificados molecularmente: 15 bacterias y 5 hongos fitopatógenos identificados según su tipo de espora, los cuales fueron utilizados en las pruebas de antagonismo. Dentro de las 15 bacterias seleccionadas: 12 pertenecían a bacterias aisladas de bioinsumos (9 *Bacillus* Gram positivos entre los que

podría encontrarse *Bacillus subtilis*, 2 *Bacillus* Gram negativos y 1 coco Gram positivo), seleccionados para conocer la diversidad de géneros y especies que conviven en estos bioinsumos; las 3 bacterias restantes fueron suministradas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA), aisladas de ciego de pollo (intestino) e identificadas a través de pruebas bioquímicas dentro del género *Bacillus* y que sirvieron como controles positivos en aquella investigación. En esta selección de bacterias también se tomó en cuenta el potencial inhibitorio mostrado por estas en el screen grueso (pruebas de antagonismo) que se realizó simultáneamente.

Según Flores y Roque (2017), argumentan que el gen ribosomal 16S es frecuentemente empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias; el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma (30S), asociado a esto, el gen ribosomal 16S es una región híper variable que prevé especificidad de especie, lo cual resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas. Entre los 15 aislados de bacterias seleccionados, se lograron identificar dos especies de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G), a continuación, se muestra una sección del árbol filogenético elaborado por Flores y Roque (2017), Ver (Figura 16) y (Tabla 3).

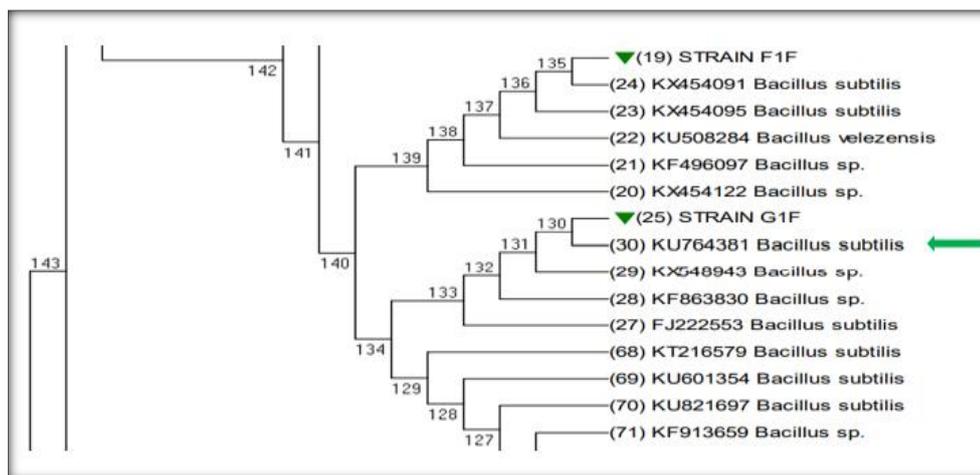


Figura 16. Sección del Árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método NeighborJoining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo (Fuente: Flores & Roque, 2017).

Tabla 3. Identificación de bacterias mediante análisis filogenético utilizando el árbol de la figura 16. En el cuadro se muestra el código de la secuencia, el código del microorganismo, muestra de donde se aisló, puntuación e identidad máxima con el vecino cercano (Fuente: Flores y Roque, 2017).

Código secuencia	Código microorganismo	Muestra	Bacterias			
			Vecino cercano (Número acceso)	Máx punt.	Ident. máx. (%)	Identidad final
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KX454091)	1022	99	<i>Bacillus subtilis</i>
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KU764381)	1057	99	<i>Bacillus subtilis</i>

4.2.1 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio no sintético

El conocimiento de la cinética y producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso. La cinética del crecimiento microbiano describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) de una población microbiana y la concentración de sustrato (S), es una herramienta indispensable en todos los campos de la microbiología (Páramo, 2012).

Sepúlveda y Aguilar (2014) sostienen que la cinética microbiana se encarga de entender todas las manifestaciones y reacciones de la vida microbiana: crecimiento, supervivencia, muerte, adaptaciones y formación de producto. En los procesos fermentativos es muy importante estudiar el comportamiento cinético del microorganismo ya que de él depende el rendimiento del producto de interés. Las células necesitan condiciones favorables que beneficien su proceso de reproducción. Cuando las condiciones son óptimas, las células pasan por diferentes fases que son características de todas las formas de vida microbiana.

El conocimiento de la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis*, permite identificar las fases características del crecimiento de la bacteria. Úbeda y Páramo (2018), evaluaron el crecimiento cinético de *Bacillus subtilis* en medio Miller LB Broth identificando las fases de crecimiento, demostrando tener un crecimiento acelerado en el ensayo de la cinética a nivel de laboratorio. En el presente trabajo desarrollado se evaluó el crecimiento cinético de *Bacillus subtilis* en caldo melaza, siguiendo los procedimientos descritos en la metodología y realizando corridas experimentales por triplicado en días diferentes para determinar los valores de absorbancia en el tiempo con el fin de obtener la cinética promedio de las corridas experimentales. A continuación, en la (**Figura 17**) se muestran las corridas experimentales en Absorbancia vs Tiempo.

