

00551

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Producción y formulación de *Bacillus subtilis* CPA como
agente de control biológico”**

T E S I S

**que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

p r e s e n t a

I.B.Q Lucio Rodríguez Sifuentes

Cuernavaca, Morelos. Noviembre de 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice general

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	5
2.1 <i>Bacillus subtilis</i> como agente de control biológico	5
2.2 La antibiosis, principal mecanismo de acción de <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.3 Antibióticos producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.4 Esporulación en <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.5 <i>Bacillus subtilis</i> CPA	11
2.5.1 <i>Bacillus subtilis</i> CPA como agente de control biológico en el cultivo de papa	11
2.6 Formulación de agentes de control biológico	13
2.6.1 Formulaciones comerciales de <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.6.2 Secado por aspersión	15
2.7 Escalamiento de fermentaciones de <i>Bacillus subtilis</i>	16
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
4. Materiales y métodos	22
4.1 Materiales	22
4.1.1 Microorganismo	22
4.1.2 Composición y preparación de medios de cultivo	22
4.1.2.1 Medios sólidos	22
4.1.2.2 Medios líquidos	23
4.1.3 Preparación del inóculo	25
4.1.4 Cultivos en matraz	26
4.1.4.1 Condiciones de cultivo	26
4.1.4.2 Determinación de potencia	26
4.1.5 Cultivos en fermentador de 10 L	27
4.1.5.1 Condiciones de cultivo	28
4.1.5.2 Determinación de potencia	28

4.1.6 Cultivos en fermentador de 30 L	31
4.1.6.1 Condiciones de cultivo	31
4.1.6.2 Determinación de potencia	32
4.1.7 Formulación preliminar del producto	34
4.1.8 Comparación de <i>Bacillus subtilis</i> CPA y el producto comercial "Serenade"	35
4.2 Métodos analíticos	40
4.2.1 Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mediante cuenta en placa	40
4.2.2 Cuantificación de esporas	41
4.2.3 Determinación de glucosa residual	43
4.2.4 Determinación de NH ₄ residual	43
4.2.5 Cuantificación de sólidos totales en el cultivo	44
4.2.6 Determinación de la actividad de agua (A _w) en los productos deshidratados	45
4.2.7 Bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	46
4.2.8 Técnica de eliminación de gas para la determinación del k _L a	47
5. Estrategia experimental general	50
6.Resultados y discusión	52
6.1 Selección del medio de cultivo	52
6.2 Cinética de crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> CPA en el medio de papa	53
6.3 Cinéticas de crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> CPA en el medio mineral	56
6.3.1 Crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> CPA bajo diferentes concentraciones de MnCl ₂ y MgSO ₄	58
6.4 Escalamiento de matraz a fermentador de 10 L	60
6.4.1 Efecto del pH en el crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> CPA	63
6.4.2 Producción de compuestos antifúngicos por <i>Bacillus subtilis</i> CPA en matraz y en fermentador de 10 L	66
6.5 Escalamiento a fermentador de 30 L	69
6.6 Recuperación y balances en el secador por aspersión	73

6.7 Efecto del secado por aspersión sobre la concentración de esporas viables	77
6.8 Compuestos antifúngicos producidos por <i>Bacillus subtilis</i> CPA contenidos en los productos deshidratados	79
6.9 Concentración de esporas viables y a_w a través del tiempo en los productos deshidratados	81
6.10 Bioensayo <i>in vitro</i> con <i>Bacillus subtilis</i> CPA y "Serenade"	83
6.11 Pruebas de campo con <i>Bacillus subtilis</i> CPA y el producto comercial "Serenade"	84
7. Conclusiones	88
8. Perspectivas	90
9. Bibliografía	91

Índice de tablas y figuras

Tabla 4.1 Composición de los medios de cultivo sólidos.	23
Tabla 4.2 Composición del medio de cultivo YPG líquido.	24
Tabla 4.3 Preparación del medio de infusión de papa.	24
Tabla 4.4 Composición y preparación del medio mineral.	25
Tabla 4.5 Barrido de velocidad de agitación para la determinación de la P/V en el fermentador de 10 L.	30
Tabla 4.6 Tratamientos de la aplicación de <i>B. subtilis</i> CPA y "Serenade" en campo	35
Tabla 4.7 Determinación de esporas bajo diferentes tratamientos térmicos.	42
Tabla 6.1 Crecimiento de <i>B. subtilis</i> CPA y porcentaje de inhibición producido por los compuestos antifúngicos sometidos al proceso de esterilización.	53
Tabla 6.2 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en los fermentadores piloto.	71
Tabla 6.3 Balance de sólidos en el secador por aspersión.	74
Tabla 6.4 Balance de UFC en el secador por aspersión.	75
Tabla 6.5 Viabilidad de las esporas después de la deshidratación mediante secado por aspersión.	78
Tabla 6.6 Inhibición producida por los compuestos antifúngicos producidos por <i>B. subtilis</i> CPA en el medio de cultivo y en los productos deshidratados.	80
Tabla 6.7 Inhibición producida por <i>B. subtilis</i> CPA y el producto "Serenade" sobre <i>Fusarium sp.</i>	84
Tabla 6.8 Inhibición producida por los compuestos antifúngicos del formulado de <i>B. subtilis</i> CPA y el producto "Serenade" sobre <i>Fusarium sp</i>	84
Fig. 4.1 Fermentador de 10 L (New Brunswick Scientific, Microferm)	28
Fig. 4.2 Dinamómetro de cojinete neumático	29
Fig. 4.3 Relación entre P_g/V y la velocidad de agitación.	31
Fig. 4.4 Fermentador de 30 L (B. Braun, Biostat UD).	32
Fig. 4.5 Secador por aspersión (Bowen Engineering, Niro Atomizer).	34

