

#### 4.2.4.- DISCUSION DE LA INFLUENCIA DE LAS DIMENSIONES Y LA VELOCIDAD DE LOS IMPULSORES SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO

En esta sección se exponen algunos conceptos sobre la transferencia de oxígeno del medio de cultivo a las células para que, posteriormente, dichos conceptos sirvan de base para hacer un análisis sobre transferencia de masa de los nutrientes al interior de las células, también.

Para lo anterior, uno de los enfoques es interpretar los resultados en términos de flujo, así como del esfuerzo de corte que ofrecen los impulsores. Ambos conceptos, pueden ser estimados en términos de velocidad de agitación, diámetro de los impulsores y la altura de sus paletas.

Las Figuras 8 y 9, muestran datos cinéticos sobre consumo específico de oxígeno, fueron analizadas en función de una respuesta a concentraciones de oxígeno disuelto, observándose una respuesta que demuestra una influencia del parámetro de los impulsores. Estas observaciones indican una resistencia significativa a fenómenos de transferencia de masa, sin que el oxígeno sea el nutriente más importante, que por otro lado, todo parece indicar que el fenómeno tiene una base sólida con respecto al transporte de nutrientes al interior de la célula. Se observa también, que la aeración y la agitación son capaces de resolver el problema de la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al medio de cultivo y que las concentraciones, que para cierto tipo de fermentaciones aeróbicas se pueden considerar críticas, para la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, es más que suficiente para satisfacer las necesidades para la biosíntesis de nuevas células, así como del producto que nos interesa. Sin embargo, no debemos dejar de observar que debido a la característica No-Newtoniana del medio de fermentación hay una resistencia a la transferencia de masa entre el medio de cultivo y las células que componen al sistema de fermentación (81,82,86).

Es posible, que como sucede con el caso del oxígeno, exista más de una resistencia a la transferencia de masa, aunque por ahora, sólo podamos hacer referencia al transporte de masa representado por la región dependiente de los impulsores.

En un intento por correlacionar un coeficiente de transferencia de masa con parámetros del impulsor, podemos decir que dentro de éstos se puede incluir la potencia por unidad de volumen, su velocidad terminal, así como su esfuerzo cortante. Así, de cada uno de ellos es factible la obtención de una correlación separada para cada impulsor. Sin embargo, hay que indicar que la capacidad de bombeo del impulsor parece ser un parámetro útil para correlacionar coeficientes de transferencia de masa entre medios de cultivo y las células, de tal manera que cuando lo relacionamos con la velocidad del impulsor y sus dimensiones se puede tener la siguiente expresión:

$$\text{Capacidad de Bombeo del mbeo del Impulsor} = N D_t^3 h$$

en la que:

$N$  = Velocidad de agitación del impulsor (  $\text{seg}^{-1}$  )

$D_1$  = Diámetro del impulsor ( cm )

$h$  = Factor de corrección de altura de la paleta,  $H / 0.2 D_1$  ( Adimensional )

$H$  = Altura del impulsor ( cm )

Aunque sea para dos impulsores, los resultados de esta correlación se muestran en la Figura 10, la cual proviene de la demostración de los requerimientos bajos de oxígeno y del favorecimiento en la transferencia de masa en base a nutrientes.

Desde el punto de vista físico, se pudo establecer una relación entre el bombeo del impulsor y la velocidad del medio de cultivo, el tiempo de circulación o tiempo de mezclado, bajo la consideración de que algunos autores (140,149) postularon que la capacidad de bombeo del impulsor es un parámetro importante en medios de fermentación tipo No-Newtoniano, lo que en cierta forma, fue confirmado por nuestros estudios cualitativos y cuantitativos.

Siguiendo el mismo criterio, es decir, relacionando el fenómeno de transferencia de oxígeno con el de los nutrientes del medio de cultivo al interior de la célula, podemos decir que otro componente importante de la transferencia de masa es, precisamente, el que se refiere al transporte de nutrientes al interior de la célula.

Como ya se mencionó, una conclusión que debemos aceptar, es que, así como existe resistencia a la transferencia de oxígeno, también existe a la transferencia de nutrientes, aunque, algunas veces, los datos experimentales no nos permiten asegurar la presencia de esta resistencia directamente.

#### **4.2.5.- ASPECTOS REOLOGICOS Y DE MEZCLADO EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACION DE *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4**

Con el fin de reforzar la conceptualización sobre la importancia del mezclado sobre la transferencia de oxígeno y de masa en la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, otro enfoque para interpretar lo anterior es evaluar la influencia de la calidad del mezclado sobre el comportamiento del proceso de fermentación.

A pesar de que el mezclado ha sido considerado durante mucho tiempo como un parámetro importante en la actividad biológica de medios de cultivo para fermentaciones de tipo Newtoniano y No-Newtoniano. la realidad es que su influencia se cuantifica sólo de vez en cuando. Así por ejemplo, cuando se realizan observaciones visuales, se puede

constatar un grado de heterogeneidad aún a concentraciones celulares relativamente bajas ( 3 - 5 gBM / LMC ) y, especialmente en las fermentaciones de tipo micelial, se puede observar cómo circula cierta cantidad de biomasa cerca del conjunto de impulsores por algún período de tiempo, para luego regresar a las zonas de mezclado pobre; en éstas, la actividad microbiana puede ser más baja que el promedio debido a la deficiente transferencia de nutrientes al interior de la célula, ocasionado así mismo, por una disminución en el transporte convectivo al interior de las células. En este momento, la toma de decisión en cuanto a cambiar el diámetro de los impulsores, así como su velocidad, ocasionarán un cambio en el tiempo de residencia en las regiones de mezclado pobre.

Indudablemente, existe información sobre la influencia de los parámetros relacionados con el reactor y los impulsores sobre el mezclado de tal manera que se puede establecer una correlación entre el Número de Mezclado y el Número de Reynolds, para sistemas Newtonianos en ausencia de una fase gaseosa (145). Para el uso de esta correlación se requiere conocer la viscosidad con el fin de calcular el Número de Reynolds, y así, el objetivo experimental es obtener parámetros reológicos para el medio de cultivo con el fin de examinar cuantitativamente la influencia del mezclado sobre la actividad biológica.

#### 43.- CUANTIFICACION DE LA REOLOGIA *in situ* A TRAVES DE LA MEDICION DEL CONSUMO DE POTENCIA

La mayoría de los investigadores han estudiado la reología de medios de cultivo a través de sacar muestras del fermentador, lo cual, implica una eliminación de la fase gaseosa para luego someter las muestras a estudios convencionales de viscosidad (156,158,159,160). Bajo estas condiciones de operación, existe una pérdida hasta de un 25% del volumen del medio de cultivo y, considerando la característica estructural de la biomasa presente, es definitivamente más deseable realizar esta cuantificación en presencia de la aeración y agitación en el sistema de agitación. Para ello, mediante el sistema de medición reológica *in situ* establecida a base de mediciones de la velocidad de agitación y la potencia de agitación se pudo obtener información con más alto nivel de confiabilidad.

Utilizando el sistema detallado en la sección de Materiales y Métodos, el esfuerzo cortante pudo ser obtenido a diferentes velocidades de agitación para luego graficar los datos obtenidos contra la velocidad de corte. Los reogramas resultantes fueron utilizados para determinar los parámetros reológicos para el medio de cultivo *in situ*.

El estudio de la reología de un medio de cultivo, requiere en primera instancia establecer una relación entre el Número de Potencia y el Número de Reynolds (166,167):

$$N_p \propto N_{Re}^m$$

ecuación en la que:

$$N_p = \text{Número de Potencia ( Adimensional )}$$

$N_{Re}$  = Número de Reynolds ( Adimensional )  
 $m$  = Exponente del Número de Reynolds, el cual, es una función del régimen de flujo de fluido.

$$P / N^3 D_i^5 \rho \propto ( N D_i^2 \rho / \mu )^m$$

ecuación en la que:

$P$  = Potencia de Agitación ( g cm<sup>2</sup> / seg<sup>3</sup> )

$N$  = Velocidad de Agitación del Impulsor ( seg<sup>-1</sup> )

$D_i$  = Diámetro del Impulsor ( cm )

$\rho$  = Densidad del fluido ( g / cm<sup>3</sup> )

$\mu$  = Viscosidad del fluido ( g / cm x seg )

Aquí, conviene mencionar que bajo funciones de un flujo totalmente turbulento, el exponente del Número de Reynolds (  $m$  ) es igual a cero y en el régimen de transición superior es más grande que cero. Ahora bien, conforme el Número de Reynolds disminuye, el valor de (  $m$  ) regresa a través de cero y toma valores entre cero y menos uno en el régimen de flujo de transición más baja. Finalmente, en flujo laminar (  $m$  ), es igual a menos uno y este valor es el más bajo que se puede obtener, por lo que, para un impulsor dado y para un fluido Newtoniano la relación entre la potencia de agitación, viscosidad y velocidad del impulsor viene a quedar de la manera siguiente:

$$P \propto N^2$$

Como puede verse, esta relación define el flujo laminar para el impulsor en el caso de un fluido Newtoniano y, en el caso de uno de tipo No-Newtoniano, la viscosidad aparente (  $\mu_a$  ) está influenciada por la velocidad del impulsor. Así pues, si deseamos hacer una relación entre estos dos parámetros en el caso del modelo de la Ley de Potencia para un caso pseudoplástico, hacemos uso de la consideración establecida por algunos autores (131,137):

$$\mu_a = m ( dv / dy )^{n-1}$$

$$( dv / dy ) = 11.5 N$$

ecuaciones en las que:

$\mu_a$  = Viscosidad Aparente del Fluido ( g / cm x seg )

$m$  = Índice de Consistencia de Flujo ( g / cm x seg<sup>2-n</sup> )  
 (  $dv / dy$  ) = Velocidad de Corte ( seg<sup>-1</sup> )

$n$  = Índice de Comportamiento de Flujo

De esta forma, para un impulsor dado y para un fluido pseudoplástico el modelo de la Ley de Potencia queda de la manera siguiente:

$$P \propto N^{1+n}$$

El exponente  $(1 + n)$  sobre la velocidad de agitación puede ser tomado entre valores de 1 y 2 para fluidos pseudoplásticos, lo cual, provee una prueba para flujo laminar. Así, al realizar una serie de experiencias con el fin de graficar valores de la potencia de agitación contra la velocidad de los impulsores, se pudo obtener la Figura 11, la cual dio paso a condiciones para hacer una caracterización reológica *in situ*. Los datos involucrados en las curvas A y B de la gráfica tienen pendientes de 1.4 y 1.1 respectivamente, de tal manera que, si uno convierte esta información a esfuerzo cortante y velocidad de corte, se pueden obtener reogramas como se muestran en la Figura 12. Las pendientes de las curvas A y B de la Figura 12, son 0.37 y 0.10 respectivamente indicando que la potencia debería ser proporcional a  $N^{1.37}$  y  $N^{1.10}$ . Lo anterior, nos permite visualizar qué datos pueden ser utilizados para el cálculo de parámetros biológicos, lo que, en este caso, nos permite estar seguros de que podemos utilizar el modelo de la Ley de Potencia para nuestros estudios reológicos, la cual es de la forma siguiente:

$$\tau = m (dv / dy)^n$$

ecuación en la que:

$$\tau = \text{Esfuerzo Cortante ( g / cm x seg}^2 \text{ )}$$

$$(dv / dy) = \text{Velocidad de Corte ( seg}^{-n} \text{ )}$$

$$m = \text{Indice de Consistencia de Flujo ( g / cm x seg}^{2-n} \text{ )}$$

$$n = \text{Indice de Comportamiento de Flujo}$$

Al hacer un análisis de las curvas obtenidas, se puede establecer que las transiciones que contienen son indicativas de cambios en la estructura del medio de cultivo o de las condiciones hidrodinámicas que imperan en el reactor. Así mismo, que a través de los parámetros reológicos  $(m)$  y  $(n)$  contenidas en el modelo de Ley de Potencia pueden ser determinados a partir de cada curva, con el conocimiento de que el índice de consistencia de flujo  $(m)$  es el valor del esfuerzo cortante cuando la velocidad de corte es igual a  $1 \text{ seg}^{-1}$  y que puede ser relacionado con el espesamiento o la resistencia viscosa del medio de fermentación. Por otro lado, el índice de comportamiento de flujo  $(n)$  es la pendiente de la curva y en cierta forma nos representa lo No-Newtoniano del medio de fermentación, es decir, es la condición a la cual su resistencia estructural se rompe ante la presencia de un esfuerzo cortante conforme la velocidad de corte es incrementada.

Una vez que se conceptualizó lo anterior, los parámetros reológicos  $(m)$  y  $(n)$

fueron determinados para los impulsores empleados en este estudio y cuyos resultados para el impulsor tipo Turbina II, se pueden observar en la Figura 13. Estos valores experimentales se pueden reproducir ya que cada curva contiene datos provenientes de dos experimentos. La parte más baja de esta figura muestra el índice de comportamiento de flujo como una función de la concentración celular y de la velocidad del sistema de impulsores, estableciéndose que los valores bajos de este índice de comportamiento indica que el medio de cultivo presenta características No-Newtonianas, así como que este índice es una función de la velocidad de agitación utilizada durante el proceso de fermentación.

La parte central de la gráfica muestra los índices de consistencia de flujo correspondientes, los cuales nos indican que el medio de fermentación es más resistente al flujo que al agua ( en la cual  $m = 0.01$  ). En este caso, nuevamente el índice de consistencia de flujo ( $m$ ) es una función de la velocidad del sistema de impulsores así como de la concentración celular y sólidos en suspensión.

Una vez que se obtuvieron las velocidades de corte para sus correspondientes velocidades de agitación utilizadas en los procesos de fermentación, fueron empleadas para calcular las viscosidades aparentes correspondientes a partir de los datos reológicos, haciendo notar que las viscosidades aparentes fueron definidas como  $\delta \sigma / \Delta (dv / dy)$  a las velocidades de corte que interesan desde el punto de vista de proceso.

La parte superior de la Figura 13, nos muestra las viscosidades calculadas para el impulsor de 10 cm, nuevamente como una función de la concentración celular a dos velocidades de agitación ( 500 y 700 rpm ), obteniéndose valores entre 50 y 200 veces más altos que los del agua.

Con los datos anteriores, es posible calcular Números de Reynolds para las dos velocidades de agitación empleadas, las cuales se pueden mostrar como una función de la concentración celular en la Figura 14. A partir de estos Números de Reynolds calculados se puede concluir que el flujo proporcionado por el impulsor se encuentra en un régimen de transición.

Los resultados de las dos últimas figuras nos muestran los cambios en la reología del medio de cultivo durante las fases de crecimiento del proceso de fermentación, guardando una relación con la concentración celular, sin embargo, no hay que olvidar que la biosíntesis del insecticida tiene lugar después de que el crecimiento celular ha terminado, por lo que, hubo necesidad de que los datos reológicos fuesen tomados durante la fase de producción también.

Ahora bien, considerando que la concentración celular fue esencialmente constante durante estas mediciones, cualquier cambio reológico presente puede ser atribuido a los cambios fisicoquímicos durante esta parte del proceso, lo cual puede apreciarse en la Tabla 8, en la que podemos apreciar que el índice de consistencia de flujo cae lentamente conforme el proceso de fermentación continúa mientras que el índice de comportamiento

de flujo logra un alcance sustancial. Esta información demuestra el hecho de que la viscosidad aparente no está relacionada directamente con la concentración celular solamente.

Los estudios reológicos llevados a cabo con los impulsores tipo Turbina I y II de 7 x 1.0 cm y de 10 x 2.0 cm, respectivamente, son mostrados en las Figuras 15 y 16. En ellas, los datos son cualitativamente similares, es decir, con un incremento en la viscosidad aparente a concentraciones celulares por debajo de 3 gBM / LMC seguidas por un incremento o ninguno conforme aumenta la concentración de biomasa; así mismo, se puede decir que este fenómeno está asociado con un ligero incremento en el índice de consistencia de flujo y una disminución en el índice de comportamiento de flujo.

Con estos resultados se puede establecer que la viscosidad aparente *in situ* no siempre se incrementa con la concentración celular, lo cual podría aparecer anormal, ya que, la apariencia visual del medio de fermentación conforme ésta va avanzando podría hacer pensar que la viscosidad aparente pudiera incrementarse conforme se incrementa la concentración de biomasa y el tiempo de fermentación. Lo anterior es reportado indebidamente por varios investigadores cuando se utilizan las mediciones reológicas *in vitro*. Para lo anterior, existen dos posibles explicaciones; primero, podría suponerse que existe una cierta conformación física entre las células y los sólidos en suspensión en el medio de cultivo durante el proceso de fermentación, de tal manera, que hay un incremento en la densidad celular local sin que haya un incremento correspondiente en el volumen de la fase comprendida por los sólidos en suspensión, de tal manera, que se podría considerar que el volumen de la fase dispersa es la que determina la viscosidad aparente de la suspensión, y así, al considerar el desarrollo del complejo biomasa-sólidos en suspensión, se puede presentar un incremento proporcional en la viscosidad aparente que no sea afín a la concentración celular. Como segunda explicación, debemos tener en mente que el incremento en la viscosidad es muy pequeño.

Así pues, después de estos análisis es interesante el concluir que la viscosidad aparente del medio de fermentación no es debida a la concentración celular, sino más bien a las dimensiones y propiedades mecánicas de todo el material en suspensión que compone al medio de cultivo, de tal manera, que no debe esperarse un incremento directo de la viscosidad del medio con relación a la concentración celular. Ahora bien, debe entenderse que la estructura es además influenciada por la hidrodinámica del sistema de fermentación y que otra influencia en la estructura del medio de cultivo es ejercida por la cantidad de aire que está entrando y que forma la fase gaseosa, la cual, se incrementa conforme se va desarrollando el proceso de fermentación. Se puede decir que este gas que está entrando podría incrementar la sensibilidad del medio de fermentación a los esfuerzos cortantes y que la reducción del índice de comportamiento de flujo baja la viscosidad aparente. Así pues, en la Tabla 9, se puede ver que los datos reológicos *in situ* demuestran una disminución en el índice de comportamiento de flujo el cual es el responsable de la disminución de las viscosidades calculadas, y que al observar los índices de consistencia de flujo, éstos se van incrementando en el mismo nivel, pero el resultado neto, es una disminución en las

viscosidades calculadas conforme la concentración celular se incrementa. Por último, se puede notar que los reogramas de la Figura 12, muestran un cambio a valores más altos dependiente, lo cual caracteriza el régimen de flujo turbulento ( $P \propto N^3$ ) más o menos a las mismas velocidades de corte, lo cual es consistente con las viscosidades aparentes calculadas a través de las mediciones de la potencia consumida por los impulsores.

Los estudios reológicos obtenidos en estos estudios difícilmente encajan en los reportados en la literatura, puesto que como ya se ha mencionado, existe poca información con respecto a la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*; más aún, si tomamos en cuenta que todos los datos reportados en la literatura provienen de estudios reológicos llevados a cabo *in vitro* y utilizando muestras sin gas tomadas del fermentador. En nuestro caso, resultan interesante las comparaciones que hacemos de los estudios reológicos realizados *in vitro* e *in situ*, éstos últimos a través de mediciones de la potencia consumida por los impulsores y, los primeros, a través de un viscosímetro Brookfield.

Los datos provenientes del sistema *in vitro* nos muestran que el medio de cultivo posee esfuerzos cortantes más bajos que los que se han obtenido a través de las mediciones *in situ*, lo cual fue verdadero en los dos casos que se probaron y que se muestran en la Tabla 9. Esta Tabla contiene valores para el índice de consistencia de Flujo ( $m$ ), el índice de comportamiento de flujo ( $n$ ) y la viscosidad aparente calculada mediante los diagramas en que se relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de corte utilizando ambos métodos. En los dos casos, el índice de consistencia de flujo ( $m$ ), es más alto para las mediciones *in situ* y comparando los valores de índice de comportamiento de flujo ( $n$ ), las condiciones *in situ* parecen ser más sensibles al adelgazamiento del sistema cortante que para el caso *in vitro*.