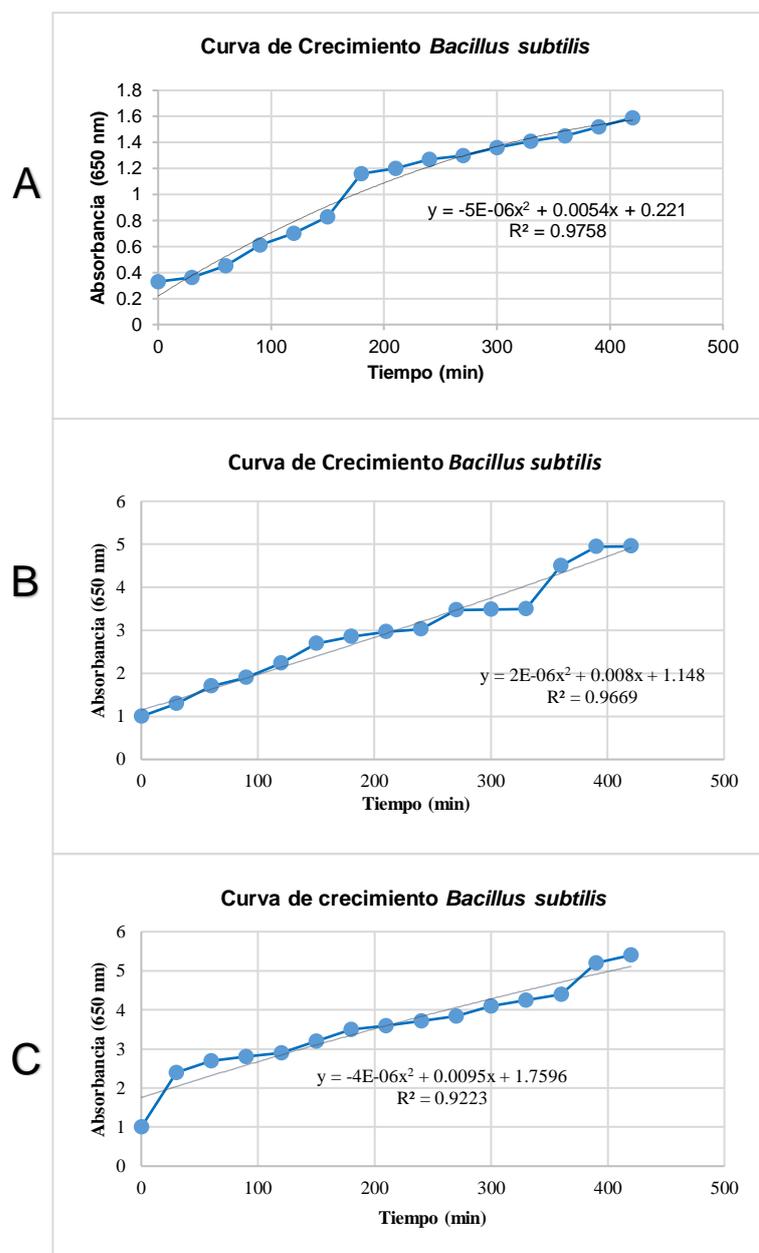
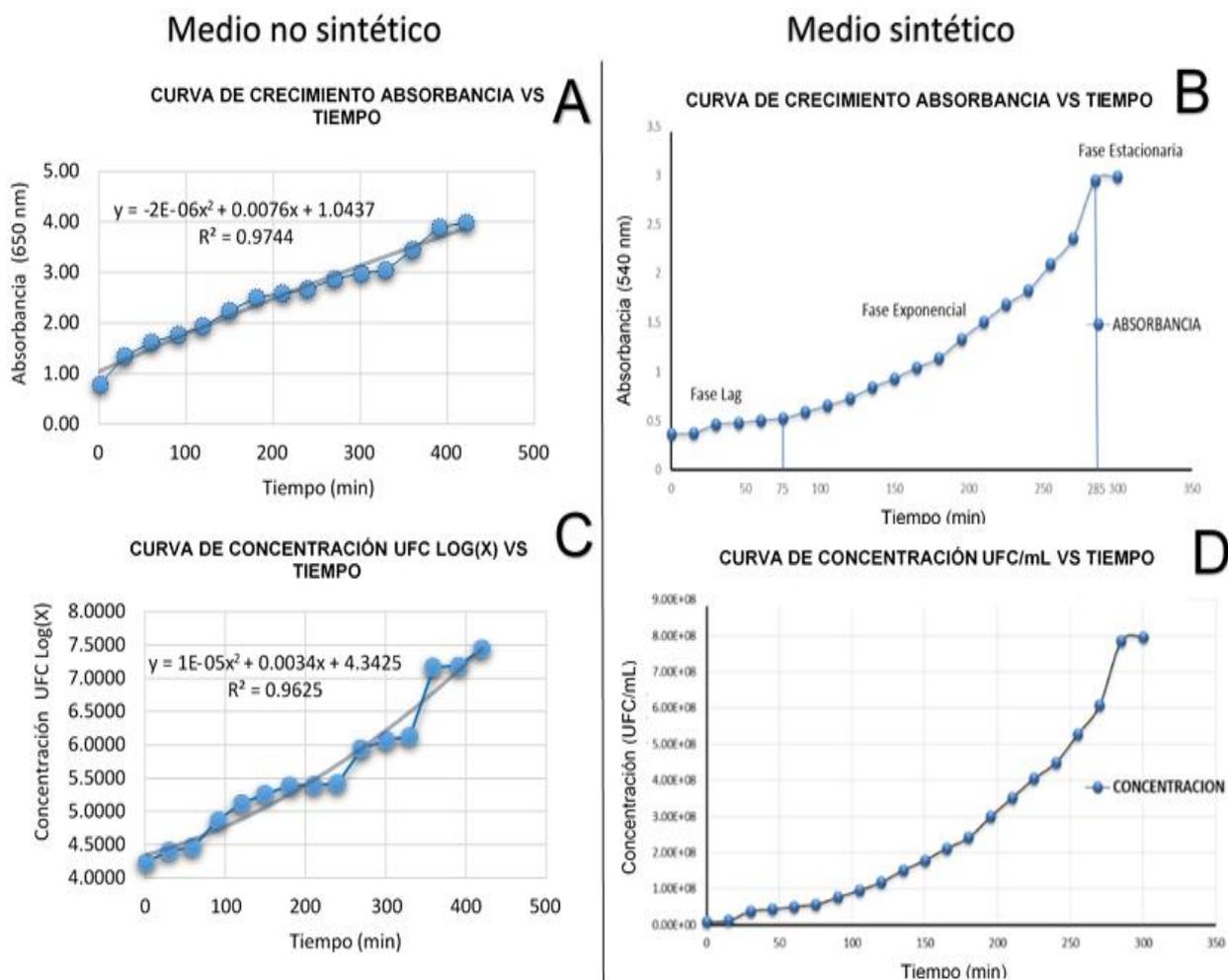


Figura 17. A) Primera corrida experimental (Absorbancia vs Tiempo. B) Segunda corrida experimental (Absorbancia vs Tiempo). C) Tercera corrida experimental (Absorbancia vs Tiempo) (Fuente: Propia).

La (**Figura 17 A**) corresponde a la primera corrida experimental y se puede visualizar en ésta la curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* que relaciona la absorbancia vs el tiempo, partiendo de una fase de adaptación del microorganismo que duró aproximadamente 30 minutos y alcanzó su punto máximo de crecimiento a los 420 minutos, en el tiempo cero se registró un valor de **0.33** (Absorbancia), lográndose observar un crecimiento del microorganismo culminando hasta la última medición al cabo de 420 minutos en **1.59**. La (**Figura 17 B**) corresponde a la segunda corrida experimental y se puede visualizar que la fase de adaptación del microorganismo tuvo una duración aproximada de 60 minutos y un punto

máximo de crecimiento al cabo de 420 minutos. En el tiempo cero se marcó un valor absorbancia de **1** y al cabo de 7 horas registró un valor de **4.95**. La **(Figura 17 C)** pertenece a la tercera corrida experimental, la fase de adaptación duró 60 minutos. Los valores registrados al tiempo cero en cuanto a la absorbancia fueron de **1** y al cabo de 7 horas de medición se determinó un valor para la absorbancia de **5.4**.

A continuación, se compararon los resultados cinéticos teóricos obtenidos en la investigación de Úbeda y Páramo (2018) en medio sintético Agar Miller LB quienes utilizaron el método de medición de turbidez por McFarland y los resultados obtenidos en esta investigación en el medio no sintético a base de melaza por el método siembra directa en superficie, para esto se presenta el valor promedio de cada corrida de la cinética de crecimiento en la **(Figura 18)**.