Fig. 4.6 Siembra de los tubérculos.	36
Fig. 4.7 Bacterización de semillas.	37
Fig. 4.8 Aplicaciones foliares del producto.	37
Fig. 4.9 Sistema de pivote central para el riego del cultivo.	38
Fig. 4.10 Categoría de los tubérculos en base al tamaño.	39
Fig. 4.11 Escala hedónica para evaluar la presencia de <i>R. solani</i> .	40
Fig. 4.12 Bioensayo de antagonismo <i>in vitro</i> .	46
Fig. 4.13 Resultado típico de un bioensayo <i>in vitro</i> .	47
Fig. 5.1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.	51
Fig. 6.1 Cinética de crecimiento y esporulación de <i>B. subtilis</i> CPA en medio de papa, concentración de glucosa y evolución del pH.	54
Fig. 6.2 Formación de agregados celulares de <i>B. subtilis</i> CPA en medio de papa.	54
Fig. 6.3 Cinética de crecimiento y de esporulación de <i>B. subtilis</i> CPA en medio mineral, consumo de sustratos y evolución del pH.	57
Fig. 6.4 Crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> CPA bajo diferentes concentraciones de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.	59
Fig. 6.5 Cinéticas de crecimiento, esporulación y consumo de la fuente de carbono en matraz y en fermentador.	61
Fig. 6.6 Consumo de la fuente de nitrógeno y evolución del pH en matraz y en fermentador.	61
Fig. 6.7 Fermentación de <i>B. subtilis</i> CPA en condiciones de pH no controlado	64
Fig. 6.8 Fermentación de <i>B. subtilis</i> CPA en condiciones de pH controlado	64
Fig. 6.9 Inhibición de <i>Fusarium spp.</i> producida por los compuestos antifúngicos producidos en matraz.	68
Fig. 6.10 Inhibición de <i>Fusarium spp.</i> producida por los compuestos antifúngicos producidos en fermentador de 10 L.	68
Fig. 6.11 Cinéticas de crecimiento, esporulación y consumo de la fuente de carbono en matraz y en fermentadores.	70
Fig. 6.12 Consumo de la fuente de nitrógeno, evolución del oxígeno disuelto y evolución del pH en matraz y en fermentadores.	72
Fig. 6.13 Recuperación de sólidos y de UFC en el secador por aspersión.	76

Fig. 6.14 Esporas viables en los productos deshidratados a través del tiempo.	81
Fig. 6.15 a_w en los productos deshidratados a través del tiempo.	82
Fig. 6.16 Rendimiento del cultivo de papa bajo diferentes tratamientos.	85
Fig. 6.17 Distribución de la enfermedad en los diferentes tratamientos	87

Resumen

Bacillus subtilis CPA (obtenida de la colección del Colegio de Postgraduados) ha mostrado características muy importantes como agente de control biológico a nivel laboratorio e invernadero. Sin embargo, la aplicación de esta bacteria a nivel comercial presenta algunas limitantes que incluyen la falta de una metodología reproducible y consistente para su producción y la disponibilidad de un formulado estable y de fácil manejo.

En el presente trabajo se escaló el proceso de producción de *Bacillus subtilis* CPA partiendo de un matraz y hasta un fermentador de 30 L. Se obtuvo un formulado preliminar en base seca y a base de esporas de *Bacillus subtilis* CPA (mediante secado por aspersión), el cual se comparó a nivel de campo, con un producto comercial, en el cultivo de papa.

Inicialmente se comparó el crecimiento de *B. subtilis* CPA en un medio a base de infusión de papa, empleado a nivel laboratorio para el cultivo de esta bacteria y en un medio mineral químicamente definido. Desde el punto de vista de proceso, los resultados mostraron al medio mineral como la mejor opción para el cultivo de *Bacillus subtilis* CPA, lográndose obtener 9.3×10^7 UFC/ml en 12 h, mientras que para el medio de papa se obtuvieron 9.7×10^7 UFC/ml pero en 48 h. Por otro lado, en bioensayos *in vitro*, se observó que al cultivar la bacteria en el medio mineral, ésta fue capaz de sintetizar compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización, mientras que en el medio de papa no se sintetizaron tales compuestos.

Se estudió la cinética de crecimiento y de esporulación de *B. subtilis* CPA en el medio mineral. La cinética de crecimiento en matraces indicó que la fuente de carbono fue el sustrato limitante para el proceso de esporulación de la bacteria y se logró obtener una concentración de esporas de 1×10^8 UFC/ml.

Posteriormente se procedió a escalar el proceso de producción (de matraz a fermentador de 10 L) utilizando como criterio la potencia volumétrica (P/V) constante. Para esto se determinó una potencia volumétrica de 0.47 W/L en el matraz mediante una correlación empírica y se determinó una agitación de 230 r.p.m. en el fermentador de 10 L (utilizando un dinamómetro) para obtener la misma potencia volumétrica que en el matraz. El criterio de P/V constante permitió obtener una mayor concentración de esporas (1×10^9 UFC/ml) en el fermentador de 10 L. Asimismo, se escaló el proceso de fermentador de 10 L a un fermentador de 30 L, obteniéndose la misma concentración de esporas.