Es importante observar que el índice de consistencia de flujo ( $m$ ) obtenido por las mediciones *in vitro* muestra un incremento significativo con respecto a la concentración celular, lo cual, no fue observado en las mediciones *in situ*. Estas diferencias podrían ser explicadas de la manera siguiente: a una velocidad de corte dada, ( $m$ ) es una medida de la resistencia del fluido al flujo, sin embargo, durante las mediciones *in vitro* hay que considerar que el medio de cultivo no está fluyendo en el viscosímetro Brookfield; en lugar de esto, hay una capa clara de sobrenadante que se forma a los pocos segundos en el cilindro que está girando y el complejo biomasa-sólidos en suspensión rápidamente se contrae formando una estructura rígida. Ahora bien, si lo anterior lo comparamos con lo que sucede en las mediciones *in situ*, en este caso veremos que los impulsores originan que el medio de cultivo esté circulando a través de todo el reactor, originando que la interacción entre todas las partículas que conforman la suspensión presenten una resistencia al flujo, la cual tiene que ser vencida por el sistema de impulsores. En este caso, la estructura del medio de fermentación es dinámica y está sujeta a procesos de oposición al esfuerzo cortante, a la colisión y a la reagregación, conduciendo a una destrucción constante y reformación inmediata de dicha estructura. Todo esto hace lógico deducir que el movimiento del medio de cultivo debe ser necesario para estimar su consistencia bajo

condiciones de flujo.

Otro factor que debe ser considerado en el sistema **in situ**, es la fracción de volumen de la fase gaseosa producida por el gas de entrada, ya que el comportamiento viscoso proviene del volumen de la fase dispersa, por lo que, debe esperarse que la fase gaseosa tenga una influencia significativa. De todo lo anterior, podría desprenderse que las mediciones reológicas **in vitro** no muestran verdaderamente la naturaleza No-Newtoniana de un fluido.

Es indudable que los estudios reológicos realizados **in vitro** e **in situ**, son de gran importancia para aspectos no sólo de tipo bioquímico y microbiológico, sino que desde el punto de vista industrial, son una herramienta de gran utilidad también. Para el caso de la propagación de *Bacillus thuringiensis*, se considera que el criterio reológico deberá constituirse como un reservorio de información para la toma de decisiones en el diseño del reactor, escalamiento del proceso y, finalmente, como una base importante para los estudios de factibilidad técnico-económica (157,163,186,188,189).

Así pues, en un intento por profundizar más en este conocimiento, se puede establecer que los índices de comportamiento de flujo medidos **in situ** son más bajos que aquellos que fueron medidos **in vitro**. Sin embargo, al consultar la literatura y analizar los estudios realizados en otros procesos de fermentación (25,42,43, 54), se puede observar que la mayoría de los investigadores utilizaron impulsores de paleta o turbina en lugar de los péndulos lisos en sus viscosímetros rotacionales. Es vital realizar una desgasificación, necesaria para poder reproducir el método **in vitro**, ya que como se mencionó con anterioridad, la eliminación de la fase gaseosa puede conducir a un incremento en el índice de comportamiento de flujo del medio de cultivo, y por último, considerar que si en un momento determinado existe la presencia de esfuerzos cortantes turbulentos durante la medición de la potencia consumida por el sistema de impulsores, el método **in situ** sobreestimaré el índice de comportamiento de flujo a través de un incremento en él, lo cual nos lleva a una posición de que los índices de comportamiento de flujo que se originan **in situ** durante el proceso de fermentación, son significativamente más bajos que aquellos que se obtienen por el método **in vitro**.

Como un concepto final, los resultados que se muestran en la Tabla 9, nos muestran que la viscosidad aparente calculada utilizando el sistema **in vitro** se incrementa con la concentración celular, mientras que el caso **in situ** ofrece una relación inversa. La primera relación se muestra consistente con los resultados obtenidos por otros investigadores utilizando la técnica **in vitro**; sin embargo, debido a las consideraciones presentadas, la posición emanada de esta investigación es que las mediciones **in situ** presentan las características reológicas de un medio de fermentación de una manera más pragmática, considerándose que este estudio es el primero de su tipo en el campo de los bioinsecticidas producidos por *Bacillus thuringiensis*.

En un intento por conjuntar todas las consideraciones mencionadas con anterioridad,

se puede decir que las observaciones reológicas que se reportan en este trabajo de investigación son estimaciones que persisten en un proceso de fermentación para la producción de insecticidas biológicos bajo las condiciones de operación ya especificadas. Como primer instancia, las viscosidades calculadas parecen ser significativamente insensibles a la concentración celular, pero esta insensibilidad, es consistente con otras observaciones. La determinación de la reología del medio de cultivo por el método *in situ*, hace obvias una serie de objeciones a las mediciones *in vitro*, a través del uso de viscosímetros rotatorios. No debemos olvidar que durante las mediciones no se presenta la separación de los sólidos, que el manejo del medio de cultivo es mínimo y que la presencia de un volumen considerable de la fase gaseosa ( 25 % del medio de cultivo, aproximadamente ) debe ser considerada para esta cuantificación.

#### 4.4.- TIEMPOS DE MEZCLADO EN EL REACTOR EXPERIMENTAL

En virtud de que este trabajo de investigación visualizó el grado No-Newtoniano del medio de cultivo utilizado por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 para la producción de bioinsecticidas, se puede decir que el Número de Reynolds del sistema de impulsores podría ser utilizado para estimar los efectos de mezclado a partir de correlaciones disponibles para lo que se conoce como el tiempo terminal del mezclado (145). Sin embargo, el uso de correlaciones hidrodinámicas con fluidos pseudoplásticos podría ser criticado (75,131); más aún, cuando se desconoce las influencias sobre el mezclado ejercidas por las alturas de las paletas de impulsores no-estándares, así como de la presencia de una fase gaseosa. Así pues, para nuestro caso, hobo necesidad de obtener datos de tiempos de mezclado para el reactor y los dos tipos de impulsores utilizados.

Los datos de tiempos de mezclado obtenidos fueron posteriormente utilizados para calcular el número de mezclado de Norwood y Metzner (145) de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$N_M = \Theta_B ( ND_1^2 )^{2/3} g^{1/6} D_1^{1/2} / ( H_L^{1/2} D_T^{3/2} )$$

ecuación en la que:

$D_T$  = Diámetro del Tanque ( cm )

$g$  = Aceleración Gravitacional ( 980.7 cm<sup>2</sup> / seg )

$H_L$  = Altura del Líquido en el Tanque ( cm )

$\Theta$  = Tiempo Terminal de Mezclado ( seg )

$N_M$  = Número de Mezclado ( Adimensional )

Los números de mezclado, son graficados contra los números de Reynolds correspondientes a los impulsores que se utilizaron, lo cual se muestra en la Figura 17, observándose que los números de mezclado obtenidos para los impulsores de este estudio son aproximadamente el doble de aquellos encontrados por Norwood y Metzner (145), cuya correlación está graficada en forma de línea intermitente en dicha figura.

Es digno de mencionarse que nuestros resultados experimentales son cualitativamente consistentes con respecto al trabajo desarrollado por los autores antes mencionados, ya que, en cierta forma describen unas curvas paralelas y, el hecho de que nuestros tiempos de mezclado experimentales sean mayores es debido a que los pulsos de fenoltaleína fueron inyectados en la parte de arriba del fluido y no cerca de los impulsores. Así pues, los tiempos de mezclado muestran dos características importantes: Primero, la pendiente decreciente y empinada del número de mezclado que se presenta al principio de Números de Reynolds más altos que para el caso de impulsores estándar y, segundo, que para alturas de paleta de impulsores más bajas tienen esencialmente el mismo número de mezclado que para el caso de impulsores estándar en los niveles de transición de flujo.

En este caso se puede decir también que este estudio es de los primeros en reportar la influencia de la altura de la paleta sobre la calidad de mezclado de un medio de cultivo para la producción de bioinsecticidas a partir de *Bacillus thuringiensis*. Es conveniente mencionar que se realizaron diferentes mediciones experimentales del tiempo terminal de mezclado bajo diferentes condiciones en las velocidades de aeración y agitación así como en viscosidad de fluidos Newtonianos. De estos experimentos, no se observó ninguna relación sistemática y cuantitativa entre la velocidad de aeración y tiempo de mezclado; como el objetivo principal de nuestra investigación no era evaluar el efecto de la aeración sobre la calidad de mezclado, ese aspecto no fue analizado con detalle.

#### **4.4.1.- MEZCLADO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACION DE *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4**

Como puede observarse, hasta ahora, parte de lo que se ha mostrado está relacionado con los aspectos reológicos y de mezclado con el fin de obtener los tiempos de mezclado en el medio de fermentación. Así, se procedió a caracterizar el tiempo de mezclado de un fluido Newtoniano y relacionarlo con el Número de Reynolds para el reactor utilizado, el sistema de impulsores y su geometría. Ahora, es conveniente mencionar que hubo dos razones importantes para llevar a cabo estos experimentos. La primera de ellas fue la de establecer un protocolo experimental y procedimientos a través de los cuales los tiempos de mezclado pudieran ser medidos utilizando el medio de cultivo actual en el proceso de fermentación con *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, obteniéndose una experiencia con fluidos de tipo Newtoniano que mostraron el volumen exacto que debería ser utilizado para la inyección de pulsos de fenoltaleína a una determinada temperatura, lo cual nos dio una visión sobre la sensibilidad y la respuesta de las determinaciones.

La segunda razón, que se considera la más importante en cuanto a la ejecución de estos experimentos preliminares, es la experiencia y la conveniencia de llevarlos a cabo, ya que, la medición de los tiempos de mezclado en el medio de cultivo que se considera más apropiado para la producción de un insecticida para combatir el gusano cogollero de maíz (*Spodoptera frugiperda*) requiere de un número determinado de fermentaciones, de las cuales cada una consume mucho tiempo. Por ello, se puede establecer la hipótesis que la correlación del tiempo de mezclado, una vez que se ha llegado a establecer por fluidos Newtonianos, pudiera ser aplicable a medios de cultivo para la propagación de *Bacillus thuringiensis*.

Ahora bien, para ser válida esta hipótesis, los tiempos de mezclado experimental en el medio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, deberán ser comparados con los tiempos de mezclado determinados a través de la correlación. Si la hipótesis es válida, será posible disminuir el número de experimentos de tiempos de mezclado que se requieren para los medios de cultivo, lo cual, es posible debido a la reología del medio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, el cual ha sido bien caracterizado. Con ello, se puede determinar los tiempos de mezclado de otros medios de cultivo para calcular, posteriormente, el Número de Reynolds del sistema de impulsores.

Los tiempos de mezclado experimentales del medio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 utilizando la correlación Tiempo de Mezclado - Número de Reynolds se muestra en la Figura 18, en la cual los datos de la Figura 17 han sido omitidos.

Debido a la poca diferencia en las velocidades de agitación y en las dimensiones de los impulsores, las diferencias en los valores de los Números de Reynolds obtenidos también son pequeñas, lo cual también se manifiesta en los valores de las viscosidades aparentes obtenidas.

Al examinar los tiempos de mezclado de la Figura 18, se puede deducir que existe un grado No-Newtoniano en el medio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, lo cual, concuerda con los obtenidos para el caso de fluidos Newtonianos, lo que conduce a pensar de que los tiempos de mezclados obtenidos a partir de las viscosidades aparentes calculadas del medio de cultivo son válidos.

#### 4.4.2.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE MEZCLADO SOBRE LA CINÉTICA DE CONSUMO DE OXIGENO POR *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

Una vez que se estableció el método para cuantificar los tiempos de mezclado en el medio de cultivo utilizado por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, se realizó un intento por combinar esta información para corroborar, una vez más, la cinética de consumo

de oxígeno que ya había sido establecida previamente. Por otro lado, se trató de asegurar el efecto del mezclado sobre el sistema microbiano como un factor limitante en el transporte de nutrientes.

Como una primera respuesta, se supuso una relación lineal entre el consumo de oxígeno y el tiempo de mezclado, es decir, que la velocidad total del consumo de oxígeno debería ser inversamente proporcional a la cantidad de tiempo requerido para distribuir en todo el reactor el oxígeno que está entrando. Así, para establecer una apreciación cuantitativa de los tiempos de mezclado para el medio de cultivo que utiliza *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, la Tabla 10, nos muestra algunos valores representativos, los que, al considerar una inversa, la relación lineal con respecto a la concentración de oxígeno disuelto, nos permita que el producto de la velocidad específica de consumo de oxígeno y el tiempo de mezclado puedan ser calculados y dar origen a una gráfica contra la concentración de oxígeno disuelto (Figura 19).

Esta figura incluye toda la fase de crecimiento activa para los dos tipos de impulsores utilizados y para los cuales se calcularon los tiempos de mezclado. Cuando el producto de multiplicar la velocidad de consumo de oxígeno con el tiempo de mezclado, se grafica contra la concentración de oxígeno disuelto, el grupo de líneas separadas para cada velocidad de agitación, diámetro del impulsor y la altura de su paleta, tienden a desaparecer, de tal manera, que las curvas individuales vienen a ser independientes del mezclado en varios puntos a lo largo de la curva común en la Figura 19.

Lo anterior, nos muestra el punto donde la limitación del mezclado va desapareciendo a concentraciones relativamente más altas de oxígeno disuelto conforme la velocidad de agitación se va reduciendo. Si bien es cierto que los datos que aparecen en la Figura 19, no muestran que haya una región dependiente del impulsor, en la cual el mezclado afecte fuertemente el consumo de oxígeno, sí se puede decir que esta región está representada por resultados experimentales en los que sí hay una relación directa entre la concentración de producto y el tiempo de mezclado, lo cual nos conduce al hecho de que todos los datos pueden ser relacionados en una curva común, que sugiere la importancia del mezclado del fluido sobre la actividad biológica de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.

Al hacer un análisis detallado de estas observaciones se puede decir que los microorganismos que se encuentran alrededor de los impulsores deben responder al comportamiento de la concentración del oxígeno disuelto, o bien, a fenómenos de transferencia de masa y de calor, ya que esta región se considera como la de mejor mezclado. Sin embargo, el medio de cultivo que contiene estos microorganismos es bombeado por el impulsor a otras regiones del reactor en donde el mezclado es más pobre, en las cuales la concentración de oxígeno disuelto pudiera ser diferente así como las condiciones de transferencia de masa y de calor. En principio, pese a que *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 no adolece de una demanda de oxígeno significativa, sí se puede decir que en un proceso de fermentación aeróbica una consecuencia de la

transferencia de oxígeno pobre en esas regiones, es que la actividad respiratoria por parte del sistema microbiano es relativamente baja, lo cual debe suceder con la transferencia de nutrientes al interior de las células. Los resultados que se muestran en la Figura 19, hacen notar que a través del uso de una relación lineal con respecto al tiempo de mezclado, la actividad respiratoria del microorganismo no tiene relación alguna con la eficiencia en el transporte de nutrientes al interior de la célula a diferentes velocidades de agitación, lo cual puede ser interpretado de la siguiente manera: en la revisión de la literatura se ha demostrado que el consumo de oxígeno por los microorganismos se ajusta reversible y rápidamente cuando las concentraciones de oxígeno son cambiadas. Este fenómeno de rápido ajuste a la velocidad de consumo de oxígeno en respuesta a cambios en la concentración de oxígeno disuelto se observa también cuando se realizan experimentos para observar los cambios que se presentan en la fisiología microbiana al hacer un cambio en la concentración de oxígeno disuelto que ha permanecido constante durante un lapso de tiempo significativo en una fermentación continua aeróbica. En cambio, en nuestro caso, independientemente de las zonas ricas y pobres en calidad de mezclado, el microorganismo no se ve afectado desde el punto de vista de respiración, sin embargo, la calidad de la respuesta con relación a la concentración celular es satisfactoria, por lo que, se considera que la magnitud de los tiempos de mezclado ofrece una medición indirecta de las fracciones del contenido del reactor en las cuales el microorganismo tiene una residencia con diferentes actividades metabólicas como un resultado de los diferentes grados de mezclado.

De alguna manera, esta hipótesis, sugiere que el tiempo de mezclado es un criterio importante para el mantenimiento similar de actividades biológicas, lo cual podría ser suficiente para considerar a este parámetro como el de mayor importancia para el escalamiento del proceso, ya que, como se mencionó con anterioridad, si bien es cierto que el tiempo de mezclado no afecta la eficiencia respiratoria de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, sí lo hace con el transporte de nutrientes hacia la célula, lo cual se manifiesta a través de una mayor concentración celular y, como consecuencia, de esporas y cristales.

Otro aspecto importante a discutir es el fenómeno que se presenta entre el medio de cultivo compuesto por el complejo biomasa-sólidos en suspensión, el cual se ve dominado, aparentemente, por la capacidad de bombeo de los impulsores; sin embargo, se puede decir también que existe un fenómeno de difusión en el complejo biomasa-sólidos en suspensión dominado por la turbulencia del fluido, de tal manera, que si la correlación del tiempo de mezclado toma en cuenta el bombeo producido por los impulsores y los parámetros de turbulencia, es muy posible que se presenten momentos de transición en estas dos limitaciones de transferencia de masa, de ser así, el tiempo de mezclado se consolidaría como un criterio importante para el escalamiento del proceso, aunque no debemos olvidar que este enfoque es meramente una hipótesis, la cual podría ser demostrada en un intento por escalar el proceso a un volumen mayor.

Para demostrar qué tan útil sería el uso del tiempo de mezclado para escalamiento, a continuación se presenta un ejemplo: Se sabe que es difícil mantener tiempos iguales de

mezclado en una relación volumétrica amplia. Algunos autores (5) han establecido que para reactores similarmente geométricos, el escalamiento en base a mantener igual la potencia por unidad de volumen conduce a una expresión como la siguiente:

$$\Theta_{B2} = \Theta_{B1} ( D_{T2} / D_{T1} )^{11/8}$$

en la que:

$\Theta_B$  = Tiempo de Mezclado ( seg )

$D_T$  = Diámetro del Tanque ( cm )

El subíndice (1) se refiere al reactor del cual se conoce el tiempo de mezclado, mientras que el (2), se refiere al tiempo de mezclado que va a ser designado al nuevo reactor.

Al hacer un escalamiento volumétrico veinticinco veces mayor, se observa un tiempo de mezclado del doble en el reactor más grande. Con el fin de demostrar la utilidad del uso de los tiempos de mezclado, algunos ejemplos de escalamiento se muestran en la Tabla 11. Por aspectos de simplicidad, se supuso una viscosidad de 2 pseudopoise, una densidad del fluido de  $1 \text{ g / cm}^3$  y un consumo de potencia de agitación basado en la ausencia de la fase gaseosa, para todos los casos. Para estos ejemplos se utilizó la correlación de tiempo de mezclado determinada experimentalmente y que se observa en la Figura 17. El escalamiento para el caso 1 (columna 2) corresponde a un incremento de cincuenta veces en volumen manteniendo constante la potencia por unidad de volumen. En este caso, y contrario a lo mostrado por algunos autores, el tiempo terminal de mezclado parece ser que mejora ligeramente en comparación con el reactor más pequeño, lo cual es debido a un incremento inevitable en el Número de Reynolds asociado con un incremento en el diámetro del impulsor. Al realizarse un escalamiento de quinientas veces mayor, basado en similitud geométrica y el mantener constante la potencia por unidad de volumen, da origen a los valores que se observan para el caso 2. En éste, el tiempo terminal de mezclado se incrementa en un 50 % a pesar de que el Número de Reynolds también se incrementa. Para este caso, se puede decir que el impulsor está trabajando en un período de cambio de régimen de flujo y que el número de mezclado se acerca a un valor constante, de tal manera que el tiempo terminal de mezclado puede ser escalado en esta región como se muestra en el caso 3. Lo anterior puede ser complementado incrementando el diámetro del impulsor a  $0.75 D_T$  y aceptando un incremento al doble de la potencia por unidad de volumen.

#### 4.5.- EFECTO DE LOS PARAMETROS DEL IMPULSOR SOBRE LA CALIDAD DE LA PROPAGACION DE *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

Para finalizar este Capítulo de Resultados y Discusión, es importante señalar de una manera pragmática el efecto que tiene la velocidad de agitación de los impulsores seleccionados y la velocidad de consumo de oxígeno sobre la calidad de la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.

Algunos autores dejan ver, aunque de una manera no muy firme, la influencia que tiene el oxígeno sobre la propagación de *Bacillus thuringiensis* (24,60,68,178); desafortunadamente, estos autores no hacen notar el efecto que tiene la velocidad de los impulsores en los reactores utilizados sobre la cinética de consumo de oxígeno.

Con el fin de examinar más ampliamente nuestros resultados sobre el efecto de la velocidad de los impulsores sobre la cinética microbiana de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4, se presentan algunos otros datos más en la Tabla 12. Esta tabla, nos muestra los resultados de tres fermentaciones llevadas a cabo a 100, 300, 500, 600 y 700 rpm, observándose datos similares en las cinéticas de consumo de oxígeno, con cambios significativos en la concentración celular máxima obtenida en cada uno de los procesos, deduciéndose que ésta concentración está directamente relacionada con la velocidad de agitación presente en el proceso de fermentación.