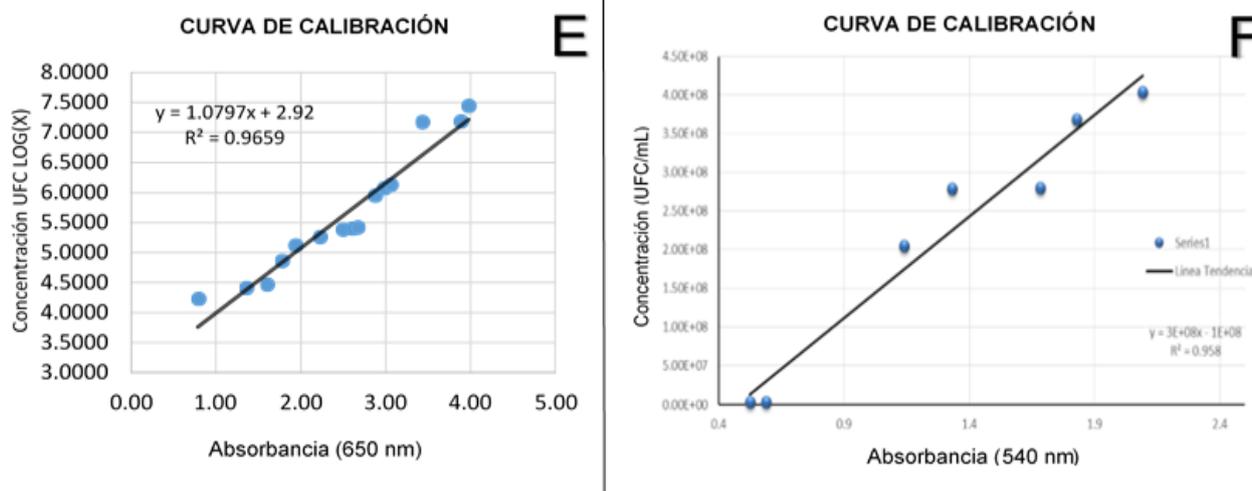


Figura 18. Comparación de los resultados de la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio no sintético a base de melaza (columna izquierda) vs medio sintético Miller LB Broth (columna derecha) (Fuente: Propia).

En la (Figura 18 A) se puede apreciar el comportamiento de la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* respecto a la absorbancia, presentando un valor máximo de **3.98** al cabo de 420 minutos, observando que el microorganismo logró desarrollarse en el medio no sintético. Según Úbeda y Páramo (2018), describen que para el crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio Miller LB Broth se alcanzó en un tiempo máximo de 300 minutos un valor de absorbancia de 3A (Figura 18 B). El crecimiento cinético en términos de UFC/mL para el medio no sintético se obtuvo que la duración de la Fase lag fue de 60 minutos, y que en un tiempo máximo de 420 minutos se alcanzó un número máximo de 2.78×10^7 UFC mL⁻¹ obtenido al final de la fase exponencial a como se muestra en la (Figura 18 C).

Basado en la referencia de Úbeda y Páramo (2018) sostienen que la fase de adaptación duró 85 minutos, y se notifica que en un tiempo máximo de 300 minutos se alcanzó un número máximo de 7.97×10^8 UFC mL⁻¹ obtenido al final de la fase exponencial (Figura 18 D). También cabe comparar con Miranda, *et al.*, (2020), reportan en su estudio que a nivel de matraz utilizando únicamente caldo melaza como sustrato un máximo crecimiento de *Bacillus subtilis* de 1.9×10^7 UFC mL⁻¹ al cabo de 480 minutos de incubación y un recuento de 8.7×10^7 UFC mL⁻¹ después de transcurridas 24 horas, similares a los reportados en este estudio pero en un menor tiempo. Del mismo modo, Magdi, *et al.*, (2010), reportan en su estudio que la mayor producción de biomasa bacteriana de *Bacillus subtilis* se obtuvo después de 24 horas de incubación en un shaker utilizando melaza de caña como sustrato reportando una concentración de células equivalente a 7.06×10^7 UFC mL⁻¹. En la (Figura 18 E) se ilustran la curva de calibración en medio no sintético en la que se obtuvo un coeficiente de correlación del 96%.

A partir los datos obtenidos del crecimiento microbiano y las referencias consultadas, se logró determinar que en el medio no sintético se obtuvo una concentración (UFC/mL) considerable de células de *Bacillus subtilis* y se destaca que los factores que favorecen un mejor crecimiento en el medio no sintético, fueron la adaptación del microorganismo a partir del medio LB a Agar-Agar y melaza previa a la fermentación. Esto debido a que el cambio al medio no sintético y la reproducción constante en el mismo permitió que las condiciones metabólicas del microorganismo contribuyera a una mejor adaptación al medio sólido con melaza con mayor facilidad, presentando un mejor crecimiento al momento de la inoculación nuevamente en agar o caldo melaza. A medida que se fue realizando cada lectura en el espectrofotómetro, la concentración de células fue presentando un aumento, lo que indica que, si se continuara realizando la fermentación en este medio, se pueden obtener valores más altos, es importante detallar que en la investigación de Magdi, *et al.*, (2010) y Miranda, *et al.*, (2020) se registró que en un tiempo mayor de 24 horas se observaba una reducción en el número de células viables a medida que transcurría el tiempo.

4.2.2 Determinación de parámetros cinéticos

Castañeda (2019), describe que la calidad del medio de cultivo del cual los microorganismos extraen los nutrientes para crecer tiene influencia en la velocidad específica a la que crecen, los microorganismos toman los nutrientes disponibles en el medio de cultivo para obtener energía y poder reductor a partir de las reacciones de catabolismo y emplear dichos productos en la generación de un nuevo individuo mediante la síntesis de sus macromoléculas constitutivas por medio de las reacciones de anabolismo. Cuanto más sencillo sea el camino de aprovechamiento de nutrientes, mayor será la energía disponible para las reacciones de anabolismo o, dicho de otro modo, más rápido podrá reproducirse.

A partir de los datos cinéticos obtenidos durante las mediciones de cada tiempo de fermentación se calcularon los parámetros cinéticos del microorganismo en estudio para conocer el comportamiento en el medio no sintético y comparándolo con los datos presentados del estudio de Úbeda y Páramo (2018) para conocer su comportamiento en el medio Miller LB Broth, obteniendo así, la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), tasa específica de crecimiento (μ) (**Ecuación 2.3**), tiempo de duplicación del microorganismo (TD) (**Ecuación 2.4**), constante de saturación (K_s) (**Ecuación 2.5**) y concentración en términos de ($UFC\ mL^{-1}$).