Se realizaron estudios de secado para formular el producto por medio de secado por aspersión. Se obtuvo un formulado prototipo al secar el caldo de fermentación con almidón de maíz al 4 % (p/v). Este estudio indicó la necesidad del almidón (como soporte) durante el proceso de secado para incrementar el porcentaje de recuperación de sólidos y de UFC. Por otra parte, se determinó que el soporte no fue necesario como agente protector de las esporas ni de los compuestos antifúngicos presentes en el caldo de fermentación.

Finalmente, se llevó a cabo una comparación entre el formulado con soporte y el producto comercial "Serenade" (a base de esporas de *B. subtilis*), en donde se evaluaron ambas formulaciones en el cultivo de papa, a nivel de campo y bajo diferentes tratamientos. Los resultados de las pruebas de campo mostraron que la aplicación de ambos formulados no incrementó el rendimiento del cultivo de papa; sin embargo, los tubérculos producidos presentaron una menor incidencia del patógeno *Rhizoctonia solani*, siendo la aplicación intensiva del producto con *B. subtilis* CPA el tratamiento más efectivo para ese propósito.

1. Introducción

El control de enfermedades y plagas en plantas se ha convertido en una necesidad urgente en los últimos años. La creciente demanda por alimentos sanos se ha convertido en una gran demanda por una población cada vez mayor. Las pérdidas en el campo (precosecha), durante el almacenamiento y la comercialización (postcosecha) pueden alcanzar hasta el 25 % de la producción total en países industrializados (Harvey, 1978), mientras que en países en desarrollo pueden exceder el 50 % debido a la falta de tecnologías adecuadas para contender con este problema (Eckert y Ogawa, 1985).

Las prácticas más comunes para el control de enfermedades en plantas están basadas en la resistencia genética de las plantas, manejo del cultivo y su ambiente y el uso de pesticidas sintéticos, siendo los pesticidas los más usados a nivel mundial (Strange, 1993).

Existen muchas razones que han motivado la búsqueda de nuevas alternativas para sustituir el uso de pesticidas, entre las cuales se pueden citar: la creciente demanda social por el uso de químicos peligrosos a la salud humana, la contaminación ambiental asociada a los productos químicos, el desarrollo de resistencia del patógeno a estos productos, entre otros.

Una alternativa viable para disminuir el uso de productos químicos es el control biológico, que se define como el uso de microorganismos antagonistas de los patógenos para disminuir o eliminar los efectos nocivos causados por estos en los cultivos. El control biológico presenta grandes ventajas sobre el control químico, entre las que destacan: un reducido

impacto ambiental, su inocuidad en el ser humano y su especificidad antagónica (Thomas y Willis, 1998).

Las especies antagónicas con alto potencial de aplicación como agentes de control biológico son los propios miembros de la microflora de los cultivos (cepas nativas de raíces, hojas, frutos, etc. del cultivo al que se desea aplicar) (Leibinger *et al*, 1997). Los antagonistas actúan mediante varios mecanismos: parasitismo, antibiosis (producción de antibióticos), competencia por espacio/nutrientes o induciendo la resistencia de la planta (Krauss *et al*, 2001).

Un gran número de organismos han sido probados exitosamente a nivel de laboratorio para su uso como agentes de control biológico; sin embargo, su producción y el proveer una formulación efectiva, estable y económica han causado que la gran mayoría no logren alcanzar un lugar en el mercado (Cook, 1993).

Bacillus subtilis presenta muchas ventajas sobre otras bacterias y hongos como agente de control biológico, principalmente porque genera esporas resistentes al calor y a la desecación, con lo cual se pueden formular productos muy estables para su aplicación (Emmert y Handelsman, 1999). Además, produce una gran cantidad de compuestos antibióticos que son efectivos en invernadero y en campo (Rytter *et al*, 1989). Broadbent *et al* (1977) indicaron también que *B. subtilis* produce moderadas cantidades de giberelina, hormona que incrementa el desarrollo de las plantas y también produce exoenzimas de alto peso molecular (como laminarasa, quitinasa y celulasa) que degradan la pared celular de

hongos fitopatógenos. *B. subtilis* tiene además la capacidad de transformar minerales no asimilables para las plantas a componentes orgánicos asimilables.

Actualmente, existen productos comerciales de importación a base de *Bacillus subtilis* para su uso como agentes de control biológico, sin embargo, el uso de cepas autóctonas puede ser una ventaja por su adaptación a las condiciones locales de México.

En el Colegio de Postgraduados se aisló, de suelo donde se cultiva papa, la cepa *Bacillus subtilis* CPA, la cual ha presentado características muy interesantes como agente de control biológico. Esta cepa ha sido efectiva en condiciones *in vitro*, en postcosecha y precosecha contra una gran variedad de microorganismos fitopatógenos de interés comercial. En cultivos de papa, bajo condiciones de invernadero, *Bacillus subtilis* CPA además de controlar efectivamente ciertas enfermedades fungosas y bacterianas, ha permitido incrementar sustancialmente los rendimientos y la calidad de la papa producida.

La aplicación de *Bacillus subtilis* CPA a nivel comercial ha sido muy limitada ya que no se cuenta con una metodología reproducible para la producción de esta bacteria y un formulado estable y de fácil manejo para su aplicación.