La influencia de la velocidad de agitación se puede relacionar también con la velocidad de síntesis del producto, que de alguna manera, representa la capacidad biológica de las células para producir el insecticida. La Tabla 12, nos muestra algunos de estos parámetros a las mismas cinco velocidades de agitación, incluyendo en la columna 2 un parámetro industrial importante que es la cantidad de cristales producidos por unidad de volumen de fermentador y por hora de operación. Esta productividad integrada está relacionada directamente con la velocidad de agitación.

Así pues, estos resultados indican que la velocidad de agitación tiene una influencia marcada sobre la cantidad de biomasa y la cantidad de cristales, pero no, con la cinética de consumo de oxígeno. Por otro lado, la velocidad de agitación no afecta la eficiencia biológica de la síntesis del insecticida.

Lo anterior nos lleva a la conclusión más importante en el sentido de que la producción del insecticida no tiene ninguna relación con la velocidad de consumo de oxígeno, lo cual deberá considerarse para criterios de operación a nivel industrial; en este, las condiciones de mezclado deberán ser las óptimas para la obtención no sólo de una mayor concentración celular, sino de esporas y cristales también.

#### 4.6.- BIOENSAYOS Y RESPUESTA DEL BIOINSECTICIDA A NIVEL DE CAMPO EXPERIMENTAL

Los resultados de los bioensayos efectuados por la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. así como por el CIIDIR-IPN Unidad Durango para ver la efectividad de la toxicidad de nuestro bioinsecticida fueron satisfactorios.

En principio, la toxicidad se expresa en términos de potencia relativa ( Unidades Internacionales del Tóxico / mg ) mediante la fórmula:

$$UI / ml \text{ tóxico de prueba} = CL \text{ estándar} \times UI \text{ del estándar} / CL \text{ muestra}$$

La potencia relativa de los bioinsecticidas en términos de unidades internacionales utilizando larvas de *Spodoptera frugiperda* de uno a tres días de desarrollo fue la siguiente: Dipel 16,000 UI / mg y el Bioinsecticida C-4 20,000 UI / mg.

El bioinsecticida producido por nuestro grupo de investigación presentó efectividad tóxica en larvas de uno a tres días de desarrollo del Gusano Cogollero del Maíz a dosificaciones de 100 a 300 ppm a nivel de  $CL_{50}$  y de 900 a 1800 ppm en  $CL_{90}$ . Esta situación presenta bondades prácticas de manejo del formulado para evaluaciones a nivel de invernadero y de campo. Es importante decir que, a nivel de bioensayo, las colonias de *Spodoptera frugiperda* fueron más susceptibles a nuestro bioinsecticida que al Dipel, que fue el producto contra el cual se pretende competir.

Para el caso de las pruebas de campo, estas se llevaron a cabo en el Valle del Guadiana, a través del personal técnico de la Delegación Estatal de la S.A.R.H. Se efectuó un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones; los tratamientos a evaluar fueron: nuestro Bioinsecticida C-4 en dosis de 1 Kg / Ha; el Bioinsecticida Dipel 1 Kg / Ha; un insecticida recomendado para el combate del Gusano Cogollero del Maíz, Carbaryl PH 80, a razón de 1.5 Kg / Ha y el Testigo donde no se realizó ninguna aplicación.

Los parámetros que se evaluaron fueron el porcentaje de infestación y el rendimiento, para los cuales se realizó una evaluación a la aplicación. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 13, en la cual, la efectividad de nuestro bioinsecticida se consolida bajo un porcentaje de infestación permitido de 1.2 contra 7.4 de Dipel y 7.0 de Carbaryl PH 80, mientras que el testigo mostró un nivel de infestación de 44.6 %.

#### 5.- IMPORTANCIA

Esta investigación es un esfuerzo importante para evaluar los efectos independientes de las variables físicas como el diámetro y la velocidad de los impulsores, así como la concentración de oxígeno y, la transferencia de masa, sobre la actividad biológica en un medio de fermentación de tipo No-Newtoniano para la producción de un bioinsecticida

empleando una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.

A través de la literatura, se sabe que en las fermentaciones aeróbicas la velocidad y el tamaño de los impulsores afectan significativamente tanto la velocidad específica de consumo de oxígeno como la producción de algún compuesto de interés comercial. Sin embargo, para el caso que nos ocupa, se pudo detectar que el requerimiento de oxígeno por parte del microorganismo fue bajo, lo cual, conduce a concluir que la economía del proceso, se reduce atractivamente desde el punto de vista industrial, pero también es importante deducir que la velocidad de agitación de los impulsores es vital para el logro de un transporte satisfactorio de nutrientes al interior de la célula, aspecto que puede ser detectado mediante la productividad del bioinsecticida.

Así pues, en principio, la presente investigación ha demostrado el papel importante de las condiciones de mezclado sobre la calidad del proceso de fermentación para la producción de un bioinsecticida.

La influencia de dos tamaños de impulsores, así como de su velocidad de agitación y la concentración de oxígeno disuelto, sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno durante el crecimiento activo ha sido definida cualitativa y cuantitativamente, lo que dió paso, por primera vez, y cuando menos en el caso de la producción de bioinsecticidas, a realizar un análisis indirecto sobre el problema de transferencia de masa líquido-sólido en el medio de fermentación, cuyos resultados se manifiestan ante la producción de un bioinsecticida y ante una respuesta de parámetros como son la condición de mezclado y el consumo específico de oxígeno.

El criterio de evaluación reológica del medio de fermentación, es otro aspecto relevante en este trabajo. Las mediciones *in vitro* e *in situ*, conducen a reforzar el error que se comete al emplear datos reológicos provenientes de mediciones *in vitro* para aspectos de diseño y construcción de reactores biológicos, así como para criterios de escalamiento de procesos de fermentación. Lo anterior es en función del uso de muestras de medio de fermentación a las que se les eliminó la fase gaseosa para realizar la cuantificación reológica después. Como consecuencia de ello, se considera que las mediciones de viscosidad aparente determinadas en este estudio, son más representativas de lo que sucede dentro del reactor.

Así pues, toda esta gama de conocimientos forman una base de gran interés para el desarrollo de la Biotecnología en la producción de Insecticidas Biológicos.

## 6. CONCLUSIONES

- 1).- La cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 requiere de una cantidad baja de oxígeno para su propagación.
- 2).- El fenómeno de transferencia de masa no mostró altos niveles de resistencia del paso de nutrientes al interior de la célula. Lo anterior, se manifestó en un aumento de la concentración celular en función de un incremento en la calidad de las condiciones de mezclado, así como en la presencia de un coeficiente de transferencia de masa (  $\text{mg S/gBM} \times \text{HR}$  ) y de la capacidad de bombeo de los impulsores (  $1/\text{seg}$  ).
- 3).- La velocidad específica de consumo de oxígeno y el coeficiente de transferencia de masa, pueden ser relacionados cuantitativamente con el tiempo de mezclado, el cual puede ser evaluado a través de la cuantificación reológica del medio de fermentación *in situ* sin perturbar el proceso de fermentación.
- 4).- La capacidad de bombeo de los impulsores, la relación del esfuerzo cortante y el flujo, así como los tiempos de mezclado en el reactor, son criterios importantes para el escalamiento del proceso de fermentación.
- 5).- La calidad del bioinsecticida es satisfactoria. Los resultados obtenidos a nivel de campo, demuestran su competitividad contra otros insecticidas, tanto de tipo químico como biológico.

## 7. RECOMENDACIONES PARA UNA FUTURA INVESTIGACION

Las recomendaciones para una futura investigación, las cuales se originan después del análisis de resultados del presente trabajo de investigación, caen en tres aspectos principales que son los siguientes: primero, tratar de utilizar las conclusiones a las que se llegó, en otros procesos de fermentación, ya que se considera que lo que se expone puede ser aplicado a la propagación de *Bacillus thuringiensis* en general, sin embargo, los criterios de operación se pueden aplicar a otros tipo de sistemas microbianos que presenten características no-newtonianas.

En segundo término, podría visualizarse la posibilidad de comprobar el nivel de confiabilidad en el proceso de escalamiento de datos. Si bien es cierto que este estudio no abarca una gama amplia de impulsores, también lo es que para aspectos de escalamiento, los resultados expuestos a través de tablas y gráficas, permiten abordar el problema y esperar una reproductibilidad de resultados satisfactoria.

Finalmente, como tercer aspecto, y como criterio de más importancia, se tiene todo

lo referente al fenómeno de transferencia de masa, el cual, hasta el momento de escribir este documento, sigue mostrando una oportunidad amplia de investigación con el fin de asegurar, más aún, el éxito del proceso de fermentación a nivel industrial. Así pues, los resultados que ahora se están obteniendo a nivel de planta piloto, demuestran que el coeficiente de transferencia de masa deberá convertirse en un apoyo significativo para definir el criterio de escalamiento del proceso de fermentación.

En un intento por dejar más claros los tres aspectos anteriores, se puede decir lo siguiente: es seguro que los resultados obtenidos sobre mezclado puedan ser reproducidos en otros sistemas microbianos a base de *Bacillus thuringiensis*, sin embargo, esto debe ser comprobado. Como se mencionó, una de las principales contribuciones de este trabajo de investigación ha sido la caracterización de la viscosidad aparente del medio de fermentación *in situ*.

Debe reconocerse que los equipos con que se cuenta no son de alta sensibilidad para las condiciones de operación bajo las cuales se llevaron a cabo los experimentos, de tal manera que, este factor deberá considerarse. Por ejemplo, debe conocerse la viscosidad aparente al utilizar impulsores más pequeños y bajo concentraciones celulares menores, con ello se requiere aumentar el nivel de sensibilidad utilizado. Con respecto al sistema de mezclado, debe intentarse utilizar un ensamble directo entre el motor y la flecha del agitador para evitar las resistencias presentes en poleas, sellos y baleros. Por otro lado, al hacer las mediciones *in situ*, debe usarse un motor de menor capacidad cuando las condiciones de agitación sean bajas; así, un motor de 1/8 HP es suficiente para volúmenes de operación hasta de 10 litros de medio de cultivo, sin que haya efectos negativos en la cuantificación del consumo de energía a través del uso de un multímetro; por otra parte, con el fin de incrementar la sensibilidad en las mediciones, debe visualizarse el empleo de un calibrador de esfuerzo, o bien un dinamómetro.

Detrás de este estudio está el interés por encontrar un criterio de escalamiento del reactor que permita asegurar la reproducción de los resultados encontrados a escala menor. Por ello, es vital traer nuevamente a un primer plano la importancia de cuantificar parámetros como el tiempo de mezclado, esfuerzo cortante y la capacidad de bombeo por parte de los impulsores. Se puede, incluso, sugerir la medición de estos parámetros a una escala mayor con el fin de respaldar el por qué del incremento en el tamaño de reactores posteriores.

No existe duda acerca de la importancia del tiempo de mezclado. Si este factor se puede relacionar con los aspectos de transferencia de masa, dentro de algunos otros parámetros de escalamiento, podría esperarse que la correlación de Norwood y Metzner se convierta en una herramienta útil para el escalamiento del reactor biológico. Visto de esta manera, la planta piloto puede ser empleada para determinar las características reológicas de un medio de fermentación, así como las cinéticas de respiración y de consumo de sustrato concomitantemente a la biosíntesis del insecticida, con ello, la correlación de Norwood y Metzner permitirá al Biotecnólogo predecir los efectos de las dimensiones de los impulsores,

así como de su velocidad, sobre la eficiencia de un proceso de fermentación. Como ejemplo de lo anterior, el Biotecnólogo puede estar en posición de poder defender una estimación cuantitativa de los beneficios que se obtendrían al aumentar la velocidad de agitación en un reactor, aspecto que por ahora resulta complicado determinar.

En relación al coeficiente de transferencia de masa ( $k_L$ ), en este momento resulta difícil saber si la característica que existe en la capacidad de bombeo por parte de los impulsores, es debida al tiempo de circulación o a la velocidad de las partículas en suspensión o, a ambas. Esta duda puede ser aclarada a mayor escala, solamente. La realidad es que, independientemente que la velocidad de las partículas en suspensión o el tiempo de circulación, en su momento, sean más importantes, la hipótesis de que el fenómeno de transferencia de masa sea más efectivo cuando las células se hallan más cerca de los impulsores, cobra más solidez, haciendo la comparación con aquellas que se localizan en otras regiones del reactor.

Así pues, un aumento en la calidad de las cuantificaciones durante el proceso de fermentación conducirá a la obtención de un panorama mejor de las perspectivas de escalamiento. Actualmente, el grupo de investigación de la Unidad de Biotecnología del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Durango, promueve la continuación de este trabajo mediante un aumento en la calidad de la determinación del coeficiente de transferencia de masa, el cual, forma parte de un modelo matemático que sirve, a su vez, para otro trabajo de investigación sobre simulación y control de procesos para la producción de insecticidas biológicos.

## 8.- ABREVIATURAS

- C Concentración local de oxígeno disuelto ( % sat. aire )
- $C_e$  Concentración de oxígeno en el aire de entrada ( % )
- $C_L$  Concentración de oxígeno en el medio de cultivo ( % sat. aire )
- $C_o$  Concentración de oxígeno en el aire de salida ( % )
- $C_c$  Concentración crítica de oxígeno disuelto en el medio de cultivo ( % sat. aire )
- $D_I$  Diámetro del impulsor ( cm )
- $D_T$  Diámetro del tanque ( cm )
- $F_A$  Velocidad de aeración ( VVM, l/min )
- $g$  Aceleración gravitacional ( cm / seg<sup>2</sup> )
- $h$  Factor de altura de la paleta del impulsor  $h = H_B / ( 0.2 D_I )$  ( adimensional )
- $H_B$  Altura de la paleta del impulsor ( cm )
- $H_L$  Altura del líquido ( cm )
- $j$  Coeficiente de transferencia de masa líquido-célula ( gS / gBM x HR )
- $k$  Coeficiente de descarga del impulsor ( adimensional )
- $k_R$  Constante de relación entre el  $N_{Re}$  y el  $N_p$  en la región de flujo laminar (adimensional)
- $L$  Longitud del huso del viscosímetro Brookfield ( cm )
- $m$  Índice de comportamiento de flujo ( gm / ( cm x seg<sup>n-2</sup> )
- $m_b$  Factor de escala del viscosímetro Brookfield ( adimensional )
- $N$  Velocidad del impulsor ( seg<sup>-1</sup> )
- $N_s$  Demanda biológica de oxígeno ( g O<sub>2</sub> / LMC x HR )
- $N_c$  Número de tiempo de circulación ( adimensional )

$N_M$	Número de mezclado ( adimensional )
$N_{mom}$	Factor de momento $pg^4 / seg^2$ )
$N_p$	Número de potencia ( adimensional )
$N_{Re}$	Número de Reynolds del impulsor, $N D_1^2 / \mu$ ( adimensional )
$N_{Sc}$	Número de Schmidt, $D / \mu$ ( adimensional )
$n$	Índice de comportamiento de flujo ( adimensional )
$P$	Potencia de agitación ( HP / 1000 l ), ( Watts )
$Q_{O_2}$	Velocidad específica de consumo de oxígeno ( g $O_2$ / gBM x HR )
$R_{RO_2}$	Velocidad volumétrica de consumo de oxígeno ( g $O_2$ / cm <sup>3</sup> x HR )
$R_s$	Radio del huso del viscosímetro Brookfield ( cm )
$S$	Concentración de sustrato ( gS / LMC )
$SN$	Número de esporas ( esporas / ml )
$t$	Tiempo ( seg ), ( HR )
$T$	Temperatura ( ° C )
$T_A$	Temperatura ambiente ( °C )
$T_o$	Capacidad del viscosímetro Brookfield ( dinas-cm )
$T_p$	Tiempo del proceso de fermentación ( HR )
$T_s$	Tiempo de esporulación ( HR )
$dv / d$	Velocidad de corte ( seg <sup>-1</sup> )
$V$	Volumen de medio de cultivo ( LMC )
$V_i$	Volumen en la zona del impulsor ( cm <sup>3</sup> )
$V_R$	Volumen en zona alejadas del impulsor ( cm <sup>3</sup> )

- $V_s$  Velocidad superficial del aire ( cm / seg )  
 $V_T$  Volumen del tanque ( cm<sup>3</sup> )  
 $w$  Ancho de la paleta del impulsor ( cm ), ( pg )  
 $X$  Concentración de biomasa o células ( gBM / LMC )  
 $Y_{x/s}$  Coeficiente de rendimiento ( gBM / gS )  
 $\alpha$  Exponente de altura de paleta en  $N_p$  ( adimensional )  
 $\rho$  Densidad ( g / cm<sup>3</sup> )  
 $\rho_f$  Densidad del fluido en suspensión ( g / cm<sup>3</sup> )  
 $\theta_B$  Tiempo terminal de mezclado ( seg )  
 $\theta_c$  Tiempo de circulación ( seg )  
 $\tau$  Esfuerzo Cortante ( g / cm x seg<sup>2</sup> )  
 $\mu$  Viscosidad ( g / cm x seg )  
 $\mu$  Velocidad específica de crecimiento ( HR<sup>-1</sup> )  
 $\mu_a$  Viscosidad aparente ( g / cm x seg<sup>2-n</sup> )  
 $\mu_o$  Viscosidad de un fluido sin partículas en suspensión ( g / cm x seg )

## LITERATURA CITADA

- 1- Abdel-Hameed, A. et al. 1990. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-II. Ultrastructure studies. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 6:305-312.
- 2- Abdel-Hameed, A. et al. 1990. Studies on *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Egypt-III. Selection of media for  $\delta$ -endotoxin production. World Journal of Microbiol. and Biotechnol. 6:313-317.
- 3- Acevedo, F. 1987. Mass Balancing: an Effective Tool for Fermentation Process Optimization. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 6 (4):309-322.
- 4- Aiba, S.T. et al. 1965. Biochemical Engineering. Academic Press. N.Y.
- 5- Aiba, S.T. et al. 1971. Comments on oxygen transfer within a mold pellet. Biotechnol. and Bioeng. 13:583-592.
- 6- Anon. 1960. Flask-Tank set up now turns out first " bug-kill-bug " insecticide. Chem. Eng. 3: 42.
- 7- Aroson, A.T. et al. 1982. Relationship of the synthesis of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. Jour. Bacteriol. 151 ( 1 ): 399-407.
- 8- Astarita, G. et al. 1964. Ossidazione catalitica del solfito di sodio: un metodo per la misura di aree interfaciali. La Chimica e Industria. 46:1021-1026.
- 9- Atkinson, B. et al. 1982. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. The Nature Press. MacMillan Publisher Ltd, Blythe:779-781.
- 10- Avignone Rossa, C.A. et al. 1990. Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. World Jour. Microbiol. and Biotechnol. 6:27-31.
- 11- Baker, J.R. 1991. Motionless Mixers Stir Up New Uses. Chemical Engineering Progress. Jun.:32-38.
- 12- Barjac de H. et al. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga 35(2):233-240.
- 13- Bartholomew, W.H. et al. 1950. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentation. Ind. and Eng. Chem. 42:2802-2809.

- 14.- Bartholomew, W.H. et al. 1979. Economics of Fermentation Processes. Chap. 18 Microbial. Technol. 2: 463-470.
- 15.- Bates, R.L. et al. 1966. Impeller characteristics and power mixing. (Uhl and Gray Eds.) Chap. 3.
- 16.- Bates, R.L. et al. 1963. An examination of some geometric parameters of impeller power. Ind. Eng. Chem. Proc. Des. and Develop. 2: 310-317.
- 17.- Biggs, R.D. 1963. Mixing rates in stirred tanks. Jour. A.I.Ch.E. 9: 636-640.
- 18.- Bimbinet, J. J. 1959. Air-liquid contacting in mixing vessels; hold-up and flooding. M.S. Thesis. Dept. of Chem. Eng., Purdue University, Lafayette, Indiana.
- 19.- Bird, R.B. et al. 1960. Transport Phenomena. John Wiley.
- 20.- Blakebrough, N. et al. 1964. Performance of turbine impellers in sparger aerated fermentation vessels. J. Appl. Chem. 14:413.
- 21.- Blakebrough, N. et al. 1966. Mass Transfer and Mixing Rates in Fermentation Vessels. Biotechnol. and Bioeng. 8:25.
- 22.- Blakebrough, N. et al. 1981. Modelling of the process yields of a whey fermentation Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13:1-9.
- 23.- Blanch, H.W. et al. 1976. Non-Newtonian fermentation broths: Rheology and mass transfer. Biotechnol. and Bioeng. 18: 745-751.
- 24.- Blokhina, T.P. et al. 1983. Variability in *Bacillus thuringiensis* under various growth conditions. Translated from Mikrobiologiya. 53(3):427-431.
- 25.- Bongenaar, J.J.T.M. et al. 1973. A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths. Biotechnol. and Bioeng. 15:201-206.
- 26.- Brandl, E.A. et al. 1966. Aeration in submerged fermentation. Biotechnol. and Bioeng. 8:297-304.
- 27.- Brodkey, R.S. 1966. Fluid motion and mixing. In Mixing (Uhl and Gray, Eds.). Academic Press, Chap. 2.
- 28.- Brodkey, R.S. 1975. Turbulence in Mixing Operations. Academic Press.
- 29.- Brown, D.E. 1977. The measurement of fermenter power input Chemistry & Industry. 16:684-688.