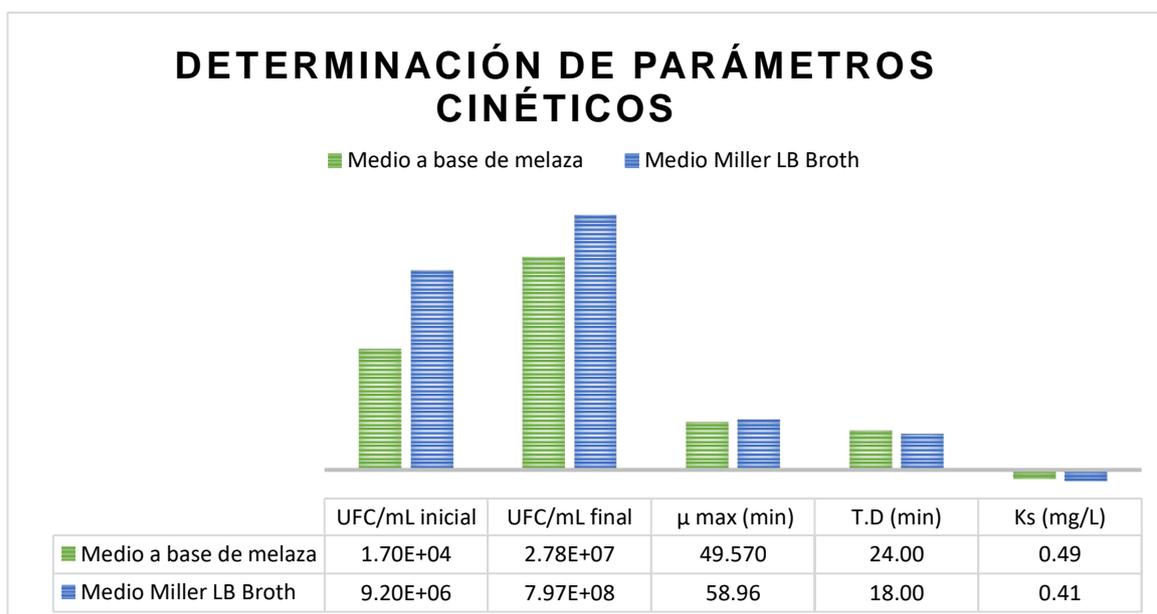


Figura 19. Comparación de los parámetros cinéticos de *Bacillus subtilis* en Medio Miller LB Broth (método de medición de turbidez por McFarland) y el medio no sintético caldo melaza (conteo UFC/mL por siembra en placa) (Fuente: Propia)

Como puede observarse en la (**Figura 19**) se muestran los resultados obtenidos del conteo en placa para el medio no sintético a base de melaza, y se comparan con los resultados obtenidos por Úbeda y Páramo (2018) cuyos resultados del conteo de UFC se reportan por el método de medición de turbidez por McFarland. En relación a esto Ramírez y Parra (2017) argumentan que el método siembra directa en superficie ofrece una mejor precisión ya que permite cuantificar las colonias viables respecto al tiempo, por el contrario, el método de medición de turbidez por McFarland no distingue entre células viables o no viables, lo cual es una desventaja para definir un conteo celular preciso. Okpokwasili (2012) sostiene que (μ_{max}) y (K_s) son coeficientes empíricos de la ecuación de Monod que difieren entre especies y en función de las condiciones ambientales.

A continuación, se determinó que los resultados para *Bacillus subtilis* en medio no sintético a base de melaza presentó una velocidad máxima de crecimiento de $\mu_{max} = 49.57 \text{ min}^{-1}$, esto permitió determinar la velocidad máxima de crecimiento de la fase exponencial de la cinética del microorganismo. En comparación con el estudio de Miranda, *et al.*, (2020) reportando una velocidad máxima de crecimiento de $\mu_{max} = 42.06 \text{ min}^{-1}$ en un medio formulado a base melaza de caña mediante procedimientos metodológicos similares a los de este estudio, por otro lado en el trabajo de Úbeda y Páramo (2018) se determinó que en medio Miller LB Broth se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento $\mu_{max} = 58.96 \text{ min}^{-1}$. La cantidad de bacteria inoculada de *Bacillus subtilis* en el medio no sintético a base de melaza de este estudio fue

de 9.70×10^4 UFC mL⁻¹, por otro lado, en el medio sintético de Úbeda y Páramo (2018) el valor para la cantidad de bacterias inoculadas fue de 9.20×10^6 UFC mL⁻¹.

Del mismo modo, la cantidad de bacteria final obtenida en este estudio fue de un número máximo de 2.78×10^7 UFC mL⁻¹ obtenido al final de la fase exponencial al cabo de 420 minutos, para el estudio de Miranda, *et al.*, (2020) la concentración final se reportó en 1.9×10^7 UFC mL⁻¹ en un tiempo de 480 minutos; Úbeda y Páramo (2018) reportan un número máximo de 7.97×10^8 UFC mL⁻¹ obtenido al final de la fase exponencial al cabo de un tiempo de 300 minutos. El valor para la constante de saturación obtenido por Miranda, *et al.*, (2020) fue de: $K_s = 0.35$ mg/L, en este estudio el valor fue de: $K_s = 0.49$ mg/L, y en el medio Miller LB Broth de Úbeda y Páramo (2018) se obtuvo un valor de: $K_s = 0.41$ mg/L, según Castañeda (2019), sostiene que el microorganismo será más afín a un sustrato cuanto menor sea el (K_s) de ese sustrato en las condiciones de crecimiento. Miranda, *et al.*, (2020) obtuvo un tiempo de duplicación cada 26 minutos, el tiempo de duplicación obtenido para el microorganismo y medio de estudio de la presente investigación fue cada 24 minutos; Úbeda y Páramo (2018) obtuvieron un tiempo de duplicación cada 18 minutos.

Los resultados de los estudios descritos presentan velocidades de crecimiento, tiempos de duplicación y una afinidad por el sustrato similar en cuanto a los parámetros cinéticos. Magdi, *et al.*, (2010), argumenta que la melaza es un sustrato rico en minerales, nutrientes y vitaminas que puede ser utilizada como medio de producción para el desarrollo de *Bacillus subtilis*, generando un producto valioso y económico. Del mismo modo, Yáñez (2012) y Miranda, *et al.*, (2020), describen como ideales el uso de medios de producción a base de melaza para el crecimiento de *Bacillus subtilis*. A partir de los resultados de los factores investigados en el presente estudio se determinó un medio ideal y las condiciones ideales para el cultivo y crecimiento de *Bacillus subtilis*, produciendo una considerable cantidad de biomasa para la formulación de un bioproducto valioso con gran importancia económica para el sector agrícola del país. Cabe considerar que los estudios mencionados en melaza fueron realizados por métodos de conteo directo en placa al momento de realizar los estudios cinéticos, siendo los valores obtenidos por estos métodos mucho más precisos al momento de definir la viabilidad de un microorganismo en el tiempo (Ramírez y Parra, 2017). Todo lo planteado hasta ahora indica que, según el estudio de los parámetros cinéticos, el crecimiento del microorganismo puede ser proyectado a mayores escalas en un modelo de biorreactor ajustable siguiendo como criterio de escalado la semejanza geométrica basado en las condiciones de laboratorio de la presente investigación.

4.3 Proyección del Diseño Tecnológico Prototipo

Alfonso, *et al.*, (2019), realizaron un diseño tecnológico prototipo con modelos ajustables donde se calcularon parámetros de semejanza geométrica desde escala de laboratorio hasta escala piloto. Destacan que en el sistema se debe mantener el principio de semejanza entre el modelo experimental y el prototipo de biorreactor. Los resultados obtenidos del mencionado modelo se tomaron como referencia en este estudio para establecer los parámetros de escalado más apropiados para el diseño del prototipo de biorreactor.

En el (**Anexo 3**), se puede apreciar que el prototipo de biorreactor parte desde la escala de laboratorio tomando como base las condiciones de trabajo aplicadas durante el desarrollo cinético del microorganismo. El dimensionamiento geométrico del modelo de biorreactor se perfila a partir de las condiciones estándar referenciadas por Alfonso, *et al.*, (2019) a como se muestra en la (**Figura 20**).

