

Tabla n°4: Medios de cultivos para bioensayos preliminares.

Medios de cultivos para bioensayos preliminares				
Medios	Agua Residual	Cascarilla de arroz	Zumo de maíz	Lacto suero
	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Extracto de Levadura	5.8 g/L	5.8 g/L	5.8 g/L	5.8 g/L
KCl	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L
MgSO4 7H2O	0.2 mg/L	0.2 mg/L	0.2 mg/L	0.2 mg/L
MnSO4	40 mg/L	40 mg/L	40 mg/L	40 mg/L
CaCO3	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
CuSO4 5H2O	7.5 mg/L	7.5 mg/L	7.5 mg/L	7.5 mg/L
ZnSO4 7H2O	7.5 g/L	7.5 g/L	7.5 g/L	7.5 g/L
FeSO4	1.35 mg/L	1.35 mg/L	1.35 mg/L	1.35 mg/L

Tomado de: (Khedher *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014; Khedher *et al.*, 2014; Vázquez *et al.*, 2015; Untol *et al.*, 2015; Salazar *et al.* (2015); Pineda y Vélez 2018) .

Parámetros de producción en cultivos

Asimismo, se realizaron observaciones microscópicas y ópticas diarias con el propósito de verificar esporulación y formación de cristales y lisis celular. Como lo propuso (Beltrán *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2014; Pineda López & Vélez Salas, 2018)

Recuento de esporas

Durante las 120 horas que los medios de cultivo estén en incubación a temperatura controlada entre 28 y 30°C en constante agitación orbital a 250 rpm, y un pH ajustó a los 7,2. Se tomaron alícuotas cada 24 horas, a la que se le determino recuento de esporas en cámara de Neubauer por el método de Breed, utilizando la siguiente fórmula (Navarro *et al.*, 2014; Valtierra *et al.*, 2017; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2019)

$$C = N^{\circ} \text{ esporas-celulas} \times 10^4 \times \text{dil}$$

Donde:

C = Cél/mL

N= Numero de células presentes en 1 mm² (0.1 µL)

Dil= Factor de dilución

Determinación de la biomasa

Pasada las 120 horas de producción, se tomaron 100 ml de cada biorreactor y se centrifugaron a 2000 RPM por 10 minutos, se lavó 2 veces el sedimento. Posteriormente el sedimento se llevó a deshidratación en horno a 105 °C durante un tiempo de 24 horas, obteniéndose biomasa seca en gramos por litro (Avignone 1990; BLAS *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2014).

Producción de cepa y medio de cultivo seleccionado a escala piloto

Luego de conocer el medio de cultivo con mejor rendimiento en la producción de biomasa y esporas. Este se fermento a escala de 1 Litro durante 144 horas en constante agitación, con parámetros como: pH de 7,2, Temperatura a 30 °C, oxígeno, entre otros que genera las condiciones necesarias para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, en un biorreactor proporcionado por el Centro de Investigación para el Desarrollo de la Ingeniería de la universidad popular del cesar (Logan & Vos, 2015; Valtierra *et al.*, 2017; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2019).

Recuento de esporas

Durante las 144 horas que el medio de cultivo estuvo en el biorreactor. Se tomaron alícuota cada 24 horas, a la que se le determinaron recuento de esporas en cámara de Neubauer (Logan & Vos, 2015; Valtierra *et al.*, 2017; Pineda López & Vélez Salas, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2019).

Determinación de la biomasa

Pasada las 144 horas de producción, se tomaron 100 ml del biorreactor y se centrifugaron a 2000 RPM por 10 minutos, se lavó 2 veces el sedimento con agua destilada estéril. Posteriormente el sedimento se deshidrato en un horno a 105°C durante un tiempo de 24 horas, obteniéndose biomasa seca en gramos por litro (Avignone 1990; BLAS *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2014).