- 30.- Buckland, S.C. et al. 1988. Improved Performance in Viscous Mycelial Fermentations by Agitator Retrofitting. *Biotechnol. and Bioeng.* 31:737-742.
- 31.- Bujalski, W. et al. 1987. The dependency of scale of power numbers of Rushton disc turbiner. *Chem. Eng. Sc.* 42:317-326.
- 32.- Bylinkira, E.S. et al. 1972. The problem of Scale Up in Biosynthesis of antibiotics. Fourth Int. Ferm. Symp. Kyoto, Japan, Abs.F2-6:13.
- 33.- Bylinkira, E.S. et al. 1973. Agitation intensity in antibiotic fermentation broths using isotopic tracers. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 4:331-336.
- 34.- Cadmus, M.C. et al. 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnol. and Bioeng.* 20:1003-1014.
- 35.- Calderbank, P.H. 1959. The prediction of power consumption in the agitation of Non-Newtonian fluids. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 37:26-31.
- 36.- Calderbank, P.H. et al. 1961. The power characteristics of agitators for the mixing of Newtonian and Non-Newtonian fluids. *Trans. Inst. Chem.* 39: 49-53.
- 37.- Calderbank, P.H. 1967. Mass transfer in fermentation equipment. *Biochem. and Biol. Eng. Sc.* ( N.Blakebrough,ed.) Academic Press, 1:1
- 38.- Cantwell, G.E. et al. 1982. Potential of *Bacillus thuringiensis* as a microbial agent against the Mexican Bean Beetle. *Jour. of Econ. Entomology.* 75(2):348-350.
- 39.- Carilli, B.L.A. et al. 1961. Aeration studies. III.- continuous measurement of dissolved oxygen during fermentation in large fermenters. Italy Istituto Superiore Di Sanita Sci. Reports. 1:177.
- 40.- Casas-Campillo, C. 1988. Aspectos del Desarrollo de la Biotecnología en México. Memorias del Colegio Nacional. México, D.F.:15-31.
- 41.- Cazzador, L. 1988. On the Optimal Control of Fed- Batch Reactors with Substrate-Inhibited Kinetics. *Biotechnol. and Bioeng.* 31:670-674.
- 42.- Chain, E.B. et al. 1954. Studi sull aerazione li. *Rend Ist. Sup. Sanita (Italian Ed.)* 17:1109-63.
- 43.- Chain, E.B. et al. 1966. Aeration studies. IV.- aeration conditions in 3000 liter submerged fermentations with various microorganisms. *Biotechnol. and Bioeng.* 8:595-619.

- 44.- Chance, B. 1957. Cellular oxygen requirements. Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol. 16:671-675.
- 45.- Chandrasekharan, K. et al. 1981. Further observations on the scale-up of aerated mixing vessels. Chem. Eng. Sci. 36:819-23.
- 46.- Charles, M. 1978. Technical aspects of the rheological properties of microbial-cultures, Adv. Biochem. Eng. 8:1-62.
- 47.- Chisti, M.Y. et al. 1988. Hydrodynamics and Oxygen Transfer in Pneumatic Bioreactor Devices. Biotechnol. and Bioeng. 31:487-494.
- 48.- Cooney, C.L. et al. 1968. Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. Biotechnol. and Bioeng. 11:269-273.
- 49.- Cooney, C.L. et al. 1971. Oxygen transfer and control. Biotechnol. and Bioeng. Symp. No. 2: 63-67.
- 50.- Cooper, C.M. et al. 1944. Performance of agitated Gas-Liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36:504-507.
- 51.- Cooper, R.G. et al. 1968. Velocity profiles and pumping capacities for turbine type impellers. Can. J. Ch. E. 46:94-101.
- 52.- Cutter, L.A. 1966. Flow and turbulence in a stirred tank. A.I.Ch. E.J. 12:35-39.
- 53.- Danckwerts, P. V. 1970. Gas-Liquid Reactions. McGraw-Hill, New York.
- 54.- Deindoerfer, F.H. et al. 1960. Rheological properties of fermentation broths. Adv. in Appl. Microbiol. Academic Press. 2:165-169.
- 55.- Dickey, D.S. 1981. Turbine agitated gas dispersion: power, flooding and Engineering Principles (Moo-Young, M., Robinson, C.W & Vezina, C. (eds). Pergamon Press, Toronto: 483-487.
- 56.- Douglas, W.R. 1969. Automatic assesment of respiration during growth in stirred fermentors. American Soc. for Microbiology. 18:438-443.
- 57.- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. Journal of Invertebrate Pathology 15:232-238.
- 58.- Dulmage, H.T. 1971. Production of  $\delta$ -Endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* Serotype 3, in three fermentation media. Jour. of Invertabrate Pathology. 18:353-358.

- 5.- Dulmage, H.T. 1973. Assays and Standardization of Microbial Insecticides. Ann. of the New York Academy of Sciences. 217:187-199.
- 60.- Dulmage,H.T. 1982. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Vandekar,M. and Dulmage,H.T. Eds. UNDP/World Bank/WHO, Geneva.
- 61.- Elliot, H.J. 1977. Some rheological properties of gum solutions, In: Sandford, P.A.; Laskin, A. (Eds.) Extracellular microbial polysaccharides, pp. 144-159. Washington: American Chemical Society.
- 62.- Elson, T.P. et al. 1982. The interaction of yield stress and viscoelasticity on the Weissenberg effect. J. Non-New. Fluid Mech. 1-22.
- 63.- Falcon, L.A. 1980. Formulation and application technology. Proceedings of workshop on insect pest management with microbial agents. Boyce Thompson Institute, Tower Road, Cornell:25:32.
- 64.- Faloci,M.M. et al. 1990. Effect of the Media Composition on the Growth Parameters and Biological Properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Delta-Endotoxin. World Jour. of Microbiol. and Biotechnol.6:32-38.
- 65.- Feren, C.J. et al. 1969. The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis. Biotechnol. and Bioeng. 11:583-587.
- 66.- Finn,R.K. 1954. Agitation-Aeration in the laboratory and industry. Bact. Rev. 18:254-259.
- 67.- Finn,R.K. 1961. Characterizing the shear in a stirred fermenter. Italy Super. Sanita. Sci. Repts. 1:196-203.
- 68.- Foda, M.S. et al. 1985. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:50-56.
- 69.- For,D.E. et al. 1972. Mixing times in Newtonian and Non-Newtonian fluids. Chem. Eng. Sci. 17:803-807.
- 70.- Fuchs,R.P. et al. 1971. Effect of surface aeration on Scale-Up Procedures for Fermentation Processes. Ind. and Eng. Chem. Des. Dev. 10:190-197.
- 71.- Galán-Wong,L.J. et al. 1990. GM-2 a New Subspecies of *Bacillus thuringiensis* n. subsp. *coahuilensis* With an Unusual Form of Parasporal Inclusion Body. Pub. Biol. F.C.B. ,U.A.N.L. 4(1-2): 53-58
- 72.- Galindo E. 1985. Polisacáridos microbianos. In:Quintero R. (Ed.) Prospectiva de la

Biotecnología en México, pp 65-92. México D.F. CONACYT.FJBS.

- 73.- García-Gutiérrez, C. y Col. 1990. Efecto de dos Bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre Gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda*. UBAMARI. 19-20:4-17.
- 74.- Gerard, R.W. 1931. Oxygen diffusion into cells. Biol. Bull. 60:245-249.
- 75.- Godlesky, E.S. et al. 1962. Power requirements and blend times in the agitation of pseudoplastic fluids. A.I.Ch.E.J. 8(5):617-621.
- 76.- Gray, J.B. 1966. Flow patterns, Fluid Velocities and Mixing in agitated vessels. Mixing. ( Uhl. and Gray, Eds. ). Chap. 4, Academic Press.
- 77.- Hadjvassiliou, A.G. et al. 1968. The enzymatic assay of pyruvic and lactic acids, a definitive procedure. Clinica Chemica Acta 19:357-361.
- 78.- Harrison, D.E.F. et al. 1969. Responses of bacteria to dissolved oxygen tension. Fermentation Advances (Perlman, Ed.):117-128.
- 79.- Harrison, D.E.F. 1972. Physiological effects of dissolved oxygen tension and redox potential on growing populations of microorganisms. J. Appl. Chem. Biotech. 22:417-422.
- 80.- Heimpel, A.M. et al. 1959. The Site of Action of Crystalliferous Bacteria in Lepidoptera Larvae. Jour. of Insect Pathol. 1:152-170.
- 81.- Heimpel, A.M. et al. 1960. Microbial Insecticides. Bacteriol. Rev. 24:266-274.
- 82.- Heimpel, A.M. 1976. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other Crystalliferous bacteria. Annals Review Entomology, 12:287-292.
- 83.- Holland, F.A. et al. 1966. Liquid mixing and processing in stirred tanks. Rheinhold.
- 84.- Holmes, D.B. et al. 1964. Fluid flow in turbine-stirred baffled tanks. I.- Circulation Times. Chem. Eng. Sci. 19:201-207.
- 85.- Hooker, B.S. et al. 1990. Cultivation of Plant in a Stirred Vassel: Effect of Impeller Design. Biotechnol. and Bioeng. 35:296-304.
- 86.- Hopte, H. et al. 1989. Insecticidal crystals proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53(2):242-255.
- 87.- Hudcova, V. et al. 1989. Gas-liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers.

Biotechnol. and Bioeng. 34:617-628.

- 88.- Hughmark, G. A. 1980. Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 19:638-641.
- 89.- Ishikawa, H. et al. 1990. Mechanism of fermentation performance of *Zimomonas mobilis* under oxygen supply in batch culture. *Jornal of Fermentation and Bioengineering.* 70(1):34-40
- 90.- Jacobs, R.A. 1991. Design Your Process for Waste Minimization. *Chemical Engineering Progress*, Jun.:55-59.
- 91.- Jarret,P. et al. 1986. Isolates of *Bacillus thuringiensis* Active Against *Mamestra brassicae* and Some Other Species: Alternatives to the Present Commercial Isolate HD-1. *Biol. Agr. and Horticulture.*4:39-45.
- 92.- Jeans, A. et al. 1976. Polysaccharide (xanthan) of *Xantomonas campestris* NRRL B-1459: Procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. Agricultural Research Service, U.S. Department of agriculture.
- 93.- Jensen,A.L. et al. 1966 Scale-Up of antibiotic fermentations by control of oxygen utilization. *Biotechnol. and Bioeng.* 8:525-530.
- 94.- Johnson,M.J. et al. 1964. Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. *Biotechnol. and Bioeng.* 6:457-463.
- 95.- Joshi,J.B. et al. 1982. Mechanically agitated gas-liquid reactors. *Chem. Eng. Sci.*,37:813-817.
- 96.- Jurecic, R. et al. 1984. Mass transfer in aerated fermentation broths in a stirred tank reactor. *Can. J. Chem. Eng.* 62:334-339.
- 97.- Kalfon, A.R. et al. 1985. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against Egyptian Cotton Leaf Worm *Spodoptera littoralis*. *Entomophaga.* 30(2):177-186.
- 98.- Karow,E.O. et al. 1953. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. *Agr. Food Chem.* 1:302-307.
- 99.- Keletti; et al. 1974. Handbook of Micromethods for the Biological Science. Van Nostrand, Reinhold, Toronto.
- 100.- Kempner, W. 1937. effect of oxygen tension on cellular metabolism. *J. Cell. Comp. Physiol.* 10:339-343.

- 101.- Kim, D. et al. 1991. A Hybrid Bioreactor for High Density Cultivation of Plant Cell Suspensions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:726-729.
- 102.- Kim, S.U. et al. 1988. Mathematical Modeling for Mixed Culture Growth of Two Bacterial Populations with Opposite Substrate Preferences. *Biotechnol. and Bioeng.* 31:144-159.
- 103.- Kobayashi, H. et al. 1976. Oxygen transfer into mycelial pellets. *Biotech. and Bioeng.* 15:27-31
- 104.- Kramers, H. et al. 1953. A comparative study on the rate of mixing in stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* 2:35-42.
- 105.- Lacey, L.A. et al. 1978. Some Factors Affecting the Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner Against Blackflies. *Environ. Entomol.* 7:583-588.
- 106.- Lambert, B. et al. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience.* 42 (2):112-121.
- 107.- Lankford, C.E. et al. 1966. Inoculum-Dependent Division Lag of *Bacillus* cultures and Its Relation to an Endogenous Factor(s) ("Schizokinen"). *Jour. of Bacteriol.* 91:1070-1079.
- 108.- Lecadet, M.M. et al. 1971. Biogenesis of the Crystalline Inclusion of *Bacillus thuringiensis* during Sporulation. *Eur. J. Biochem.* 23:282-294.
- 109.- Leng, D.E. 1991. Succeed at Scale Up. *Chemical Engineering Progress.* Jun.:23-31.
- 110.- Lewis, F.B. 1983. Formulation and Application of Microbial Insecticides for Forest Insect Pest Management: Problems and Considerations. In *Pesticide Formulation and Applications Systems: Third Symposium.* ASTM STP 828, T:M: Kaneko and N.B. Akesson, Eds. American Society for Testing and Materials, Philadelphia: 22-31.
- 111.- Linck, V. et al. 1981. Chemical engineering use of catalyzed sulfite oxidation kinetics for the determination of mass transfer characteristic of gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.* 36:1747-68.
- 112.- Lim, T. et al. 1984. Rheology of self-associating concentrated xanthan solution. *Journal of Rheology* 28:367-379.
- 113.- Longmuir, I.S. 1954. Respiration rate of bacteria as a function of oxygen concentration. *Biochem. J.* 57:81-89.

- 114.- López de Figueiredo, M.M. et al. 1979. The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chem. Eng. Sci.* 34:1333-1338.
- 115.- Loucaides, R. et al. 1953. Mass transfer into simulated fermentation media. *Ch. E.S.* 28:2165-2169.
- 116.- Luong, H. T. et al. 1979. Mechanical power requirements of gas-liquid agitated system. *AIChE J.*, 25:893-895.
- 117.- Luthy, P. et al. 1982 *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: Basic considerations and application, in *Microbial and Viral Pesticides*, Kurstak, E., Ed. Marcel Dekker, N.Y.:35.
- 118.- Margaritis, A. et al. 1985. Microbial polysaccharides. In: Moo-Young, M. (Ed.): *Comprehensive Biotechnology*, Vol.3. pp. 1005-1014. Oxford Pergamon Press.
- 119.- McCormick, D. 1988. Play with Purpose: Modeling Biotechnology Processes. *Biotechnology*. 6(8):887-892.
- 120.- Megna, J.C. 1961. Preparation of microbial insecticide, U.S.A. Patent 3073749. Munro, R.E.: Protein turnover and the formation of protein inclusion during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 81:225-232.
- 121.- Medrano-Roldán, H. y Col. 1987. Producción de bioinsecticidas por tres cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* y su uso contra insectos plaga del maíz. *Res. XVIII Congr. Nal. de Microbiol. Acapulco, Gro.*: 92.
- 122.- Medrano-Roldán, H. 1987. Producción de bioinsecticidas por cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* I.-Perspectivas de aplicación a corto plazo. *Res. II Congr. Nal. de Biotechnol. y Bioing. Durango, Dgo.*: 60.
- 123.- Medrano-Roldán, H. et al. 1987. Production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis* C-4 at pilot plant level and its use on insect pest maize. 4th. European Congress on Biotechnology. June 14-19, Amsterdam, the Netherlands.
- 124.- Medrano-Roldán, H. y Col. 1988. Aspectos tecnológicos en la propagación de *Bacillus thuringiensis* para la producción de bioinsecticidas. *Res. XIX Congreso Nacional de Microbiología. Monterrey N.L.*: 75
- 125.- Medrano-Roldán, H. et al. 1989. Some bioengineering aspects of bioinsecticides production and its application against insect pest maize at experimental field level. *Res. Fifth Inter. Confr. on Engineerign and Food. Cologne, Federal Rep. of Germany*: 141.

- 126.- Medrano-Roldán,H. y Col. 1989. Efecto de las condiciones y tipo de secado sobre las características toxicológicas de bioinsecticidas. Res. III Congr. Nal. de Biotecnol. y Bioing. Monterrey,N.L.
- 127.- Medrano-Roldán,H. et al. 1991. Some Bioengineering aspects on the Bioinsecticides Production and its Application against Insect Pest Maize at Experimental Field Level. Engineering and Food (Advanced Processes). Edited by W.E.L. Spiess and H. Schubert. Vol. 3:699-706. Elsevier Applied Science. London and New York.
- 128.- Medrano-Roldán,H. y Col. 1990. La Bioingeniería y la Producción de Insecticidas biológicos. XIII Reunión Nacional de Control Biológico. Colima, Col. México. pág. 1-5.
- 129.- Mesbah,H.A. 1985. Evaluation of the Potency of the Biological Compound Dipel Against the Spiny Bollworm *Earias insulana*( Boisd ). Agric. Sc. Camb.105:587-589.
- 130.- Metha, V.D. et al. 1971. Mass transfer in mechanically agitated gas-liquid contactors. Chem. Eng. Sci.,26:461-79.
- 131.- Metzner,A.B. et al. 1960. Flow patterns in agitated vessels. A. I.Ch.E.J. 6:109-115.
- 132.- Michel,B.J. et al. 1962. Power requirements of Gas-Liquid Systems. A.I.Ch.E.J. 8:262-268.
- 133.- Michel Jr.F.C. et al. 1990. Development of a Stirred Tank Reactor System for the Production of Lignin Peroxidases (Ligninases ) by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. Jour. of Ind. Microbiol. 5:103-112.
- 134.- Miller, J.F. et al. 1988. High-Pressure-Temperature Bioreactor for Studying Pressure-Temperature Relationships in Bacterial Growth and Productivity. Biotechnol. and Bioeng. 31:407-413.
- 135.- Moar, W.J. et al. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of Individual P1 Protoxins and Sporulated Cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Appl. and Environ. Microbiol. 56 ( 8 ): 2480-2483.
- 136.- Montgomery, G.J. 1991. Optimize Process Design via A\* Search. Chem. Eng. Progr. Jun.:70-76.
- 137.- Moo-Young,M. et al. 1981. Design of biochemical reactors: Mass transfer criteria for simple and complex system. In Adv. in Biochem. Eng. Vol. 19 (Fiechter, A., ed.), Springer-Verlag, Berlin:1-68.
- 138.- Moo-Young,M. 1986. Biochemical Engineering and Industrial Biotechnology. Chem. Eng. Education: 194-197.

- 139.- Moresi, M. 1981. Optimal design of airlift fermenters. *Biotechnol. Bioeng.*, 23:2537-60.
- 140.- Nagata, S. 1975. *Mixing. Principles and Applications.* Kodansha Ltd. Tokyo. John Wiley and Sons.
- 141.- Nicolas, L. et al. 1987. Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. *Medical and Veterinary Entomol.* 1:157-162.
- 142.- Nienow, A.W. et al. 1979. Power drawn by multiple impellers in sparged agitated vessels. *Biotechnol. and Bioeng.* 21:2341-5.
- 143.- Nienow, A.W. 1984. Mixing studies on high viscosity fermentation processes xanthan gums. In: *The World Biotech. Report. Vol. 1 (Europe)*:293-304. London: Online Pub.
- 144.- Nienow, A.W. et al. 1989. The development of strain gauging for power measurement in stirred bioreactors: philosophy and some initial results. In: *Int. Workshop on bioreactor performance, DGBPT, Granz, Austria*, pp. 164-165.
- 145.- Norwood, K.W. et al. 1960 Flow patterns and mixing rates in agitated vessels. *A.I.Ch.E.J.* 6:432.
- 146.- Ohba, M. et al. 1981. Two New Subspecies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (Serotype 18) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* (Serotype 19). *Jour. of Invertebrate Pathology.* 42:20-24.
- 147.- Ohba, M. et al. 1986. Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soils of Japan. *Jour. of Invertebrate Pathology* 47:12-20.
- 148.- Oldshue, J.Y. 1966. Fermentation Mixing Scale-Up Techniques. *Biotechnol. and Bioeng.* 8:3-24.
- 149.- Oldshue, J.Y. 1983. Fluid mixing technology and practice. *Chem. Eng.*, 90:83-108.
- 150.- Ordux, S. et al. 1992. A New Serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia Toxic to Mosquito Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology.* 59:99-103.
- 151.- Pendleton, I.R. 1969. Insecticides of Crystal-forming Bacteria. *Process Biochemistry.* 29:32.
- 152.- Persson, I. et al. 1991. Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. *Process Biochemistry.* 26:65-74.