Dadas las características de *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico, en el presente trabajo se estableció una metodología, a nivel planta piloto, para la producción de esporas de esta bacteria y la formulación de un producto de control biológico para su uso en cultivos de importancia comercial.

2. Antecedentes

2.1 *Bacillus subtilis* como agente de control biológico

Bacillus subtilis tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos de importancia, de colonizar raíces y de estimular el crecimiento de las plantas, por lo cual se le ha evaluado como agente de control biológico en diversas enfermedades (Chang y Kommedahl, 1968; Utkhede, 1984; Ferreira *et al*, 1991).

Wang *et al* (2002) realizaron estudios *in vitro* en donde observaron la inhibición de *Fusarium oxysporum* por los metabolitos producidos por dos cepas de *B. subtilis*. Este efecto lo atribuyeron a la degradación de la pared celular del hongo (constituída por quitina) por la presencia de quitinasas, producidas por las dos cepas, al cultivarlas en un medio suplementado con quitina. Al comparar el efecto antagonista, bajo las mismas condiciones de cultivo, de los extractos producidos por las dos cepas de *B. subtilis*, con los extractos de otras cepas productoras de quitinasas (como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces actuosus*, *B. alves*, *B. sphaericus* y *B. cereus*), el porcentaje de inhibición fue considerablemente mayor al utilizar extractos de las cepas de *B. subtilis*.

En condiciones *in vitro*, Pusey y Wilson (1984) observaron la inhibición de *Monilinia fructicola*, causante de la pudrición café en diversos productos frutícolas, por *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia*, *Bacillus thuringiensis* y dos cepas de *B. subtilis*. Sin embargo, sólo una cepa de *B. subtilis* logró controlar la pudrición café en duraznos y albaricoques, mientras que en nectarinas y ciruelas redujo sustancialmente la enfermedad. Las otras cepas tuvieron

poco o nulo efecto en condiciones *in vivo*. Establecieron también que a una concentración de 1×10^8 UFC/ml, *B. subtilis* logró incrementar el control de la pudrición café en durazno con respecto a concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 UFC/ml.

Jiang *et al* (2001) realizaron estudios *in vitro* en donde seleccionaron a *B. subtilis* de entre seis antagonistas, de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, para el control de la pudrición del litchi producida por *Peronophythora litchi*. Posteriormente, determinaron que la bacteria, a concentraciones entre 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ml, controló la enfermedad bajo condiciones de almacenamiento en postcocecha.

Pusey *et al* (1988) emplearon a *B. subtilis* en el control de la pudrición café del durazno causada por *M. fructicola* y la pudrición por *Rhizopus sp* en empacadoras a nivel comercial. La aplicación de la bacteria en mezcla con el fungicida *Diclorán* y ceras sintéticas mostró bajo porcentaje de frutos podridos, mientras que los tratados con el fungicida y ceras (por separado) no mostraron control efectivo.

Al realizar estudios en invernadero, Azizbekyan *et al* (2001) observaron un incremento considerable en la producción de papa al tratar las semillas con un formulado a base de esporas de *B. subtilis*. La producción de las semillas no tratadas fue menor y se observó la presencia de *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Alternaria tenuis*.

Schmiedeknecht *et al* (2001) reportaron la inhibición de *Fusarium oxysporum* al tratar semillas de maíz con cepas de *B. subtilis* en condiciones *in vitro*. El efecto inhibitorio se incrementó al tener una baja disponibilidad de hierro (Fe^{+3}) en el ensayo por lo que los

antagonistas compitieron con el patógeno por este elemento. Al realizar estudios con las cepas de *B. subtilis*, en condiciones de invernadero, observaron una disminución en el porcentaje de severidad de la enfermedad y la estimulación en el crecimiento del maíz. Por otra parte, reportaron estimulación en el crecimiento del maíz y el girasol en campo, al bacterizar las semillas con las cepas de *B. subtilis*.

Korsten *et al* (1997) emplearon una cepa de *Bacillus subtilis*, bajo condiciones de campo, para el tratamiento de la mancha negra y la mancha de hollín producidas en aguacate por *Pseudocercospora purpurea* y *Akaropeltopsis* sp., respectivamente. La aplicación de la bacteria se realizó en diferentes localidades y observaron, en general, una mayor disminución de las enfermedades al asperjar los árboles con *B. subtilis* y *B. subtilis* combinado con fungicidas químicos.

2.2 La antibiosis, principal mecanismo de acción en *Bacillus subtilis*

Algunos de los agentes de control biológico más efectivos son bacterias productoras de antibióticos, cuya acción determina su efectividad. El mecanismo de control principal de *B. subtilis* es la antibiosis. En diversos estudios se ha observado que los productos metabólicos de *B. subtilis* son efectivos para inhibir un gran número de hongos fitopatógenos debido a la producción de diversos compuestos antibióticos (Katz y Demain, 1977; McKeen *et al*, 1986; Gueldner *et al*, 1988).

En estudios realizados *in vitro* con el caldo del cultivo de *B. subtilis*, Azizbekyan *et al* (2001) observaron una completa inhibición del tubo germinativo en *Fusarium solani*, patógeno de la papa, así como la lisis de sus conidios.