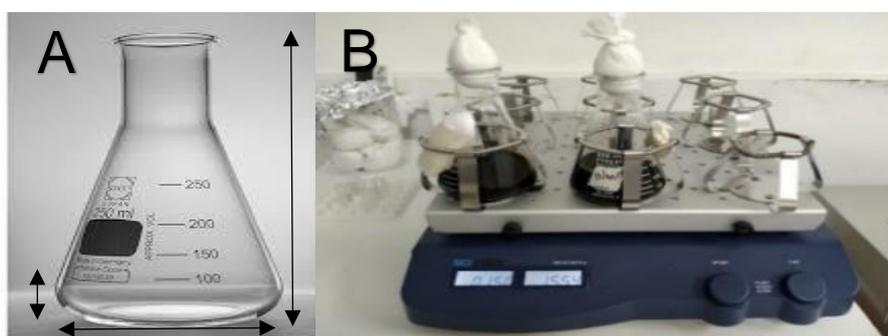


Figura 20. Modelo Experimental de escala laboratorio. A) Dimensiones de referencia del Matraz Erlenmeyer B) Condiciones de trabajo del modelo experimental (Fuente: Propia).

El modelo experimental de la escala banco de laboratorio es un matraz Erlenmeyer en el cual se evaluó la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* en un medio no sintético a base de melaza, este matraz se colocó en agitación durante un tiempo de 420 minutos en un shaker a 150 rpm a una temperatura de 30°C con las siguientes condiciones de operación (**Ver Tabla 4**).

Tabla 4. Datos del equipo de experimento a escala de laboratorio (Erlenmeyer) (Fuente: Propia).

Parámetros	Símbolo	Erlenmeyer
Volumen Total	V_T	250 mL
Volumen efectivo	V_E	100 mL
Diámetro del Mezclador	D_t	78 mm
Velocidad de Agitación	N	150 rpm
Altura Total	H	129 mm
Altura de Llenado	h	51.6 mm
Temperatura del Sistema	Tr	30 °C

Temperatura del Medio	T_m	24+/- °C
Potencia del Agitador	N_p	0.04 X 10 ⁻³ W

Los datos obtenidos de la (**Tabla 3.**) son los necesarios para dar inicio al escalado, donde se determinó un volumen efectivo de 100 mL, basándonos en los criterios de escalado de Dorán (1999). En la (**Tabla 4.**) Se presentan los valores obtenidos a partir de las Ecuaciones (2.12) – (2.23) para el diseño de biorreactores con un volumen efectivo de 1 litro, 10 litros y 100 litros basado en la relación de escala (1:10), para el diseño se contempló un impulsor con impellers del tipo Rushton y cuatro deflectores.

4.3.1 Diseño tecnológico prototipo del escalamiento del bioinsecticida.

El modo de operación propuesto en esta investigación es de un biorreactor continuo, debido las ventajas que presenta este tipo de reactores como la posibilidad de operar de manera continua, se puede mantener un buen control de su temperatura, es de simple construcción y costo relativamente bajo, además de ser fácil de limpiar y controlar (Galarce, 2017). La (**Tabla 4.**) y el diseño propuesto por Galarce (2017) con la incorporación de los criterios de escalados propuestos en metodología, permitió elaborar los diseños tecnológicos prototipo de biorreactor, donde se mantiene la semejanza geométrica entre el modelo y el prototipo de escalamiento establecido. En la (**Tabla 5.**) Se muestran los resultados obtenidos del prototipo del diseño tecnológico para cada volumen efectivo establecido (1 L, 10 L y 100 L), siguiendo los criterios de escalamientos de Dorán (1999) y el algoritmo tecnológico propuesto en la metodología de este trabajo.

Tabla 5. Resultados obtenidos del prototipo del diseño tecnológico para cada volumen establecido (Fuente: Propia).

Parámetros	Símbolo	Biorreactor 1	Biorreactor 2	Biorreactor 3
Volumen Total	V_T	1.5 L	15 L	150 L
Volumen efectivo	V_E	1 L	10 L	100 L
Diámetro del Mezclador	D_t	117 mm	222 mm	444 mm
Velocidad de Agitación	N	150 rpm	149 rpm	148 rpm
Altura Total	H	210 mm	350 mm	917 mm
Altura de Llenado	h	147 mm	245 mm	642 mm
Temperatura del Sistema	Tr	30 °C	30 °C	31 °C
Temperatura del Medio	T_m	30+/- °C	30+/- °C	30+/- °C
Potencia del Agitador	N_p	3.5 X10 ⁻⁴ W	0.970 W	9.699 W

Diámetro del Impulsor	D_i	38.961 mm	73.926 mm	147.85 mm
Ancho de Paleta	A_p	7.79 mm	14.78 mm	29.57 mm
Longitud de Paleta	W_i	9.74 mm	18.48 mm	36.96 mm
Distancia del Impulsor a la Base del Tanque	T_m	38.961 mm	73.926 mm	147.85 mm
Número de Baffles	N_p	4U	4U	4U

El diseño tecnológico toma su base en un diseño geométrico que parte desde la escala banco de laboratorio a partir del matraz Erlenmeyer utilizado en la etapa de estudio, según el criterio de escalamiento calculado, y los resultados obtenidos en el laboratorio se establecieron los parámetros referenciados en la metodología para el escalado a volúmenes mayores, esto se cumplió siguiendo criterios desde la selección del microorganismo, la adecuación del medio no sintético y la definición de los parámetros cinéticos de fermentación considerándose como factores esenciales para el escalado a un volumen mayor. El volumen del reactor a utilizar se basó en el criterio de similitud geométrica para obtener el dimensionamiento del biorreactor y el dimensionamiento de los impulsores para una semejanza dinámica de escalas. El dimensionamiento de los baffles y el tipo de agitador se seleccionó en base a requerimientos de potencia y agitación para el adecuado crecimiento del microorganismo. Coaguila y Condori (2014), argumentan que la transferencia de calor dependen del tipo de flujo que se da en el sistema, considerándose despreciable en biorreactores piloto con volúmenes de escalas menores a 500 L, por lo cual basado en el algoritmo descrito en metodología se presenta una decisión o alternativa para el cumplimiento del diseño prototipo tecnológico.

Fajardo y Solorzano (2002) sostienen que la velocidad de rotación tiende disminuir cuando se pretende mezclar un volumen mayor de líquido. Esto se debe a que el responsable de llevar a cabo el proceso de mezclado es el esfuerzo cortante, el cual es la relación entre la velocidad de deformación producida por el impelente, y la viscosidad imperante en la zona cercana al mismo. Dicho esfuerzo es una función que depende más del diámetro del impelente que de su velocidad por lo que no es necesario incrementar la velocidad de rotación cuando se cuenta con un impelente de diámetro mayor, por esta razón a como se presenta en la (Tabla 4.) la velocidad de rotación de los modelos propuestos, tiende a disminuir a medida que aumenta la escala. También se suele presentar durante el escalado un incremento del flujo volumétrico de aire al aumentar la escala debido a que un mayor volumen de medio tiende a requerir más cantidad de oxígeno para el buen funcionamiento del proceso fermentativo como es el caso de *Bacillus subtilis*.