- 153.- Phillips, D.H. et al. 1961. Aeration in fermentations. J. Biochem. and Microbiol. Technol. and Eng. 3,3:277.
- 154.- Phillips, D.H. 1966. Oxygen transfer into mycelial pellets. Biotechnol. and Bioeng. 8:456- 461.
- 155.- Phoramond, J.C. et al. 1975. Determination de la puissance consommee dans une cuve aeree et agitee. Chem. Engng Sci., 30:907-12.
- 156.- Picque O. et al. 1988. New Instrument for On-Line Viscosity Measurement of Fermentation Media. Biotechnol. and Bioeng. 31:19-23.
- 157.- Prasad,S.S.S.V. et al. 1976. Biochemistry and Biological Activities of the Proteinaceous Crystal of *Bacillus thuringiensis*. J. Scient. Ind. Res. 35:626-632.
- 158.- Prochazka,J. et al. 1961. Studies on Mixing. XII.- Homogenation of Miscible Liquids in the Turbulent Region. Coll. Czech. Chem. Comm. 26:2961-2968.
- 159.- Rao,M.A. et al. 1972. Continuous flow stirred tank turbulence parameters in the impeller stream. Chem. Eng.Sci. 27: 137-143.
- 160.- Resendiz, R., et al. 1990. A new pneumatic bearing dynamometer for power-input measurement in stirred tanks.Chem. Eng. Technol.87-94.
- 161.- Richards,J.W. 1961. Studies in aeration and agitation. Progr. In Ind. Microbiol. 3:141-155.
- 162.- Richards,J.W. 1963. Power input to fermenters and similar vessels. Brit. Chem. Eng. 8:158-63.
- 163.- Roberts, G.M. 1991. Spreading of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* over the water surface by a monolayer carrier.World Jour. of Microbiol. and Biotechnol.7:335-342.
- 164.- Roels,J.A. et al. 1974. The rheology of mycelial broths. Biotechnol. and Bioeng. 16:181-187.
- 165.- Rollins, M.J. et al. 1989. Regulation of antibiotic production by iron and oxygen during defined medium fermentations of *Streptomyces clavuligerus*.Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:390-396.
- 166.- Rushton,J.H. et al. 1950. Power characteristics of Mixing Impellers. Part I. Chem. Eng. Progress. 46:395-407.
- 167.- Rushton,J.H. et al. 1950. Power characteristics of Mixing Impellers. Part. II. Chem.

Eng. Progress. 46:467-476.

- 168.- Ruzman, R.N. et al. 1991. Dynamic Mixers Turn More to Reinforced Plastics. Chem. Eng. Progr. Jun.:39-44.
- 169.- Sachs, J.P. et al. 1954. Discharge flow from turbine-type mixing impellers. Chem. Eng. Progr. 50:597-605.
- 170.- Sandford, P.A. et al. 1977. Variation in *Xantomonas campestris* NRRL B-1459: Characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: Sandford, P.A.; Laskin, A. (Eds.): Extracellular microbial polysaccharides, pp.192-210, Washington: American Chemical Society.
- 171.- Sato, K. 1961. Rheological studies on some fermentation broths. J. Ferm. Technol. 39:347-355.
- 172.- Sheeley, M.L. 1932. Glycerol Viscosity Tables. Ind. and Eng. Chem. 24:1060-1069.
- 173.- Sherman, P. 1970. Industrial Rheology. Academic Press.
- 174.- Shiang, M. et al. 1991. Cellulase Production by *Acidothermus cellulolyticus*: Growth on Solka Floc Cellulose and Simple Sugar Mixtures. Biotechnol. and Appl. Biochem. 14:30- 40.
- 175.- Siegel, M. H., et al. 1988. Mass Transfer in a Rectangular Air-Lift Reactor: Effects of Geometry and Gas Recirculation. Biotechnol. and Bioeng. 32:1128-1137.
- 176.- Skelland, A.H.P. 1967. Non-Newtonian flow and heat transfer. John Wiley.
- 177.- Smith, I.H. et al. 1982. Recovery of microbial polysaccharides J. Chem. Technol. Biotechnol. 32:119-129.
- 178.- Smith, R.A. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Can.J. Microbiol. 28:1089-1092.
- 179.- Sokól, W. 1988. Dynamics of Continuous Stirred-Tank Biochemical Reactor Utilizing Inhibitory Substrate. Biotechnol. and Bioeng. 31:198-202.
- 180.- Solomons, G.L. 1969. Materials and Methods in Fermentation. Academic Press.
- 181.- Solomons, J. 1980. Mixing, aeration and rheology of highly viscous fluids. PhD-Thesis. University of London. England.
- 182.- Solomons, J. et al. 1981. Cavern sizes in agitated fluids with a yield stress. Chem. Eng.

Commun. 11:143-164.

- 183.- Tako, M. et al. 1984. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. Agric. Biol. Chem. 48:2987-2993.
- 184.- Tako, M. et al. 1987. Rheological properties of salt of xanthan in aqueous media. Agric. Biol. Chem. 51:2919-2923.
- 185.- Taguchi, H. et al. 1968. Scale-Up of glucoamylase fermentation by *Encomyces* sp. J. Ferm. Technol. 46:823-831.
- 186.- Taguchi, H. 1971. The nature of fermentation fluids. Advances in Biochem. Eng. ( Ghose and Fietcher, Springer- Verlag ) : 1-30.
- 187.- Tatterson, G.B. et al. 1991. Move Mixing Technology Into the 21st Century. Chem. Eng. Progr. Jun.:45-48.
- 188.- Thompson, N. 1980. Ollis, D.F., Extracellular microbial polysaccharides II. Evolution of broth power parameters for xanthan and pullulan batch fermentations. Biotechnol. and Bioeng. 12:875-883.
- 189.- Trofimenkov, N. et al. 1991. Propiedades Fisiológicas, Bioquímicas e Insecticidas del *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Instituto de Investigaciones Científicas de Biotecnología de la URSS. Moscú 117246. CDU 663.143.033:26-32
- 190.- Torrestiana, B. 1984. Aspectos de la producción de goma xantana, un enfoque integral. Tesis Maestría Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 191.- Turner, J.T. et al. 1991. Stability of the  $\delta$ -Endotoxin Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a Recombinant Strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. Applied and Environmental Microbiology. Dec. pp. 3522-3528.
- 192.- Van de Vusse, J.G. 1962. A new model for the stirred-tank reactor. Chem. Eng. Sci. 17:507-513.
- 193.- Valenzuela, L.E. 1987. Microorganismos Entomopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- 194.- Vramek, M. et al. 1990. Measurement of the power for system of radial turbine impellers in nonstandard vessels. Int.Chem.Eng. 30(3):562-567.
- 195.- Wakisaka, Y. et al. 1982. Asporogenous *Bacillus thuringiensis* Mutant Producing High Yields of  $\delta$ -Endotoxin. Appl. and Environ. Microbiol. 43(6): 1498-1500.

- 196.- Wang,D.I.C. et al. 1968. Developments in agitation and aeration of fermentation systems. *Progress in Ind. Microbiol.* 8:1-12.
- 197.- Wecker, A. et al. 1991. Influence of Dissolved Oxygen Concentration and Shear Rate on the Production of Pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters.* 13 (3):155-160.
- 198.- Weissman, J.C. et al. 1988. Photobioreactor Design: Mixing, Carbon Utilization, and Oxygen Accumulation. *Biotechnol. and Bioeng.* 31:336-344.
- 199.- Westerterp, K.R. et al. 1963. Interfacial areas in agitated gas-liquid contactors. *Chem. Eng.Science.*18:157-76.
- 200.- Whitcomb, P.J. et al. 1977. Rheology of xanthan gum solutions. In:Sandford, P.A.; Laskin, A.(Eds.)*Extracellular microbial polysaccharides*, pp. 161-173. Washington: American Chemical Society.
- 201.- Yano,T. et al. 1961. Fundamentals studies on the aerobic fermentantion. VIII.- Oxygen transfer within a mold pellet. *Agr. Biol. Chem.* 25:580-586.
- 202.- Yano,T. et al. 1991. Fed-Batch Culture with a Modified DO- Stat Method. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*71(1):35-38.
- 203.- Zeppenfield, R. et al. 1988. A new fluid dynamic model for mixing of Newtonian power-law liquids in the transient regime. *A.I.Ch.E.J.* 11:162-170.
- 204.- Zlokarnik, M. Sorption characteristics for gas-liquid contacting in mixing vessels. In *advances in Biochemical Engineering*. Vol. 8 ( Ghose, T.K., Fiechter, A. & Blakebrough, N. (Eds.),Springer-Verlag Berlin:133-155.

---

**Tabla 1. Parámetros físicos independientes del sistema de fermentación**

---

- Mezclado del medio de cultivo
  - Capacidad de dispersión de aire
  - Transferencia de calor
  - Dinámica del fluido alrededor de los impulsores
  - Consumo de energía
  - Coeficiente de transferencia de oxígeno
- 

---

**Tabla 2. Parámetros biológicos dependientes del sistema de fermentación**

---

Parámetros específicos del sistema:

- Crecimiento y secreción del producto
- Daño a los microorganismos
- Cambios morfológicos
- Velocidades de transferencia de  $O_2$  and  $CO_2$

Parámetros que podrían ser dependientes de las condiciones de mezclado

1. Calidad de homogeneización
    - Toxicidad por oxígeno
    - Falta de oxígeno
    - Concentración de  $CO_2$
    - Variación de pH
    - Variación en la concentración de nutrientes
  2. Daños por esfuerzo cortante
-

**Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C- 4 a escala de planta piloto**

Componente	Concentración
Melaza de caña de azúcar	20 g/l
Harina de soya	20 g/l
Líquido de remojo de maíz	30 g/l
Carbonato de calcio	0.1 g/l
Agua de la llave	1000 ml
pH	7.0

**Tabla 4. Efecto de la velocidad de agitación en la cinética microbiana de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C- 4 en planta piloto**

Velocidad Agitación (RPM)	X (gBM/LMC)	Y(x/s) (gBM/gS)	$\mu$ (HR-1)	Na (gO <sub>2</sub> /LMCxHR)	Q <sub>O2</sub> (gO <sub>2</sub> /gBMxHR)	K <sub>LA</sub> (HR-1)	Hp / 1000 LMC
200	2.7	0.45	0.20	0.54	0.21	179	0.015
300	2.7	0.45	0.20	0.56	0.22	156	0.015
400	2.7	0.45	0.25	0.60	0.24	199	0.016
500	2.8	0.48	0.25	0.65	0.26	216	0.017
600	2.8	0.48	0.30	0.65	0.27	226	0.019
700	3.0	0.50	0.30	0.70	0.28	233	0.019
800	3.0	0.50	0.30	0.70	0.29	235	0.019

**Tabla 5. Efecto de la velocidad de agitación en la esporulación, tiempo de proceso y el número de esporas durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C- 4 en planta piloto.**

Velocidad de agitación (RPM)	X (gBM/LMC)	Na (gO <sub>2</sub> /LMCxhr)	T <sub>s</sub> (HR)	T <sub>p</sub> (HR)	SN (No. esporas/ml)
200	2.7	0.54	12	40	42x10 <sup>7</sup>
300	2.7	0.56	12	40	47x10 <sup>7</sup>
400	2.7	0.60	12	38	51x10 <sup>7</sup>
500	2.8	0.65	10	38	56x10 <sup>7</sup>
600	2.8	0.68	8	34	58x10 <sup>7</sup>
700	3.0	0.70	8	30	65x10 <sup>7</sup>
800	3.0	0.70	8	32	62x10 <sup>7</sup>

**Tabla 6. Efecto de la velocidad de aeración en la cinetica microbiana de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 a nivel de planta piloto**

Velocidad de aeración (VVM)	X (gBM/LMC)	Y(x/s) (gBM/gS)	$\mu$ (HR <sup>-1</sup> )	Na (gO <sub>2</sub> /gBMxHR)	QO <sub>2</sub> (gO <sub>2</sub> /gBMxHR)	K <sub>LA</sub> (HR <sup>-1</sup> )	Hp/1000LMC
0.50	2.15	0.35	0.22	0.50	0.23	170	0.021
1.0	3.0	0.5	0.3	0.70	0.28	233	0.019
1.50	3.45	0.57	0.31	0.80	0.34	368	0.016
2.0	3.50	0.58	0.33	0.81	0.33	275	0.014

**Tabla 7. Efecto de la velocidad de aereación en la esporulación, el tiempo de proceso y el número de esporas durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 a nivel de planta piloto**

Velocidad de aereación (VVM)	X (gBM/LMC)	Na (gO <sub>2</sub> /LMCx HR)	Ts (HR)	Tp (HR)	SN (Esporas/ml)
0.5	2.15	0.50	10	36	58x10 <sup>7</sup>
1.0	3.00	0.70	8	30	65x10 <sup>7</sup>
1.5	3.45	0.80	8	32	85x10 <sup>7</sup>
2.0	3.5	0.81	8	32	90x10 <sup>7</sup>

**Tabla 8. Parámetros reológicos de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4 después de la fase exponencial de crecimiento.**

<b>Tiempo después de la fase exponencial (HR)</b>	<b>Índice de consistencia de flujo (m) (gm/ cm x seg<sup>1-n</sup>)</b>	<b>Índice de comportamiento de flujo</b>	<b>Viscosidad aparente (pseudopoises)</b>
<b>5</b>	<b>4.1</b>	<b>0.10</b>	<b>0.9</b>
<b>10</b>	<b>3.8</b>	<b>0.14</b>	<b>1.02</b>
<b>15</b>	<b>3.5</b>	<b>0.21</b>	<b>1.26</b>
<b>20</b>	<b>3.6</b>	<b>0.26</b>	<b>1.60</b>
<b>25</b>	<b>3.6</b>	<b>0.28</b>	<b>1.74</b>

**Tabla 9. Comparación de las propiedades reológicas del medio de propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoesis* C-4 medidas *in situ* e *in vitro*.**

Concentración de biomasa (gBM /LMC)	Indice de consistencia de flujo (gm/cm x seg <sup>1-n</sup> )		Indice de comportamiento de flujo		Viscosidad aparente (pseudopoises)	
	<i>in vitro</i> <sup>a</sup>	<i>in situ</i> <sup>b</sup>	<i>in vitro</i> <sup>a</sup>	<i>in situ</i> <sup>b</sup>	<i>in vitro</i> <sup>a</sup>	<i>in situ</i> <sup>b</sup>
<b>2.0</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>0.90</b>	<b>0.60</b>	<b>0.43</b>	<b>1.80</b>
<b>5.0</b>	<b>3.5</b>	<b>45</b>	<b>0.70</b>	<b>0.40</b>	<b>0.68</b>	<b>1.70</b>
<b>8.0</b>	<b>4.5</b>	<b>62</b>	<b>0.65</b>	<b>0.30</b>	<b>0.77</b>	<b>1.60</b>

a) Determinado con el viscosímetro Brookfield en muestras sin aire

b) Determinado por medio del consumo de potencia de agitación

**Tabla 10. Tiempo de mezclado representativos en la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoesis C-4***

<b>Tipo de impulsor Diam x Altura Paleta ( cm)</b>	<b>Velocidad de agitación (RPM)</b>	<b>Tiempo de mezclado (seg)</b>
	<b>500</b>	<b>12</b>
<b>Turbina I (Rushton) 7.0 x 1.0</b>	<b>700</b>	<b>10</b>
	<b>500</b>	<b>9</b>
<b>Turbina II (Rushton) 10 x 2.0</b>	<b>700</b>	<b>7</b>

**Tabla 11. Escalamiento de un proceso para la producción de bioinsecticidas empleando como criterio el tiempo de mezclado en el reactor**

<b>Parámetro</b>	<b>P.P. lab</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Vol del Reactor (l)</b>	<b>20</b>	<b>1000</b>	<b>10,000</b>	<b>10,000</b>
<b>Diámetro del Reactor (cm)</b>	<b>22</b>	<b>119</b>	<b>223</b>	<b>223</b>
<b>Diámetro del Impulsor (cm)</b>	<b>10</b>	<b>58</b>	<b>109</b>	<b>151</b>
<b>Velocidad de Agitación (seg<sup>-1</sup>)</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>1.5</b>	<b>3.7</b>
<b>Número de Reynolds a,b</b>	<b>385</b>	<b>1600</b>	<b>7700</b>	<b>10580</b>
<b>Número de Mezclado</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>26</b>	<b>24</b>

a) Suponiendo  $\rho = 1.0$

b) Suponiendo  $\mu_a = 2 \text{ g / cm x seg}$

**Tabla 12. Relación entre la velocidad de agitación, la velocidad específica de consumo de oxígeno y la productividad de cristales en la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis* C- 4.**

<b>Agitación (RPM)</b>	<b>X (gBM/LMC)</b>	<b>Productividad Cristales/mlx HR</b>	<b>Cristales/ml</b>	<b>QO<sub>2</sub> (gO<sub>2</sub>/gBM x HR)</b>
100	2.8	2.68 x 10 <sup>7</sup>	86 x 10 <sup>7</sup>	0.21
300	3.5	3.37 x 10 <sup>7</sup>	108 x 10 <sup>7</sup>	0.24
500	4.2	4.06 x 10 <sup>7</sup>	130 x 10 <sup>7</sup>	0.26
600	6.5	6.28 x 10 <sup>7</sup>	201 x 10 <sup>7</sup>	0.26
700	8.3	8.03 x 10 <sup>7</sup>	257 x 10 <sup>7</sup>	0.28

**Datos de operación:**

\* Y x/s = 0.50 gBM / gS; Impulsor: turbina II

Melaza de caña de azúcar = 20 g/LMC (45% de A.R.)