Wang *et al* (2002) observaron lisis, degradación, desarrollo anormal en las hifas de *F. oxysporum* e inhibición en la germinación de las esporas del hongo en presencia de los metabolitos producidos por dos cepas de *B. subtilis*. El efecto inhibitorio de los metabolitos no fue influenciado significativamente bajo condiciones extremas de acidez (pH 3) y basicidad (pH 11). Además, encontraron que la actividad inhibitoria de los metabolitos se conservó al someterlos a una temperatura de 100 °C por 30 min.

Jiang *et al* (2001) emplearon a *B. subtilis* y sus productos metabólicos para controlar la pudrición del litchi. El extracto de los productos metabólicos producidos por la bacteria exhibió un mejor control de la enfermedad bajo condiciones de almacenamiento a 5 °C por 30 días. Por otra parte, los frutos tratados con el extracto presentaron mejor aspecto y la disminución de sólidos totales, acidez titulable y contenido de ácido ascórbico (asociado con la infección del fruto) fue más lenta con respecto al control.

Pusey y Wilson (1984) realizaron estudios *in vivo* para controlar la pudrición café en duraznos, utilizando los metabolitos producidos por *B. subtilis*. En sus estudios encontraron que la enfermedad fue controlada de igual forma al utilizar el caldo de cultivo (conteniendo células de *B. subtilis* y metabolitos) y los metabolitos libres de células, mientras que al utilizar células lavadas (libres de metabolitos) y metabolitos sometidos al proceso de esterilización (120 °C/15 min), el control de la enfermedad fue menor.

2.3 Antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es un gran productor de antibióticos. Katz y Demain (1977) mencionan que esta bacteria produce 66 diferentes antibióticos de naturaleza peptídica, los cuales pueden tener estructuras cíclicas o lineales. La mayoría de los antibióticos producidos por *B. subtilis* están compuestos solo por aminoácidos, mientras que otros pueden contener aminoácidos y otros constituyentes como ácidos grasos o contener aminoácidos que no se encuentran en las proteínas (Katz y Demain, 1977). *B. subtilis* también puede producir una familia de antibióticos estrechamente relacionados entre sí. Los miembros de esta familia pueden diferir en algunos residuos de aminoácidos, como es el caso de la iturina A y la iturina C que difieren en solo un aminoácido en su estructura (Katz y Demain, 1977).

Algunos de los antibióticos producidos por *Bacillus subtilis* son (Martin and Gottlieb, 1955): actinomicina, circulina, heliomicina, neomicina, viomicina, bacilisina (que es uno de los antibióticos peptídicos más simples); surfactina, un biosurfactante de carácter lipopeptídico y subtilina, cuya estructura y modo de acción son similares al de la nisina, ampliamente utilizado en la industria alimentaria como conservador. Además, se ha reportado que la subtilina retiene su actividad antimicrobiana al ser sometida al proceso de esterilización y se le conoce como lantibiótico, por contener el aminoácido lantionina (Mannanov y Sattarova, 2001).

También, Besson y Michel (1986) lograron el aislamiento y la purificación de la iturina D y la iturina E, dos compuestos antifúngicos producidos por una cepa de *Bacillus subtilis* cuyas estructuras son de carácter ciclolipopeptídico.

2.4 Esporulaci3n en *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis tiene la característica de escapar a las condiciones adversas mediante su diferenciación en células metabólicamente inactivas de alta resistencia llamadas esporas. Estas formas bacterianas soportan los efectos bactericidas como calor, resequedad, radiaciones, congelamiento y productos químicos tóxicos (Walker, 2000).

La parte interna de la espora está rodeada primero por una membrana celular y una pared celular delgada, y después por una capa concéntrica laminada gruesa, llamada corteza. La corteza está constituida por un peptidoglicano especial, diferente en composición al de la célula vegetativa, ya que contiene enlaces cruzados poco comunes, como los anillos de la lactama del ácido murámico. La corteza contiene ácido dipicolínico (DPA) que también se encuentra en la parte interna y que es un quelante de calcio y constituye hasta el 15 % del peso de la espora. Cuando el DPA que se deposita en la corteza forma compuestos quelados con calcio, pone este elemento en contacto con el peptidoglicano sobre la corteza. Los enlaces cruzados iónicos que se forman entre el calcio y el peptidoglicano ocasionan que el peptidoglicano se contraiga y expulse agua. Casi todas las células vegetativas están formadas por cerca de 77.5 % de agua, pero sólo 15 % de la endoespora es agua. Se cree que la poca cantidad de agua presente, imparte a la espora la resistencia al calor.

Para que se inicie el proceso de esporulación, la bacteria debe estar limitada de nutrientes importantes como son la fuente de carbono o nitrógeno. En segundo lugar, la población bacteriana debe tener alta densidad para permitir la secreción y reconocimiento del factor 1 de diferenciación extracelular (EDF-1), factor que al parecer es un péptido pequeño que se enlaza con la bacteria, limitada por algún nutriente, y le indica que es el momento de iniciar la

esporulación. Por último, la bacteria debe encontrarse en fase estacionaria. El proceso de iniciación da como resultado que la bacteria se divide en forma asimétrica y forme una preespora y una célula madre. En el transcurso de varias horas, la célula madre construye paredes protectoras (la corteza y las paredes de la espora) en torno a la preespora, mientras que los mecanismos metabólicos de la preespora se transforman para la etapa de latencia (Walker, 2000).