Guerra e Izurieta (2009), detallaron que para el diseño del sistema de agitación se deben aplicar las relaciones de similitud geométrica estándar para el escalado. Por lo que se puede determinar que los resultados obtenidos en el modelo experimental permitieron realizar los

modelos prototipos, los cuales se desarrollaron mediante el diseño del algoritmo tecnológico y por ende se puede confirmar que los datos obtenidos se pueden ajustar a valores reales, el trabajo de Durango (2007), indica que la técnica de escalamiento utilizado desde escala de laboratorio hasta biorreactor es útil para dar una orientación acerca de las condiciones que deben utilizarse en la escala que se desea trabajar, por lo cual los resultados a nivel de laboratorio permitieron que el modelo propuesto se pueda llevar a volúmenes efectivos de 1L, 10L y 100 L, siguiendo el algoritmo propuesto en la metodología de esta investigación.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados alcanzados, permiten plantear las siguientes conclusiones considerando los objetivos que se propusieron al inicio del mismo:

- ✓ Es posible implementar la melaza como sustrato y un medio de bajo costo.
- ✓ Los resultados de la cinética del crecimiento microbiano de la bacteria *Bacillus subtilis* indicaron que con el medio no sintético, es posible continuar incrementando el número final de células si se permiten tiempos mayores de fermentación.
- ✓ Se puede concluir en que el medio no sintético arroja concentraciones celulares más altas en la misma unidad de tiempo.
- ✓ Los resultados cinéticos antes mencionados demuestran la factibilidad de utilizar la melaza como medio no sintético para la multiplicación masiva del *Bacillus subtilis*.
- ✓ Se estableció un algoritmo para el diseño tecnológico de los reactores prototipo de 1, 10 y 100 litros, cuyos diseños deberán unirse al diseño mecánico para su debida construcción final.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

Al presentar los resultados de esta investigación, se abren nuevas puertas y nuevas interrogantes continúan por resolver, por ello se sugieren considerar las siguientes recomendaciones:

- Llevar a cabo la cinética de crecimiento en caldo de melaza con un mayor tiempo de fermentación en Shaker, para el desarrollo del inóculo y brindar más tiempo en horas al desarrollo de la cinética. Esto para evaluar el crecimiento del microorganismo y ver si existen una mayor tasa de producción en crecimiento celular.
- Incrementar la capacidad de producción del bioinsecticida donde se utilicen volúmenes mayores a los establecidos en este estudio y además utilizar los modelos propuestos en esta investigación para el ajuste de nuevos parámetros tecnológicos que permitan el escalado del proceso a niveles superiores.
- En investigaciones posteriores llevar a cabo la evaluación económica preliminar y el estimado de viabilidad del bioproceso de esta investigación.
- Incluir en estudios posteriores la realización de experimentos para determinar la eficacia del bioinsecticida en algún tipo de cultivo.

CAPITULO 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, Y., Pérez, A., & Lavín, M. (2019). Design of Biorreactor for the Production of Inoculum of *Salmonella enteritidis*. *Revista Cubana de Química*, 31(1),120-136.
- Apella, M. C., & Araujo, P. Z. (2005). Microbiología del Agua. Conceptos Básicos. *Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*, 33-50.
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2016). Cálculo de los Parámetros que Definen el Crecimiento Bacteriano. *Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco* , 1-16.
- Araujo, F. (2008). Seed Inoculation with *Bacillus subtilis*, Formulated with Oyster Meal and Growth of Corn, Soybean and Cotton. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(2), 456. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200017>.
- Arthur, S., & Dara, S. (2018). Microbial Biopesticides for Invertebrate Pests and their Markets in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 165, 13–21.
- Baily, J., & Ollis, D. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd ed. *Tata MaGraw-Hill, New Delhi, India*.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of Plant Growth-promoting Bacteria for Use in Agriculture. *.Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.
- Burges, H. (1998). Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. *Formulation of Microbial Biopesticides* (1sted.,131-185). Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6>.
- Cantu, E. (2019). El Espectrofotómetro. *Franja Industrias*, <https://n9.cl/fscet>.
- Castro, M. (1993). *Estudio de la Melaza de Caña como Sustrato de la Fermentación Acetobutílica* (Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia), 3-35.
- CIRA. (2020). *Estudio de Línea Base de Residuos de Plaguicidas en Vegetales de Alto Consumo Provenientes de Zonas Agrícolas de Nicaragua y Comercializados en Managua*. Managua, Nicaragua. <https://bit.ly/36i6B1b>.
- Coaguila, J., & Condori, E. (2014). *Diseño, Cálculo y Construcción de la Chaqueta de un Tanque Agitado del Laboratorio de Diseño de Reactores de la Escuela Profesional de Ingeniería Química* (Tesis de grado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa).

- Delgadillo, R., Rodríguez, S., Portugal, V., Juárez, R., & Hernández, J. (Mayo de 2018). Efecto del pH y Temperatura sobre el Crecimiento y Actividad Antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Mexican Journal of Phytopathology*, 36(2), 256-271.
- Dorán, P. (1999). Fluid Flow and Mixing, Bioprocess Engineering Principles. *Academia Press Limited*, 70-139.
- Durango, L. (2007). *Evaluación y Escalamiento de la Producción de Levaduras Nativas tipo Saccharomyces spp, a Nivel de Laboratorio* (Tesis de grado, Universidad colombiana EAFIT), 55-134.
- Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. (01 de Septiembre de 2014). *Bioingeniería: Biorreactores y su Aplicación*. <https://cutt.ly/qnpkDtL>.
- Fajardo, R., & Solorzano, J. (2002). *Escalado a Planta Piloto del Proceso de Producción de Levadura Forrajera (C. utilis)* (Tesis de Grado, Universidad Nacional de Ingeniería).
- FAO. (2012). *Los plaguicidas, en Cuanto Contaminantes del Agua*. <https://cutt.ly/vnpgJpD>
- Fernandez, C. (2002). Biopesticidas: ¿ La agricultura del futuro? *FuturEco*, 141,14-19.
- Flores, M., & Roque, E. (2017). *Aislamiento y Caracterización Microbiana (microbiológica y molecular) en la Búsqueda de Bacillus subtilis a Partir de Bioinsumos Comerciales y Pruebas de Antagonismo Frente a Hongos Fitopatógenos* (Tesis de grado, Universidad Nacional de Ingeniería).
- Gaitán, A.; García, E. (Junio de 1998). *Prueba a Nivel de Campo y Escalado a Planta Piloto del Proceso de Producción de Biofertilizante* (Tesis de grado, Universidad Nacional de Ingeniería).
- Galarce, D. (2017). *Concepción, Diseño, Implementación y Operación de un Biorreactor Continuo para Caracterización de Parámetros Dinámicos de Sistemas Elicitor-promotor Efecto en Biología Sintética* (Tesis de Grado, Universidad de Chile).
- Gonzalez, R. (Junio de 2018). *Principios Básicos de Escalado*. *ResearchGate*: <https://cutt.ly/8npgVzi>.
- Guerra, G., & Izurieta, B. (2009). Escalado de la Producción Industrial de Levadura de Panificación. *Revista Politecnica*, 30(1), 1-9.
- Guillén Rodríguez, L. S., & Martínez Laguna, G. I. (2019). *Desarrollo del Proceso de Producción a Escala de Laboratorio, para el Crecimiento de un Consorcio Microbiano*