Aeración: 0.5 VVM

**Tabla 13. Pruebas experimentales a nivel de campo para combatir el gusano Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) empleando el bioinsecticida producido por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4**

Aplicación	BLOQUES					Total	Promedio
	I	II	III	IV	V		
1. Bioinsecticida C-4 ( 1 kg/ha)	1% 170	1% 163	2% 180	0% 199	2% 210	6 852	1.2%* 170**
2. Dipel (1 kg/ha)	8% 210	9% 190	4% 202	10% 226	6% 180	37 1008	7.46%* 201**
3. Carbaryl P.H. 80 1.5 Kg/Ha	5% 141	8% 196	10% 190	8% 231	4% 170	35 928	7%* 185**
4. Patron	45% 182	35% 228	60% 220	28% 131	55% 127	223 888	44.6%* 177**

\* Porcentaje de infestación

\*\* Número de plantas: Se conservó constante en toda la evaluación

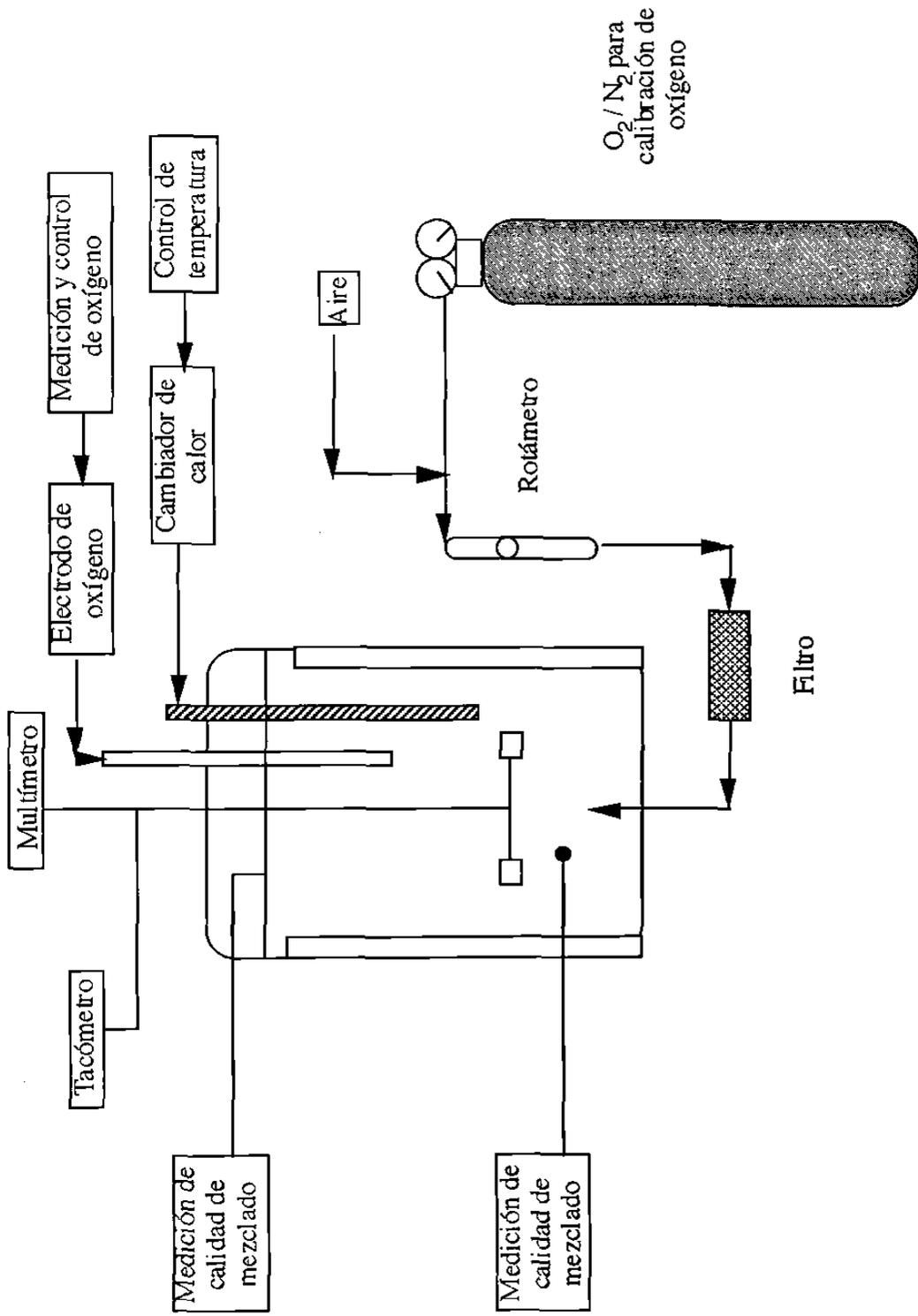


Figura 1. Diagrama esquemático del equipo de fermentación empleado

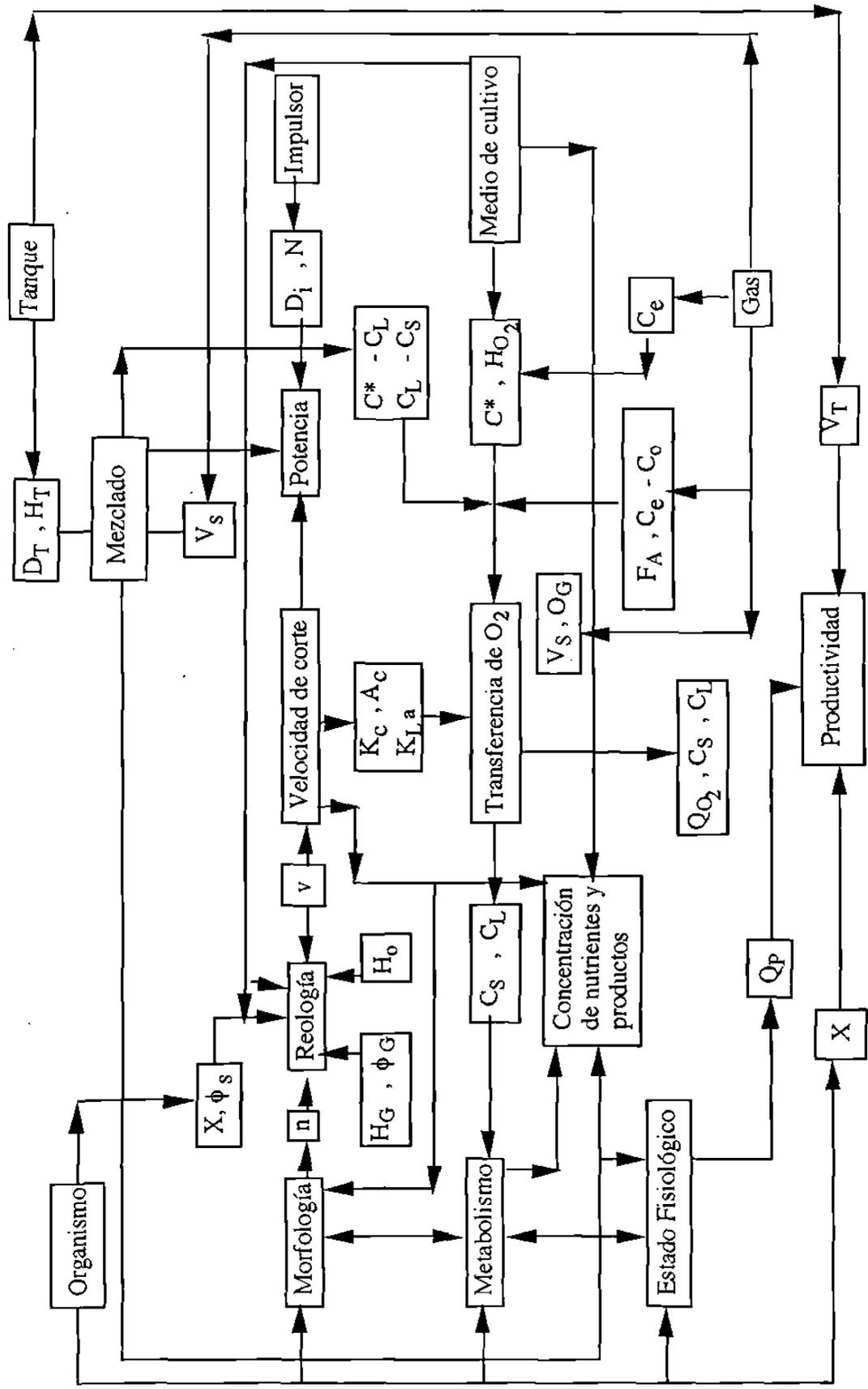


Figura 2. Parámetros físicos relacionados con la cinética microbiana

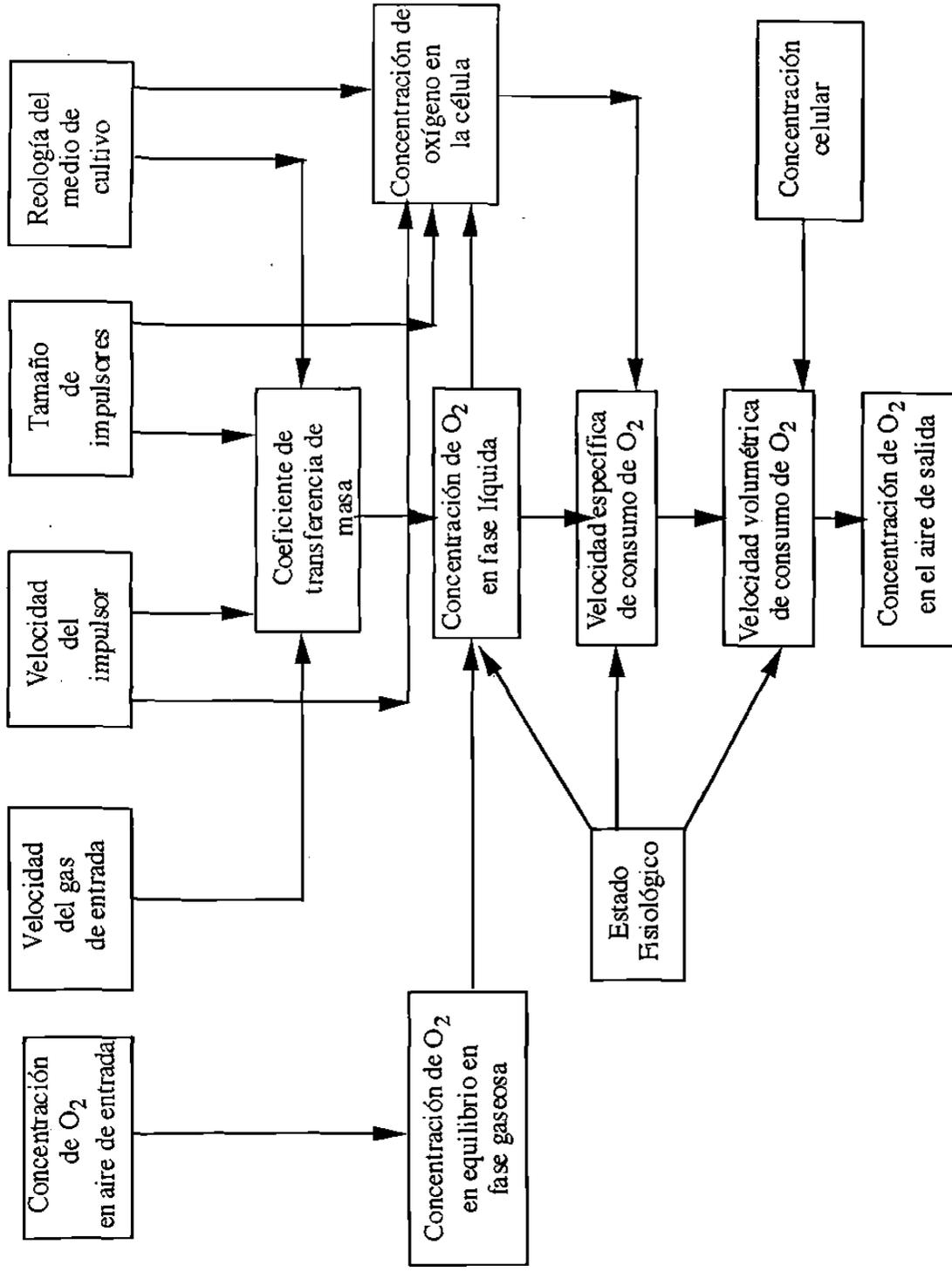


Figura 3. Variables que influyen en la velocidad de consumo de oxígeno en la propagación de *Bacillus thuringiensis*.

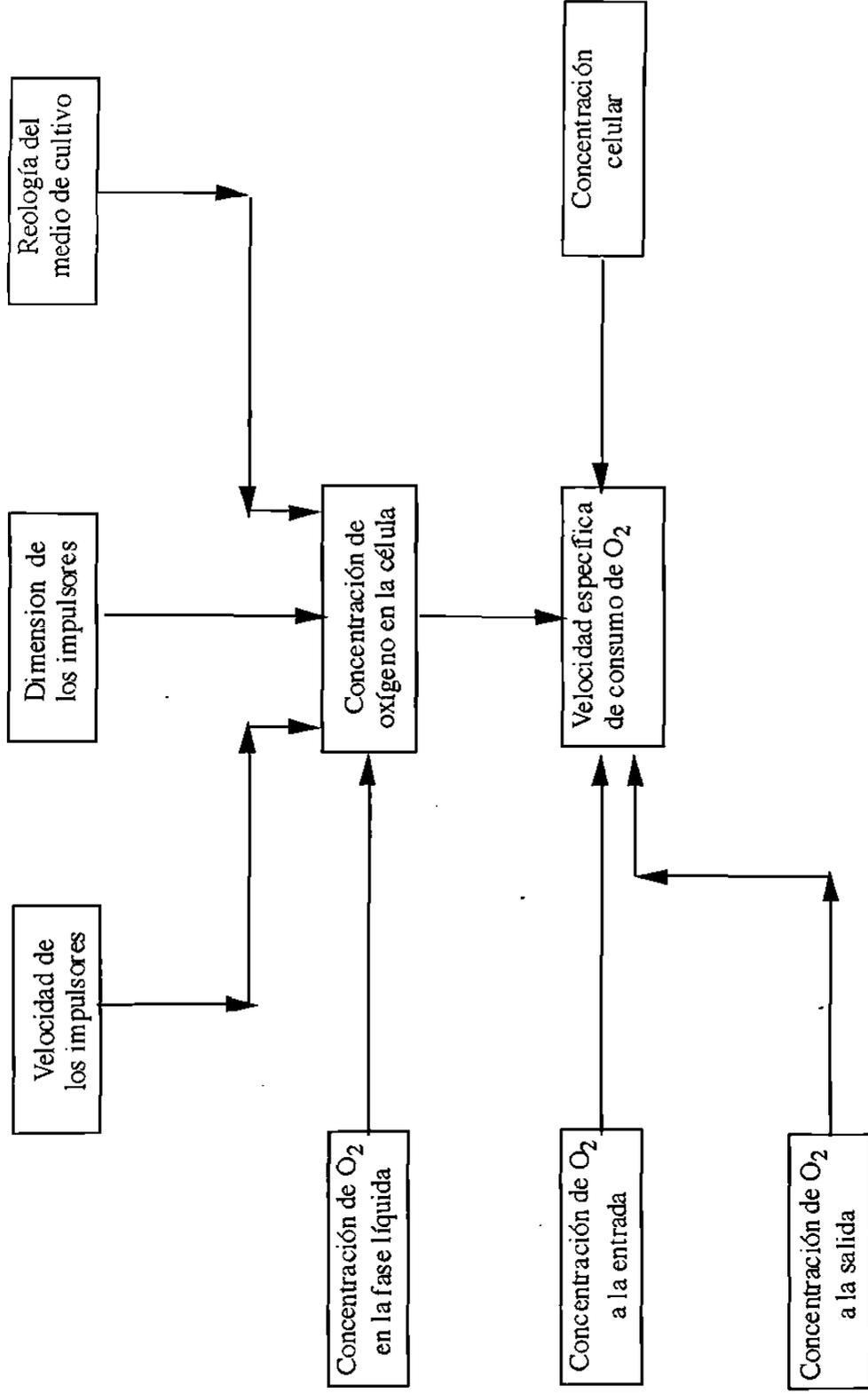
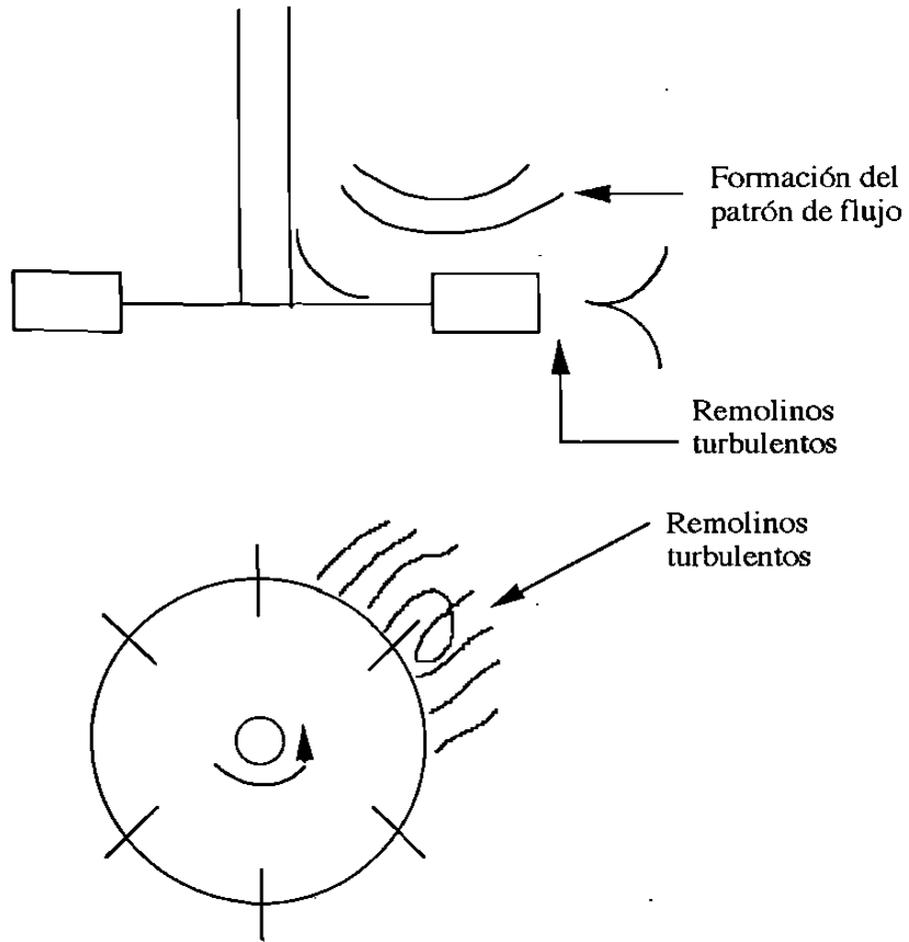


Figura 4. Variables presentes en el consumo de oxígeno en la propagación de *Bacillus thuringiensis*



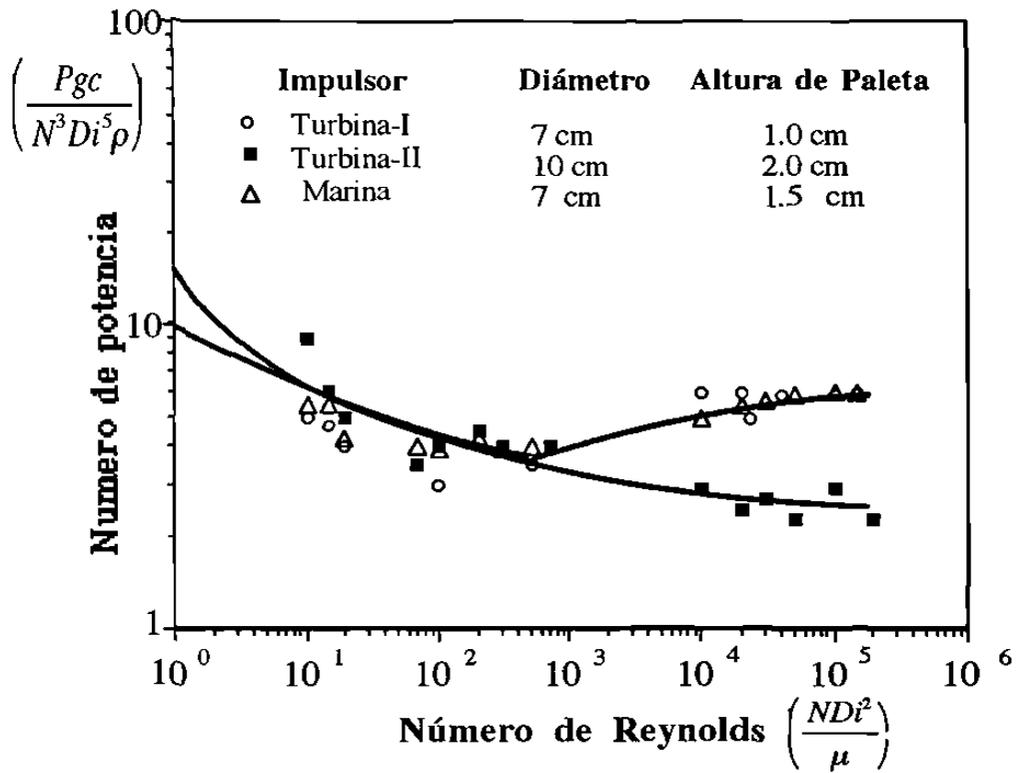
$$\text{Esfuerzo cortante en impulsor} \propto N^2 D_i^2 h \rho$$

$$\text{Flujo en impulsor} \propto N D_i^3 h$$

$$\frac{\text{Esfuerzo cortante}}{\text{Flujo}} \propto \frac{N^2 D_i^2 h \rho}{N D_i^3 h} \propto \frac{N}{D_i}$$

$$C_c^* = f(\text{Esfuerzo cortante/ flujo}) = f(N/D_i)$$

**Figura 5. Representación esquemática del esfuerzo cortante en un reactor biológico. Influencia del impulsor sobre la concentración crítica de oxígeno disuelto.**



**Figura 6. Relación entre el Número de Potencia ( $N_p$ ) y el Número de Reynolds ( $N_{RE}$ ) en diferentes tipos de impulsores**