2.5 *Bacillus subtilis* CPA

En el Colegio de Postgraduados se ha aislado la cepa *Bacillus subtilis* CPA de suelo donde se cultiva papa. Estudios previos con esta cepa han mostrado características muy interesantes como agente de control biológico. Salgado (1994) observó su efecto antagonista *in vitro* sobre *Monilinia fructicola*, *Rhizopus stolonifer* y *Colletotricum gloeosporioides*. En estudios realizados *in vivo*, *B. subtilis* CPA inhibió el desarrollo de lesiones en durazno producidas por *M. fructicola*, mientras que retardó la aparición de lesiones en jitomate y mango producidas por *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides*, respectivamente.

En estudios realizados *in vitro*, Fucikovsky (1999) observó el efecto fungicida de *B. subtilis* CPA en *Thielaviopsis paradoxa*, hongo asociado con la enfermedad denominada tristeza y muerte del agave tequilana (TMA), así como de la muerte de las raíces del frijol y tabaco y otras enfermedades en cultivos de caña de azúcar y zanahoria.

2.5.1 *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico en el cultivo de papa

La papa pertenece a la familia *Solanaceae* y es el tubérculo alimenticio más importante del mundo. Además de su utilización como alimento, la papa es usada para la fabricación de alcohol, pastas, pegamentos, etc. por su gran contenido de almidón (INEGI, 1997).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa el sexto lugar en importancia como alimento del pueblo mexicano con un consumo anual *per capita* de 12.3 kilogramos (Rubio *et al*, 2000).

Existen diversos problemas fitosanitarios que delimitan la calidad y el rendimiento del cultivo de la papa. Los agentes patógenos que causan enfermedades en la papa pueden ser hongos, virus, bacterias y fitoplasmas (Rubio *et al*, 2000; SEP, 1990), el control biológico con *Bacillus subtilis* CPA representa una alternativa viable para controlar estos agentes y disminuir el uso de agentes químicos y las desventajas que estos pueden llegar a representar.

Bacillus subtilis CPA ha sido probado exitosamente en cultivos de papa bajo condiciones de invernadero. Roncal *et al* (1991) realizaron estudios en invernadero con *B. subtilis* CPA en cultivos de papa y observaron el desarrollo de las plantas sin síntomas atribuibles a la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum*, así como un incremento en el número y el peso de los tubérculos producidos en presencia de la bacteria. Aranda (1997) realizó estudios *in vitro* con *B. subtilis* CPA y observó un efecto fungistático frente a cinco hongos patógenos de la papa. Asimismo, en condiciones de invernadero, la aplicación de *B. subtilis* CPA en cultivos de papa de la variedad *Alpha* incrementó en un 26 % el número de tubérculos producidos y un 48 % en el peso, con respecto al testigo. En la variedad *Atlantic*, *B. subtilis*

CPA incrementó en un 45 % el número de tubérculos producidos y un 11 % en el peso con respecto a su testigo. Por otra parte, los rendimientos (para las dos variedades de papa) fueron mejores cuando la bacteria estuvo presente en plantas infectadas con *Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Hasta el momento, las pruebas realizadas con esta cepa en cultivos de papa han mostrado resultados muy alentadores, con la restricción de que se han llevado a cabo de manera muy limitada en invernaderos, principalmente por la falta de una metodología para la producción de este *Bacillus*, la falta de un medio de cultivo químicamente definido (se ha utilizado un medio preparado con infusión de papa, el cual puede variar mucho en su composición) y no se cuenta con una formulación de fácil manejo para su aplicación a nivel comercial.

2.6 Formulación de agentes de control biológico

La comercialización de un agente de control biológico tiene tres etapas principales: descubrimiento, desarrollo y registro (Woodhead *et al*, 1990).

El descubrimiento consiste en la selección y evaluación de un microorganismo antagonista, tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo*. El desarrollo involucra estudios de fermentación para la optimización del medio de cultivo, temperatura, pH, etc. y la formulación del antagonista. Finalmente, el registro involucra estudios toxicológicos y análisis de los ingredientes de la formulación para su aprobación y comercialización (Woodhead *et al*, 1990).

La formulación tiene un profundo efecto en los productos de control biológico, incluyendo la vida de anaquel, habilidad para crecer y sobrevivir después de la aplicación, efectividad en el control de la enfermedad, facilidad de manejo y aplicación y costo (Fravel *et al*, 1998).

Los agentes de control biológico han sido formulados en una gran variedad de formas como son: polvos humectables, geles, emulsiones, gránulos, entre otros. El tipo de formulación depende principalmente en la forma en que se aplica el producto, así como de la biología y ecología del agente de control biológico, el patógeno, el hospedero y el sistema de cultivo. Por ejemplo, una formulación granular es apropiada para su distribución en surcos o en la incorporación en mezclas de horticultura, mientras que un polvo humectable puede ser resuspendido en agua para aspersión de las plantas o para empapar o sumergir las raíces. Además de estas consideraciones, existen otras características importantes en un formulado como son; compatibilidad con las prácticas agrícolas e integración con programas de fumigación (Fravel *et al*, 1998).

2.6.1 Formulaciones comerciales de *Bacillus subtilis*

Actualmente existen productos comerciales a base de *B. subtilis*. “Kodiak” es un polvo a base de esporas muy efectivo para la protección de cultivos contra patógenos como *Fusarium* y *Rhizoctonia*, así como estimulador del crecimiento en plantas (Turner y Backman, 1991; Backman *et al*, 1994). “Epic” es un formulado en polvo a base de esporas, que al igual que “Kodiak” puede ser mezclado con fungicidas químicos para el tratamiento comercial de semillas (Fravel *et al*, 1998).