- con Propiedades Biofertilizantes Aislados de Bioinsumos Artesanales*. (Tesis de Grado, Universidad Nacional de Ingeniería).
- Hernández, D., & Loaiza, A. (2014). *Selección de un Método para la Conservación y Preservación de Actinomicetos Aislados del Suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira* (Tesis de grado, Universidad Tecnológica de Pereira).
- Herrera, A. (2011). *Estudio Comparativo de Métodos para la Determinación de Sacarosa y Azúcares Reductores en Miel Virgen de Caña Utilizados en el Ingenio Pichichí S.A.*(Tesis de Grado, Universidad Tecnológica de Pereira).
- Hubbard, W. (1987). Scale-up Strategies for Bioreactors. *The New York Academy of Sciences*, 506(1),168-182. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb23854.x>
- IICA, & MAG. (1992). Componente de Fortalecimiento de la Dirección General de Protección y Sanidad Agropecuaria. Sub-componente de Sanidad Vegetal, *IICA*, 34(4).
- Ivanova, S. (1995). *Caracterización de la Melaza Nicaraguense* (Tesis de Grado, Universidad Nacional de Ingeniería).
- Kokalis, N., Kloepper, J., & Reddy, M. (2006). Plant Growth-promoting *Rhizobacteria* as Transplant Amendments and Their Effects on Indegenous Rhizosphere Microorganism, *Applied Soil Ecology*, 31(1-2), 91-100.
- López, T., Leonor., & Torres, C. (2006). *Estudio Cuantitativo de Bacterias. Trabajo Práctico No. 5*. (Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de agroindustrias).
- Magdi, A., Francis, F., Moustafa, A., & Mohamed, S. (2010). Optimization of Cultivation Medium and Growth Conditions for *Bacillus subtilis* KO strain Isolated from sugar Cane Molasses. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 7(1), 31-37.
- Maheshwari, D. (2010). Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Springer Science*, 18.
- Miranda, S., Reyes, L., & Schmidt, A. (2020). Evaluación de Residuos Agroindustriales Producidos en Costa Rica para la Formulación de un Medio de Cultivo de Bajo Costo utilizando *Bacillus subtilis* 168. *Tecnología en Marcha*, 33(4), 15-23.
- Muñoz, E. (2016). *Escalamiento del Proceso de Obtención de Fructooligosacáridos a Partir de Jugo de Caña Mediante Síntesis Enzimática con Células Permeabilizadas de Candida Apícola* (Tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco).
- Najafpour, G. (2015). Growth Kinetics. *Biochemical Engineering and Biotechnology* (2nd ed, 129-179), Elsevier.

- Noriega, L. (2014). *Procesos Químicos Industriales*, Editorial Barcelona, 6, 12-21.
- Ñacato, C., & Valencia, M. (2016). *Aislamiento, Identificación y Pruebas in Vitro de Cepas Autóctonas de Bacillus subtilis como Agente de Biocontrol de Alternaria spp.* (Tesis de Grado, Universidad Salesiana de Ecuador).
- Obiageli, E., & Laing, M. (2007) Rhizotron Studies on *Zea mays* L. to Evaluate Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24, 269-274.
- ONU. (2017). Report of the Special Rapporteur on the right to food. Un Human Rights Council. <https://bit.ly/3wi6aPb>
- Parajón, C. (2001). *Producción de Levadura Forrajera (Cándida utilis) a Escala de Laboratorio Mediante la Utilización de Melaza Como Medio de Cultivo* (Tesis de Grado, Universidad Nacional de Ingeniería).
- Páramo, L. (Mayo de 2012). *Caracterización de Comunidades Microbianas con Potencial Biotecnológico para la Prevención del Deterioro Estructural* (Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica).
- Pearson, D. (1976). *Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos*, Editorial Acribia S.A, 7. DOI: 10.1002/0470011149
- Quintero, R. (1990). *Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones*. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Alambra, S.A.
- Quintero, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones*, 332. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Alambra, S.A.
- Ramírez, J., & Parra, J. (2017). Análisis de Técnicas de Recuento de Microorganismos. *Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira*. <https://n9.cl/e7dmw>
- Ramos, M., & Pérez, M. (2004). Métodos de Cuantificación de Microorganismos. *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. (1st ed, 68-72). Universidad Autónoma Metropolitana.
- Sandoval, E. (2019). *Obtención de Parámetros Cinéticos para el Crecimiento del Microorganismo Saccharomyces cerevisiae en Reactor CSTR* (Tesis de Grado, Universidad Central del Ecuador).
- Sanz, S. (2011). Obtención y Mantenimiento de Cultivos Puros. *Prácticas de Microbiología* (2nd ed). Universidad de La Rioja. <https://n9.cl/9cwdi>

- Scragg, A. (1999). Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos. *Biología para Ingenieros* (1st ed, 5-36). Limusa.
- Sepúlveda, L., & Aguilar, C. (2014). Cinética Microbiana del cultivo de Microorganismos Biofertilizantes. *Biofertilizantes Microbianos* (1st ed, 343-363). Plaza y Valdez.
- Shasaltaneh, M., Moosavi, Z., & Fooladi, J. (2013). Cane Molasses as a Source of Precursors in the Bioproduction of Tryptophan by *Bacillus subtilis*. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(3), 285-292.
- Stanbury, P., Whitaker, A., & Hall, S. (1995). Media for Industrial Fermentations. *Principles of Fermentation Technology* (1st ed, 93-121). Oxford, UK. Pergamon Press.
- Swan, H., & Karalazos, A. (1990). Las Melazas y sus Derivados. *Revista Tecnología*, 19, 78-82.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). Control del Crecimiento Microbiano. *Introducción a la Microbiología* (9th ed, 176-346). Editorial Medica Panamericana.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., & Johnson, T. R. (2010). Aplicaciones de la Microbiología. *Introducción a la Microbiología* (10th ed, 164-170). Pearson.
- Úbeda, J., & Páramo, L. (2018). *Desarrollo a Nivel de Laboratorio de un Bioplaguicida a base de Bacillus subtilis, para el Control de Hongos Fitopatógenos en Cultivos de Interés Agrícola* (Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Ingeniería).
- Vázquez, L., & Castellanos, J. (1997). Desarrollo del Control Biológico de Plagas en la Agricultura Cubana. *AgroEnfoque*, 91, 14-15.
- Yáñez, V. (Enero de 2012). *Potencial de la Cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como Agente de Biocontrol de Enfermedades de Postcosecha de Fruta* (Tesis Doctoral, Universidad de Lleida).
- Younis, M., Hezayen, F., Nour-Eldein, M., & Shaleb, M. (2010). Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 7, 31-37.

CAPÍTULO 7. ANEXOS

Sección 1

Tabla 6. Factores del método de Lane & Eynon usando 10 mL de disolución de Fehling (Gaitán y García, 1998).