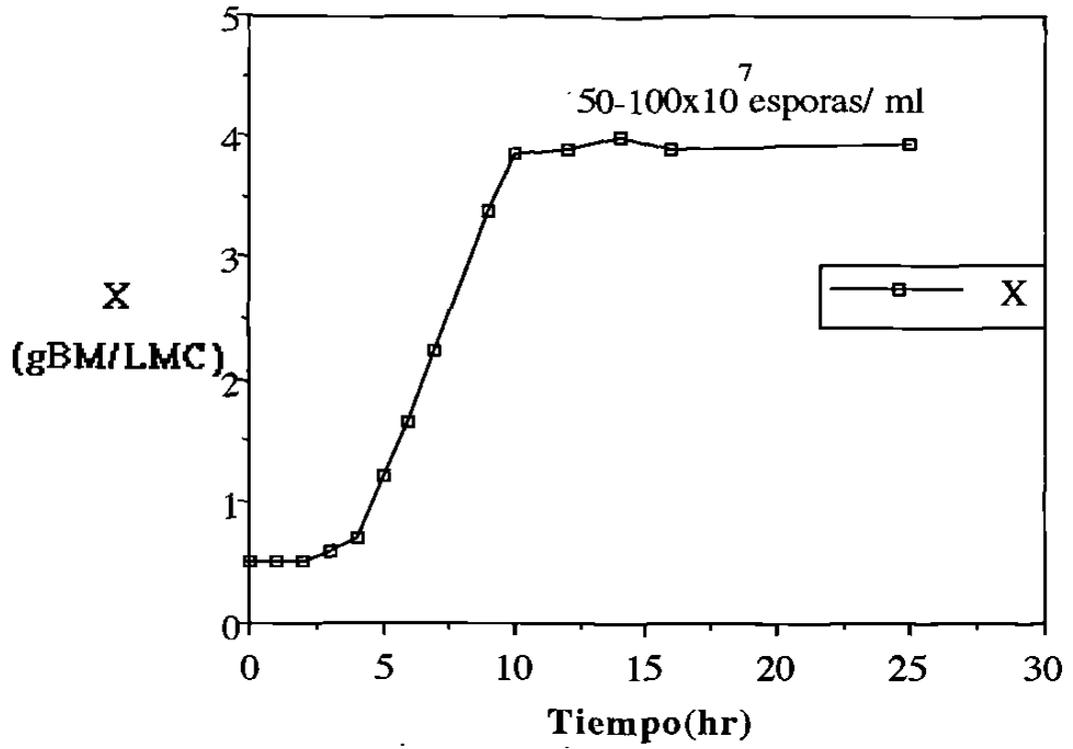


Figura 7. Curva de crecimiento típica de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C - 4

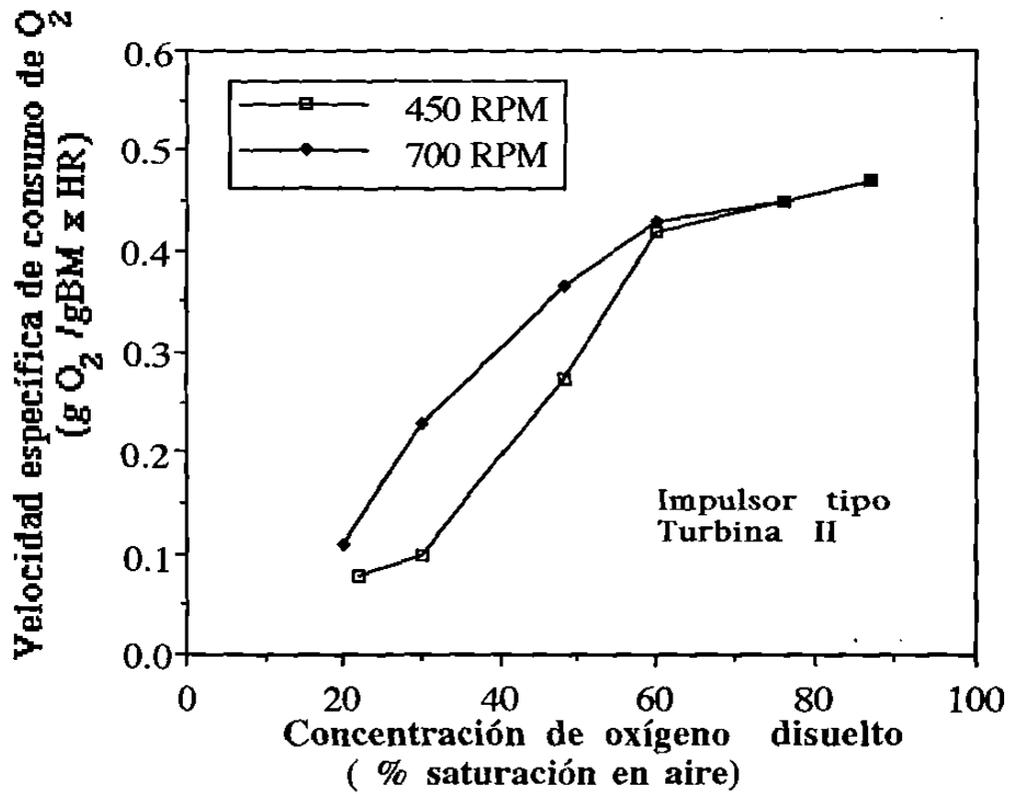


Figura 8. Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno por *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4.

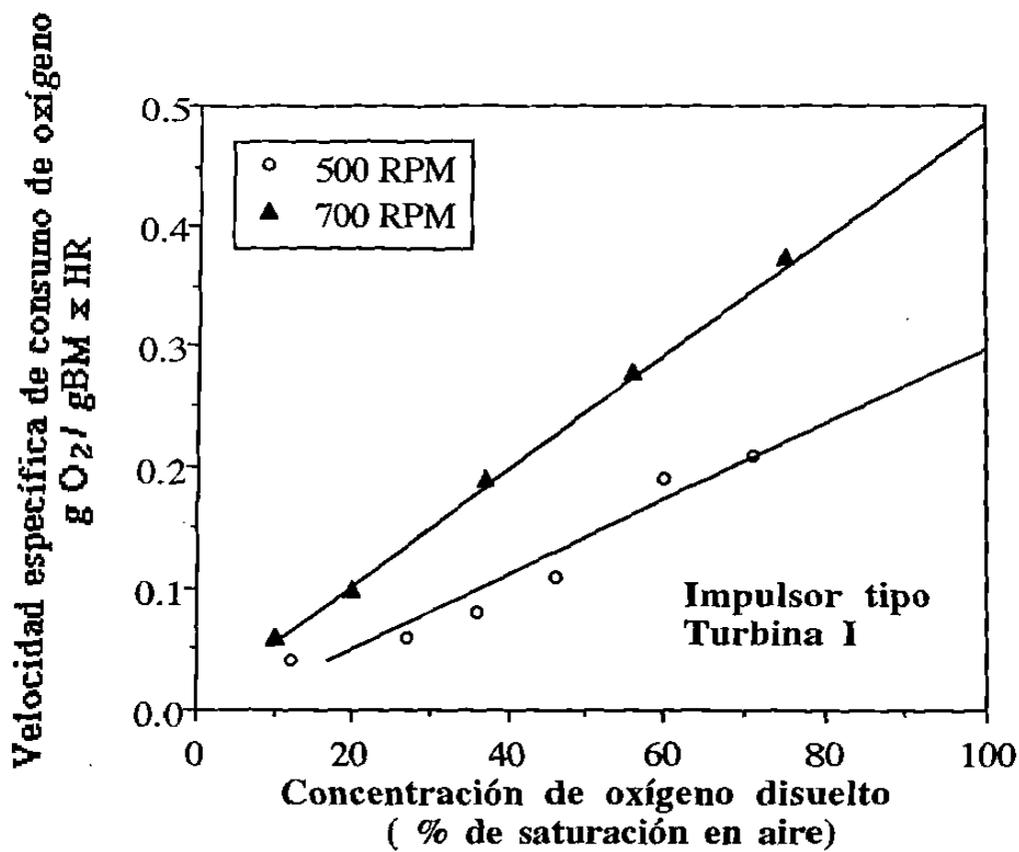
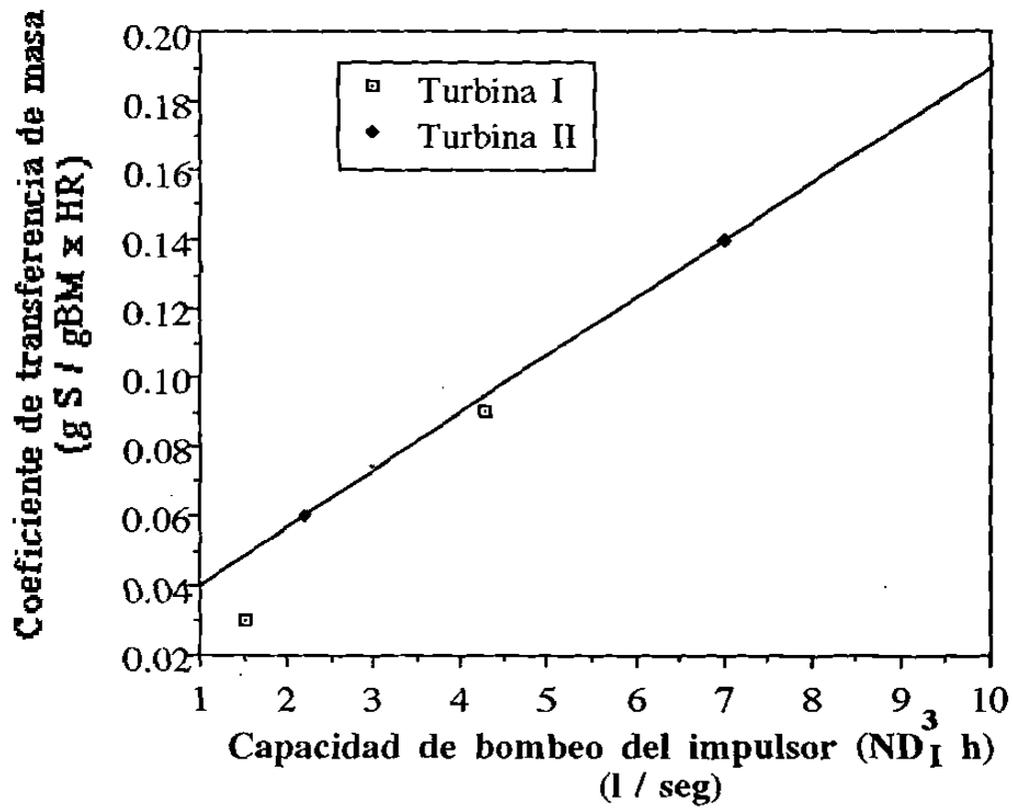


Figura 9. Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno por *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis* C-4



**Figura 10. Efecto de la capacidad de bombeo del impulsor sobre el coeficiente de transferencia de masa líquido-sólido**

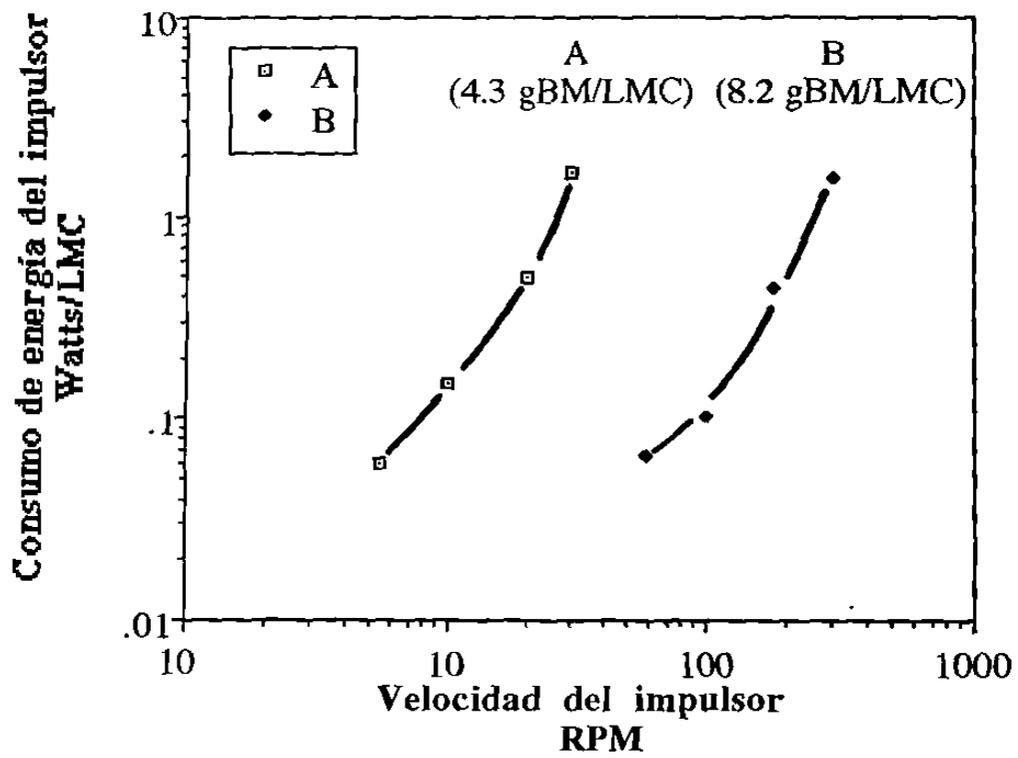


Figura 11. Consumo de energía contra velocidad del impulsor en la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

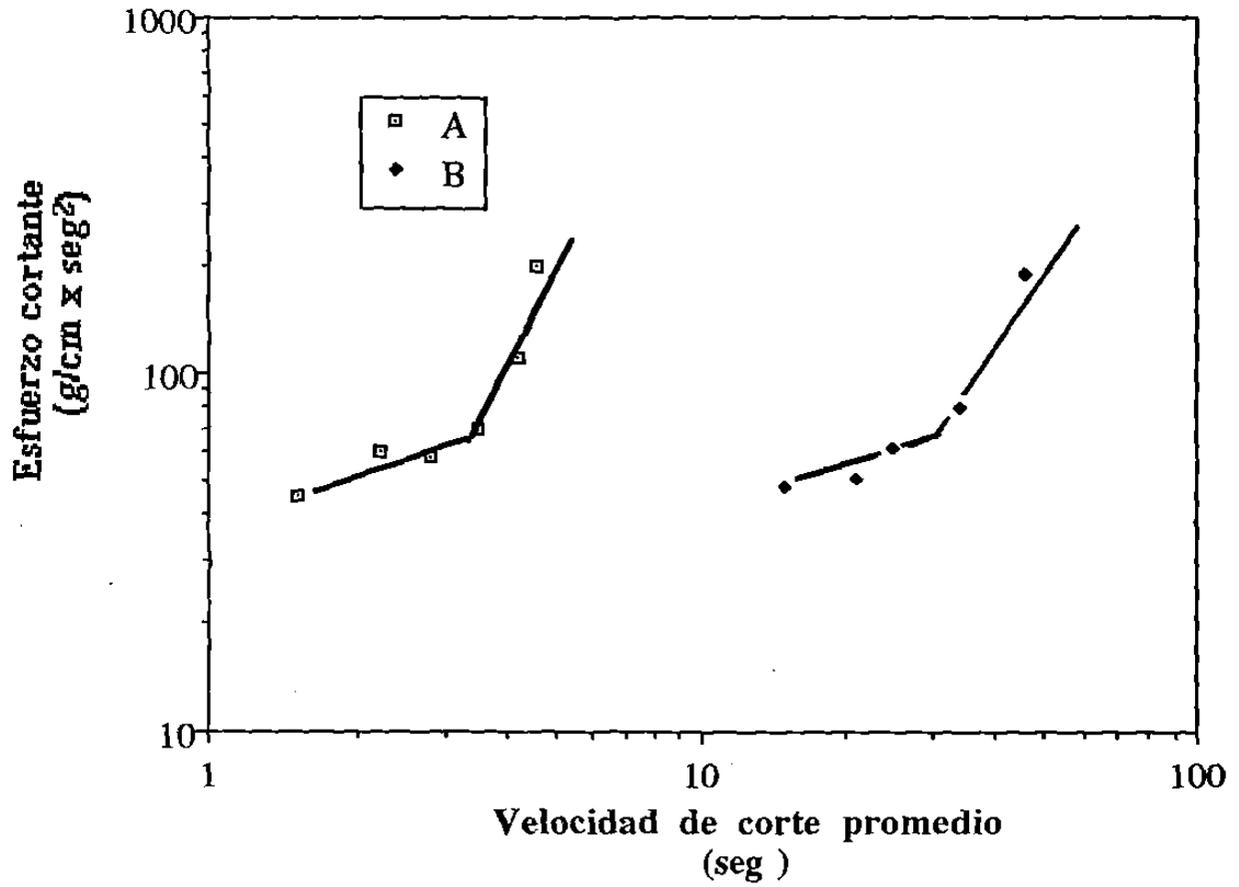


Figura 12. Esfuerzo cortante contra velocidad de corte del medio de cultivo durante la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

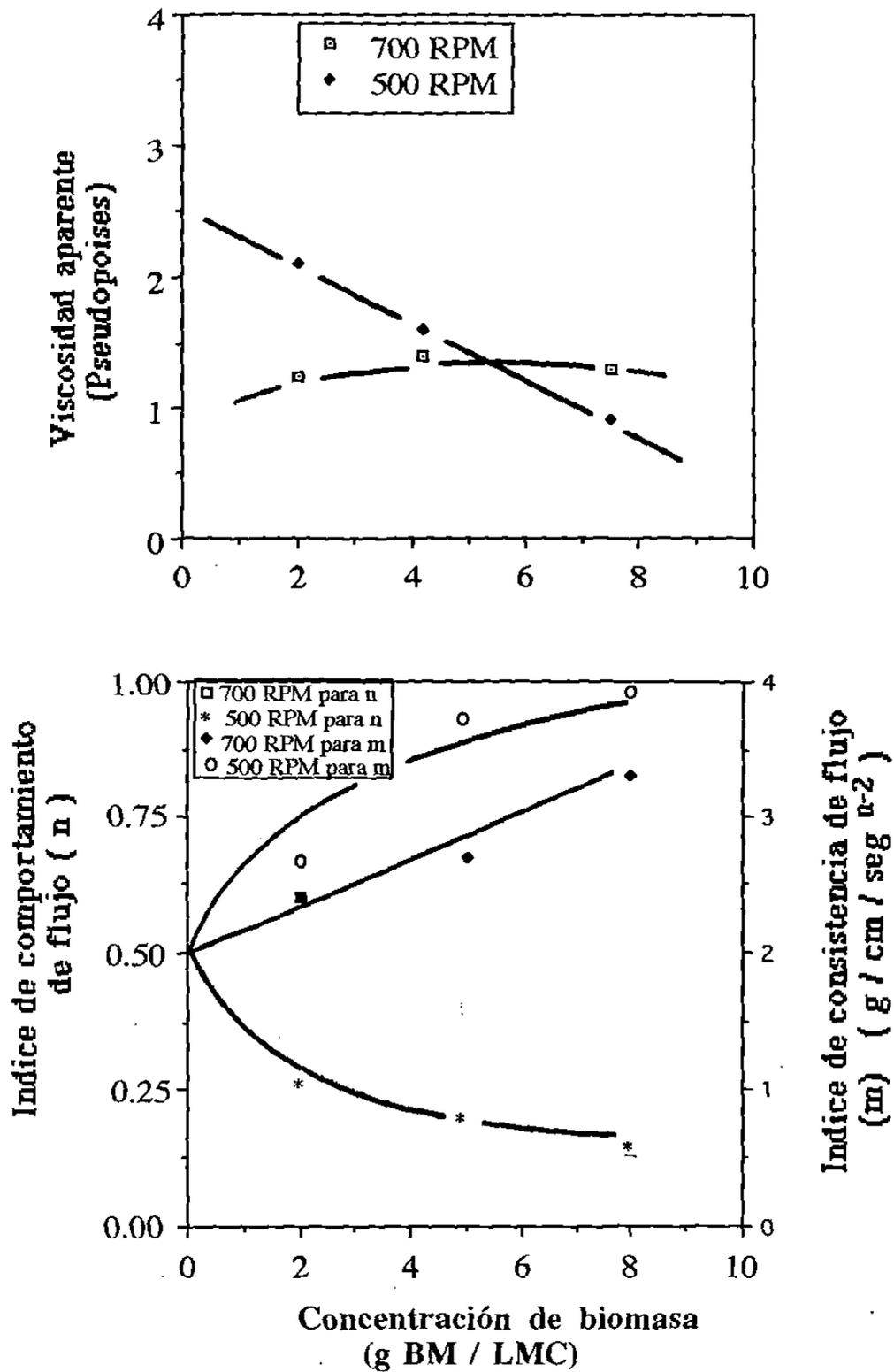


Figura 13. Reología aparente del medio de cultivo en la propagación de *Bacillus thuriangiensis* var. *kumamotoensis* C-4