AgraQuest, Inc. comercializa en México el producto "Serenade" (polvo a base de esporas de *Bacillus subtilis* y sus productos de fermentación) para su uso en control biológico. Vargas-Sánchez y Arteaga-Gallegos (2002a) realizaron estudios en campo utilizando "Serenade" para el control de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en tomate. Observaron una reducción de la enfermedad del 77 % y del 91 % al aplicar "Serenade" y la mezcla de "Serenade"-oxicloruro de cobre, respectivamente. El fungicida químico "Mancozeb" mezclado con oxicluro de cobre solo representó un 65 % de efectividad en el control de la mancha bacteriana. Vargas-Sánchez y Arteaga-Gallegos (2002b) también utilizaron "Serenade" para el control de la mancha bacteriana en fresa, producida por *Xanthomonas fragariae*, observando una eficacia del 82.1 % en el control de la enfermedad, mientras que con oxicluro de cobre la eficacia fue del 43 %.

El éxito de estos productos se debe principalmente a su fácil formulación y almacenamiento. Las esporas ofrecen a la formulación un sistema que ha sido seleccionado por millones de años de evolución para su resistencia y durabilidad (Emmert y Handelsman, 1999).

2.6.2 Secado por aspersión

Todos los organismos requieren de la presencia de agua en su ambiente interno para su supervivencia, la cantidad de agua necesaria varía de un organismo a otro. Mientras que la mayoría de las células metabólicamente activas contienen de 85 a 95 % de agua, algunas semillas de plantas, esporas de hongos y bacterias, algunos nemátodos y otros organismos, poseen la habilidad de sobrevivir a la desecación. Bajo estas condiciones, estos microorganismos poseen la habilidad de resistir altas o bajas temperaturas, exposiciones a la

luz ultravioleta y los rayos x, mientras que sus estructuras principales como membranas, ácidos nucleicos y proteínas son preservadas (Clegg, 1986).

El secado se refiere a la eliminación de agua de los materiales de proceso. La preservación de microorganismos para su uso comercial o en el laboratorio mediante el secado, ha sido ampliamente utilizada como una alternativa más económica que otros procesos como la congelación (Fry 1954).

El secado por aspersión es uno de los métodos más rápidos y económicos para la deshidratación de diversos productos y es ampliamente utilizado a nivel industrial (Aguilera, 1997; Belghith *et al*, 2001). En un secador por aspersión, un líquido o una suspensión se atomiza en una corriente de gas caliente para obtener una lluvia de gotas finas. El agua se evapora de dichas gotas con rapidez y se obtienen partículas secas de sólido que se separan de la corriente de gas. Los sólidos secos salen por el fondo de la cámara a través de un transportador de tornillo. Los gases de escape fluyen hacia un separador de ciclón para filtrar las partículas muy finas (Geankoplis, 1998). Los parámetros importantes en un proceso de secado por aspersión son; la naturaleza del producto a secar, la concentración de sólidos, las temperaturas de entrada del aire y la temperatura de salida, la cual se ajusta mediante el flujo al que se opera el secador (Belghith *et al*, 2001).

2.7 Escalamiento de fermentaciones de *Bacillus subtilis*

El escalamiento de un proceso biotecnológico se hace necesario con el fin de llevar al mercado algún producto de interés. Existen dos tipos de escalamiento: escalamiento ascendente (*scale up*), el cual consiste en llevar un proceso a una escala mayor y

escalamiento descendente (*scale down*), el cual consiste en detectar el mecanismo limitante de un proceso y reproducirlo en simuladores de pequeña escala (Sweere *et al*, 1987). En el presente trabajo se realizó un ejercicio de escalamiento ascendente para la producción de esporas de *B. subtilis* CPA como agente de control biológico.

El escalamiento ascendente surge de la necesidad de reproducir los resultados de un proceso fermentativo a nivel laboratorio a escalas mayores. El primer cambio de escala que un proceso biotecnológico experimenta es cuando se pasa de la etapa de la investigación (en matraces) a una que involucre fermentadores. Esta etapa, aunque relativamente pequeña en magnitud, representa cualitativamente un cambio importante. Las condiciones imperantes en un matraz son en general difíciles de reproducir, incluso en fermentadores pequeños de laboratorio. La siguiente etapa en el escalamiento de un proceso ocurre cuando se trata de reproducir las condiciones de fermentación entre un fermentador de laboratorio y uno de nivel planta piloto o industrial (Galindo, 1996).

La mayoría de las fermentaciones de bacterias del género *Bacillus* son en cultivos sumergidos, el proceso de fermentación inicia en matraces agitados para investigar las necesidades del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento. La fuente de carbono utilizada es un carbohidrato, como almidón, glucosa o sucrosa. El medio de cultivo debe de contener también sales como fosfatos, los cuales tienen capacidad de buffer (Doi y McGloughlin, 1992).