Título (mL)	Azúcar Inv. No sacarosa	Azúcar Inv. + 1g de sacarosa por 100 mL	Azúcar Inv. + 5g de sacarosa por 100 mL	Azúcar Inv. + 10g de sacarosa por 100 mL	Dextrosa	Levulosa
15	50.50	49.90	47.60	46.10	49.10	52.20
16	50.60	50.00	47.60	46.10	49.20	52.30
17	50.70	50.10	47.60	46.10	49.30	52.30
18	50.80	50.10	47.60	46.10	49.30	52.40
19	50.80	50.20	47.60	46.10	49.40	52.50
20	50.90	50.20	47.60	46.10	49.50	52.50
21	51.00	50.20	47.60	46.10	49.50	52.60
22	51.00	50.30	47.60	46.10	49.60	52.70
23	51.10	50.30	47.60	46.10	49.70	52.70
24	51.20	50.30	47.60	46.10	49.80	52.80
25	51.20	50.40	47.60	46.00	49.80	52.80
26	51.30	50.40	47.60	46.00	49.90	52.90
27	51.40	50.40	47.60	46.00	49.90	52.90
28	51.40	50.50	47.70	46.00	50.00	53.00
29	51.50	50.50	47.70	46.00	50.00	53.10

Desarrollo a Escala (Banco de Laboratorio) de un Bioinsecticida a Base de *Bacillus subtilis* (LS6-11G)

30	51.50	50.50	47.70	46.00	50.10	53.20
31	51.60	50.60	47.70	45.90	50.20	53.20
32	51.60	50.60	47.70	45.90	50.20	53.30
33	51.70	50.60	47.70	45.90	50.30	53.30
34	51.70	50.60	47.70	45.80	50.30	53.40
35	51.80	50.70	47.70	45.80	50.40	53.40
36	51.80	50.70	47.70	45.80	50.40	53.50
37	51.90	50.70	47.70	45.70	50.50	53.50
38	51.90	50.70	47.70	45.70	50.50	53.60
39	52.00	50.80	47.70	45.70	50.60	53.60
40	52.00	50.80	47.70	45.60	50.60	53.60
41	52.10	50.80	47.70	45.60	50.70	53.70
42	52.10	50.80	47.70	45.60	50.70	53.70
43	52.20	50.80	47.70	45.50	50.80	53.80
44	52.20	50.90	47.70	45.50	50.80	53.80
45	52.30	50.90	47.70	45.40	50.90	53.90
46	52.30	50.90	47.70	45.40	50.90	53.90
47	52.40	50.90	47.70	45.30	51.00	53.90
48	52.40	50.90	47.70	45.30	51.00	54.00
49	52.50	51.00	47.70	45.20	51.00	54.00
50	52.50	51.00	47.70	45.20	51.10	54.00

Sección 2

En la siguiente tabla se detallan los resultados obtenidos para la Absorbancia respecto al tiempo en cada corrida experimental para *Bacillus subtilis* y los valores promedios de absorbancia de la cinética general. A continuación, se presentan los resultados de cada corrida experimental.

Cabe destacar que para los valores de absorbancia que registraban rangos superiores a los detectados por el equipo se diluía la muestra en una proporción 1:10 para realizar las mediciones correspondientes.

Tabla 7. Resultados de absorbancia para cada cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* LS6-11G (Fuente: Propia).

Tiempo (minutos)	Absorbancias a 650 nm			Absorbancia promedio
	1	2	3	
0	0.33	1	1	0.78
30	0.36	1.3	2.4	1.35
60	0.45	1.7	2.7	1.62
90	0.61	1.9	2.8	1.77
120	0.7	2.23	2.9	1.94
150	0.83	2.69	3.2	2.24
180	1.16	2.85	3.5	2.50
210	1.2	2.96	3.6	2.59
240	1.27	3.02	3.71	2.67
270	1.3	3.47	3.84	2.87
300	1.36	3.48	4.1	2.98
330	1.41	3.5	4.25	3.05
360	1.45	4.5	4.4	3.45
390	1.52	4.94	5.2	3.89
420	1.59	4.95	5.4	3.98

Tabla 8. Resultados de Absorbancia vs Concentración del bioinsecticida en UFC/mL (Fuente: Propia).

Tiempo (minutos)	Absorbancia media 650 nm	UFC/mL
0	0.78	1.70E+04
30	1.35	2.56E+04
60	1.62	2.92E+04
90	1.77	7.25E+04
120	1.94	1.32E+05
150	2.24	1.82E+05
180	2.50	2.42E+05
210	2.59	2.50E+05
240	2.67	2.62E+05
270	2.87	8.80E+05
300	2.98	1.17E+06
330	3.05	1.34E+06
360	3.45	1.48E+07
390	3.89	1.53E+07
420	3.98	2.78E+07

Tabla 9. Resultados Parámetros cinéticos *Bacillus subtilis* (Fuente: Propia).

tiempo (horas)	UFC/mL	Log (X)	μ (h ⁻¹)	ABS 650 nm
0	1.70E+04	4.2304		0.78
0.5	2.56E+04	4.4082	0.2328	1.35
1	2.92E+04	4.4654	0.2472	1.62
1.5	7.25E+04	4.8603	0.2600	1.77
2	1.32E+05	5.1206	0.2895	1.94
2.5	1.82E+05	5.2601	0.3071	2.24
3	2.42E+05	5.3838	0.3760	2.50
3.5	2.50E+05	5.3971	0.3883	2.59
4	2.62E+05	5.4183	0.4220	2.67
4.5	8.80E+05	5.9445	0.5421	2.87
5	1.17E+06	6.0682	0.6300	2.98
5.5	1.34E+06	6.1271	0.7359	3.05
6	1.48E+07	7.1703	0.7628	3.45
6.5	1.53E+07	7.1847	0.8032	3.89
7	2.78E+07	7.4433	0.8263	3.98

Sección 3

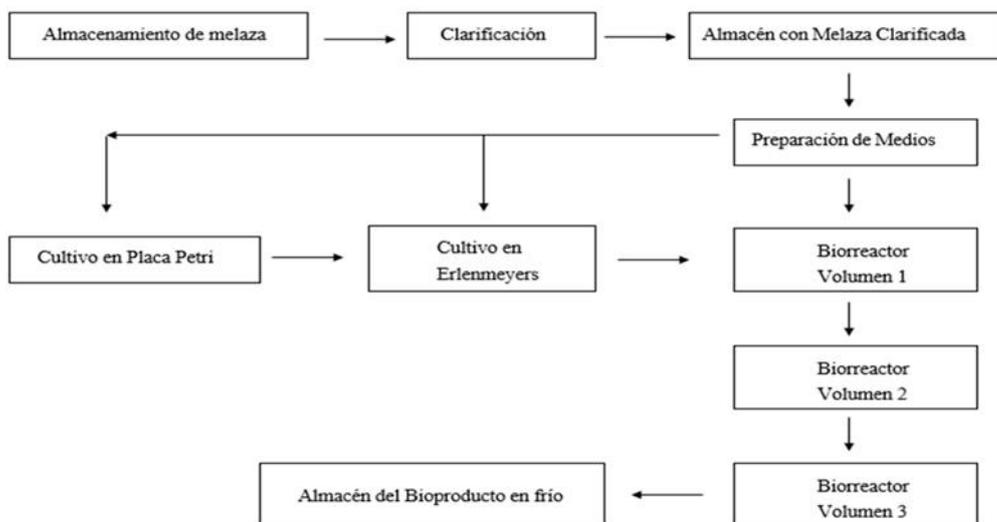


Figura 21. Diagrama de bloques del proceso de producción de *Bacillus subtilis* (Fuente: Propia).