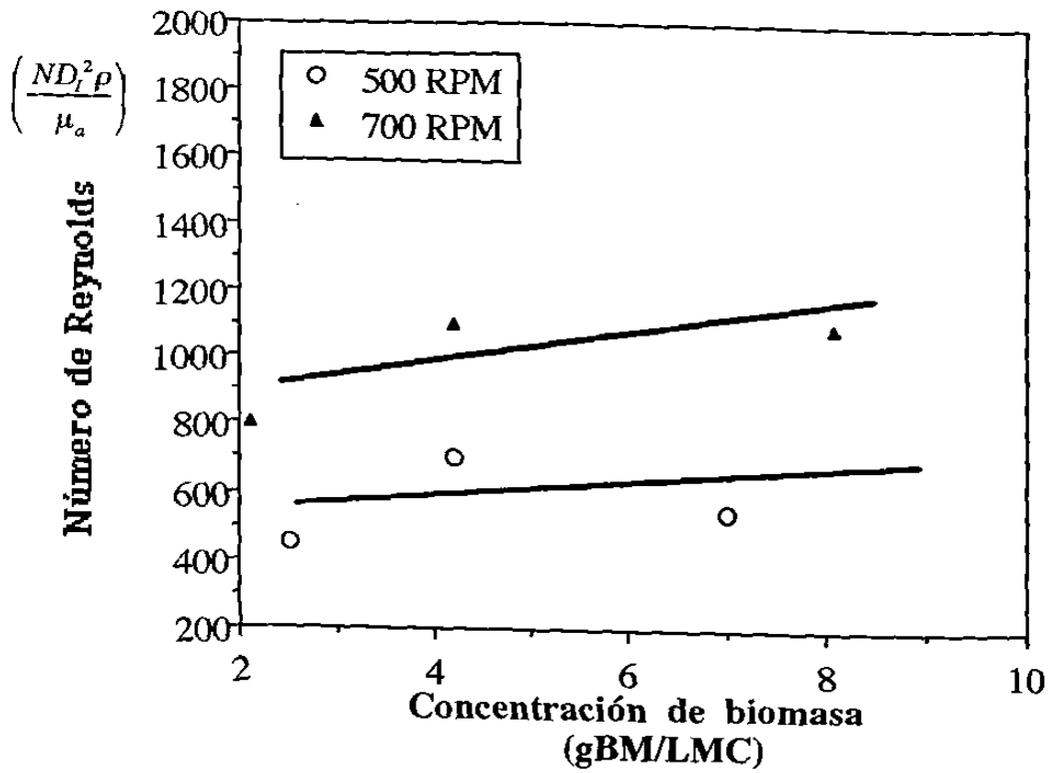


Figura 14. Números de Reynolds para impulsores en la propagación de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis* C-4

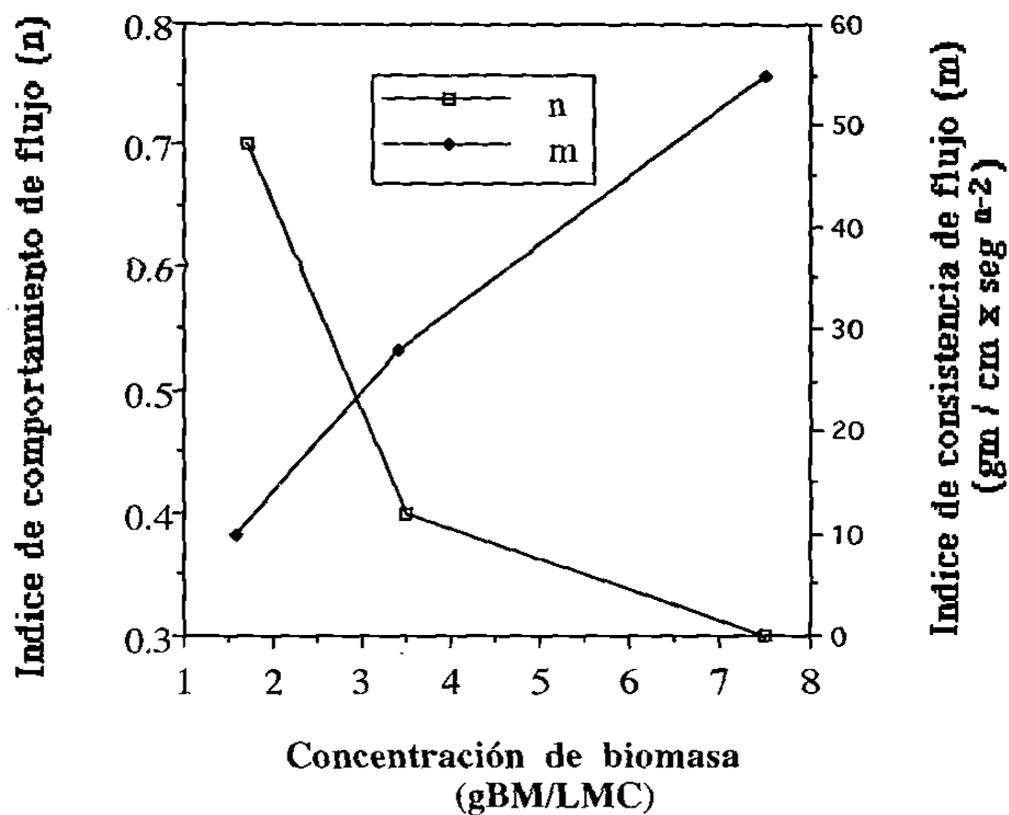
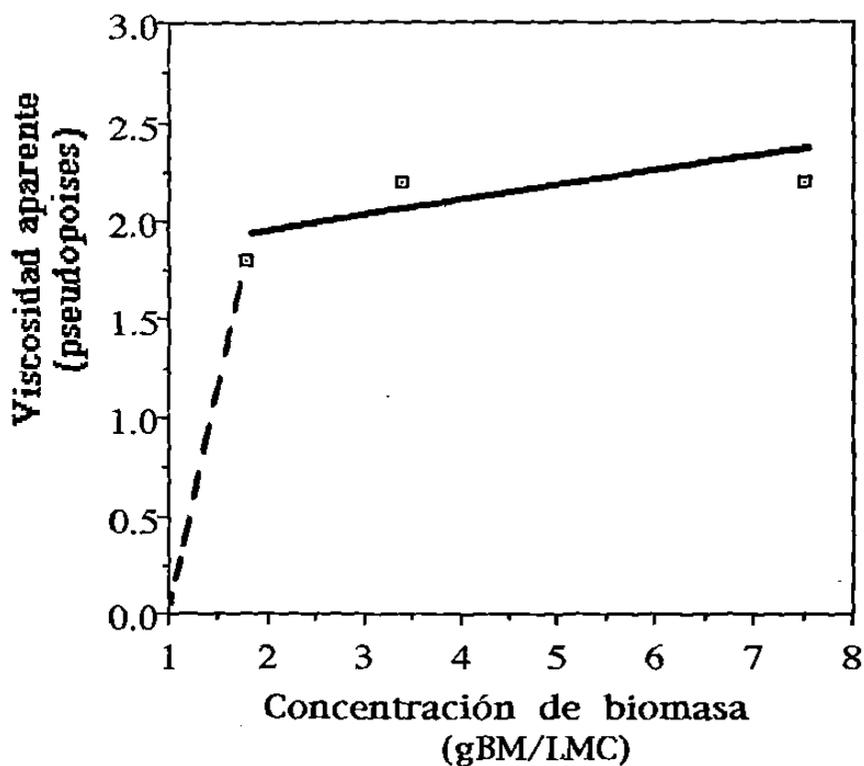


Figura 15. Efecto de la concentración celular y la velocidad del impulsor tipo turbina I sobre la reología *in situ* de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis* C-4

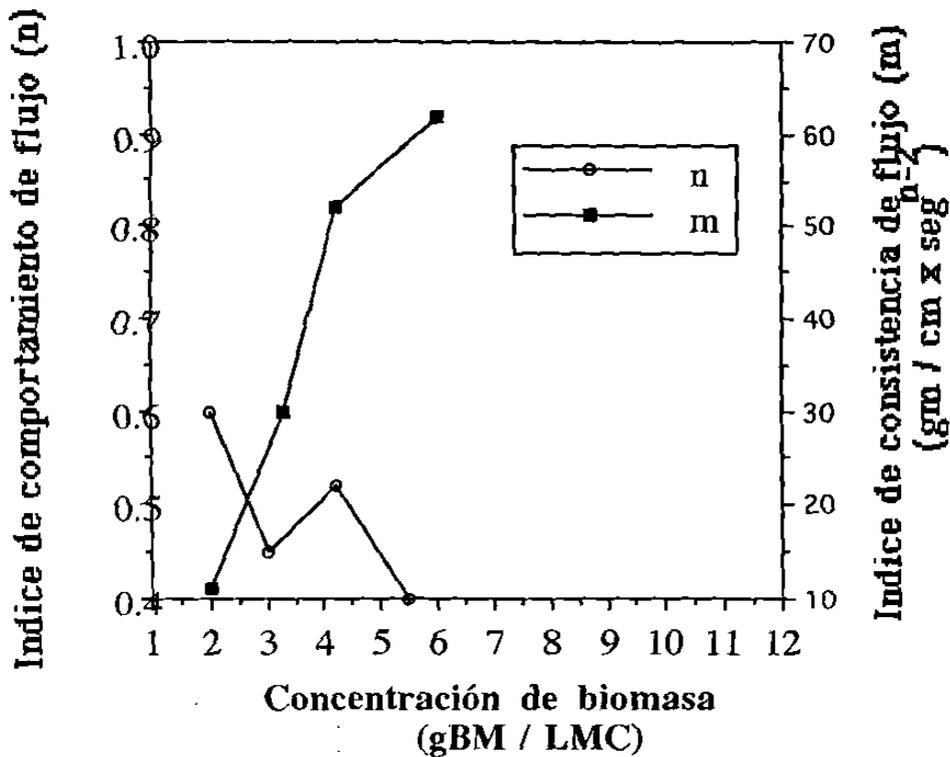
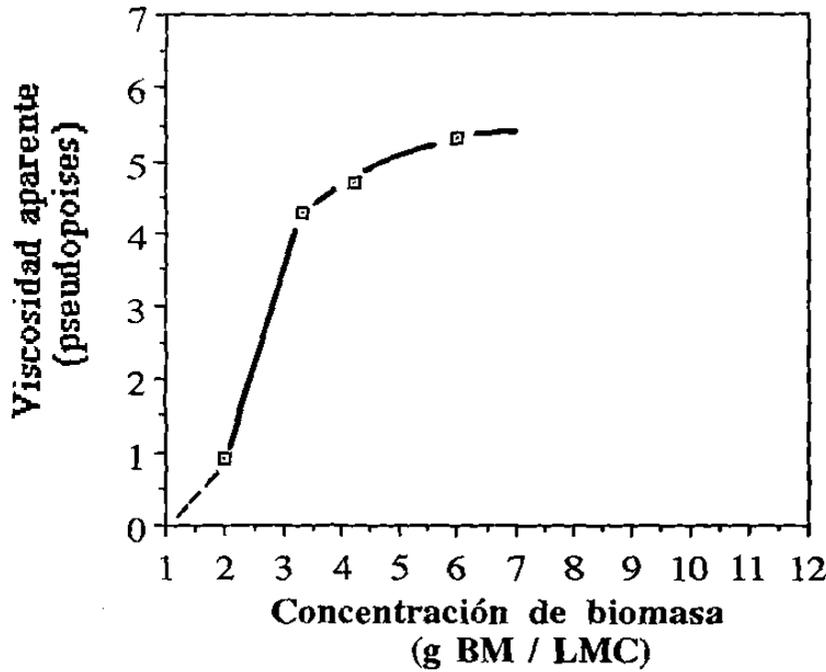


Figura 16. Efecto de la concentración celular y la velocidad del impulsor tipo Turbina II sobre la reología *in situ* de *Bacillus thuringiensis var. kumamotoensis* C-4

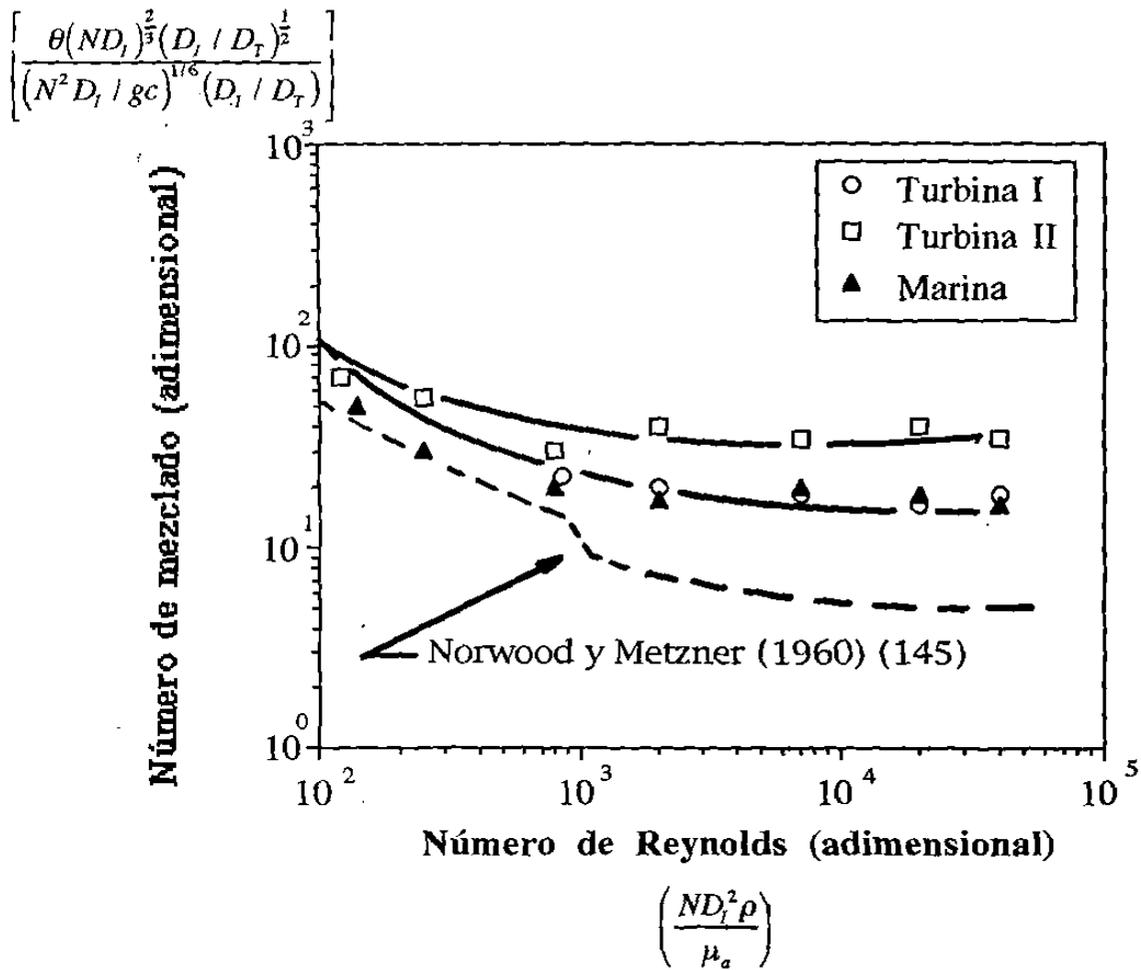


Figura 17. Correlación de tiempos de mezclado en el reactor utilizado

$$\left[ \frac{\theta (ND_1)^{\frac{2}{3}} (D_1 / D_T)^{\frac{1}{2}}}{(N^2 D_1 / gc)^{1/6} (D_1 / D_T)} \right]$$

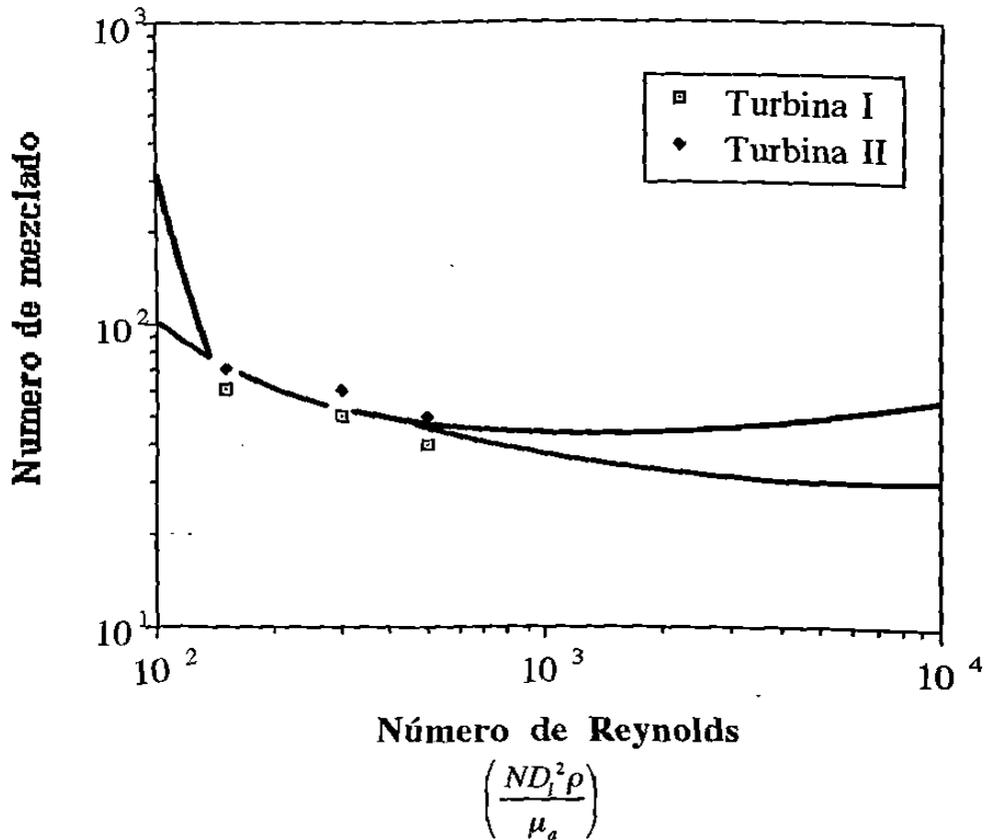


Figure 18. Correlación de tiempos de mezclado en la propagación de *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* C-4

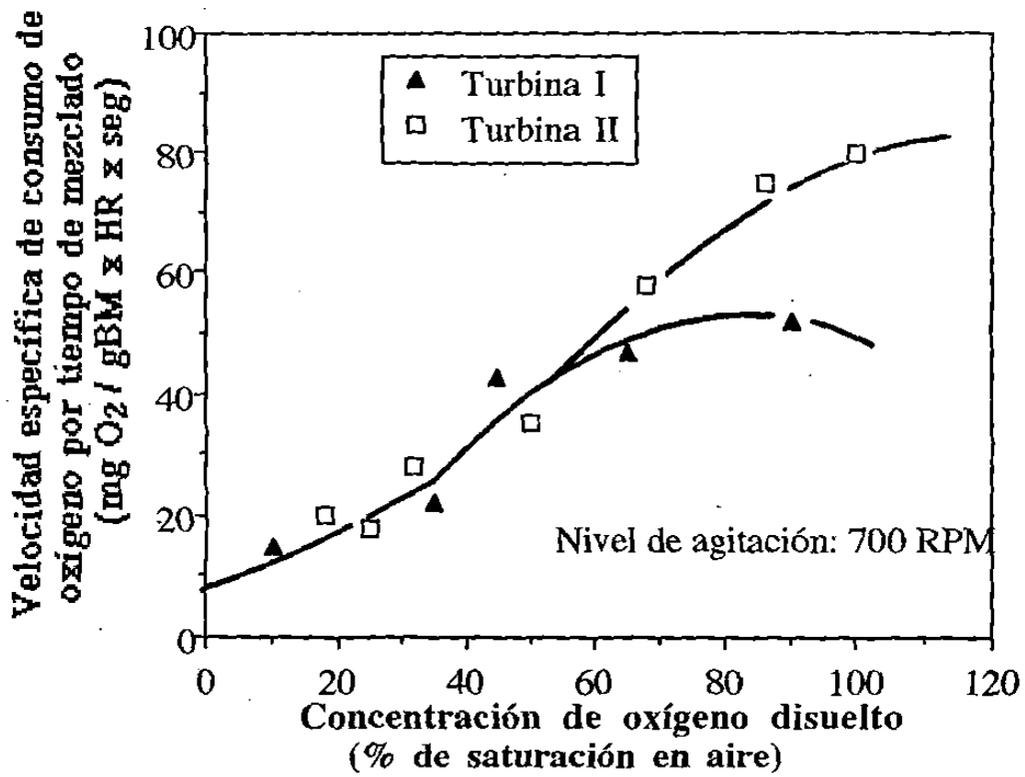


Figura 19. Relación del producto de la velocidad específica de consumo de oxígeno y el tiempo de mezclado con la concentración de oxígeno disuelto para dos tipos de impulsores