Una vez que el medio de cultivo ha sido definido, se realizan cultivos en pequeños fermentadores para optimizar las condiciones de cultivo. Los procesos en batch son predominantes en fermentaciones de *Bacillus*, pero los cultivos batch alimentados, en donde

nutriente principal esta presente en cantidad limitada al inicio del cultivo, están siendo utilizados de manera más frecuente. Los cultivos continuos son generalmente utilizados para determinar requerimientos nutricionales o para seleccionar microorganismos, pero este tipo de procesos no son muy usados en la industria . (Doi y McGloughlin, 1992; Sonenshein *et al*, 1993).

Durante la fermentación se monitorean diferentes parámetros como son pH, tensión de oxígeno disuelto (TOD), temperatura, producción de CO₂, aereación, agitación, presión etc. El producto de interés es monitoreado y es el principal criterio para finalizar la fermentación. La recuperación del producto depende de su uso final, la concentración por evaporación, el secado, la ultrafiltración o la precipitación pueden ser necesarios (Doi y McGloughlin, 1992).

En la literatura científica existe muy poca información acerca de procesos de escalamiento de agentes de control biológico. En el caso de *Bacillus subtilis*, solo existe un reporte (Pusey *et al*, 1988) en donde la producción de la bacteria se escaló de fermentador de 14 L a fermentador de 250 L. En dicho reporte, no se utilizó ningún criterio para realizar el escalamiento, se empleó un medio complejo para el cultivo de la bacteria y los autores no especificaron el estado metabólico de la bacteria (células vegetativas o esporas).

Existen otros reportes de escalamiento para bacterias del género *Bacillus* para su uso como biopesticidas, una de las más estudiadas es *Bacillus thuringiensis*. Hsu y Wu (20002) emplearon un algoritmo para escalar el proceso de producción de la thuringiensina, biopesticida producido por algunas cepas de *B. thuringiensis*, basándose en fluctuaciones de pH que pueden existir en un fermentador mal mezclado. En su estudio de escalamiento,

reportaron que fluctuaciones de pH en el fermentador durante la fase exponencial disminuyeron la producción de la thuringiensina en un 8%, mientras que las fluctuaciones de pH durante la fase estacionaria no influenciaron la producción del biopesticida.

Flores *et al* (1997) escalaron el proceso de producción de los cristales de proteínas insecticidas, producidos por *B. thuringiensis*, de fermentador de 14 L a fermentador de 1,100 L. El criterio empleado para el escalamiento fue el producto del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) y la presión total en el fermentador (p), ya que la producción de dichas proteínas esta asociada con la producción de esporas oxígeno-dependientes. En dicho estudio los autores mencionaron que el criterio $k_L a p$ fue práctico para el escalamiento, ya que la productividad en el fermentador de 1,100 L fue mayor a la obtenida en el fermentador de 14 L.

Actualmente, se usan cepas de *B. subtilis* para producir una gran diversidad de productos como son: enzimas, antibióticos, biopolímeros, potenciadores de sabor, entre otros (Harwood, 1989). Se reporta que la subtilisina, una proteasa alcalina producida por *B. subtilis* y otras especies relacionadas, representa el 25 % del mercado mundial de enzimas por su uso como ingrediente en detergentes (Towalski y Rothman, 1986).

Park *et al* (1997) utilizaron la cepa recombinante *B. subtilis* 1A289 conteniendo un plásmido que codifica para el gen de la α -amilasa. En dicho estudio los autores reportaron que la actividad enzimática de la α -amilasa producida en matraz fue de 634 U/ml, mientras que al cultivar la bacteria en fermentador de 5 L con una tensión de oxígeno disuelto (TOD)

de 90 % la actividad enzimática disminuyó en un 70 %. Posteriormente, al controlar la TOD a 5 %, la actividad enzimática fue de 846 U/ml.

Wang y Shih (1999) reportaron la producción de keratinasa por una cepa recombinante de *B. subtilis* en matraz de 50 ml y en fermentadores de 15 y 150 L. La actividad enzimática en el fermentador de 15 L fue de 310 U/ml, mientras que en el matraz y el fermentador de 150 L las actividades fueron de 306 y 304 U/ml respectivamente. Por otra parte, la productividad en el fermentador de 15 L fue de 6.46 U/ml h, mientras que en el matraz y el fermentador de 150 L fueron de 4.94 y 6.33 U/ml h, respectivamente. Estos resultados lo atribuyeron a que la producción de la keratinasa es favorecida a condiciones controladas de oxígeno disuelto del 20 %, condición que solo pudo lograrse en los fermentadores.

Richard y Margaritis (2003) reportan la producción un biopolímero (ácido polyglutámico) utilizado en la industria farmacéutica producido por *B. subtilis*. En dicho estudio los autores reportan que la producción en fermentador de 2 L se incrementó al final de la fase exponencial y en la fase estacionaria temprana.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar un proceso para la producción y formulación de esporas de *Bacillus subtilis* CPA y sus metabolitos para su uso como agente de control biológico.

3.2 Objetivos particulares

- Caracterizar las cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* CPA en matraz.
- Realizar ensayos *in vitro* de co-cultivo para evaluar el efecto de *B. subtilis* CPA y sus metabolitos en el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium spp.*
- Establecer las condiciones de fermentación sumergida para la producción de *B. subtilis* en biorreactores de 10 y 30 litros.
- Desarrollar esquemas preliminares para la formulación del producto de interés.
- Evaluación del producto desarrollado en cultivos de papa y su comparación con el producto comercial "Serenade".

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Microorganismos

Bacillus subtilis CPA, aislada de una muestra de suelo donde se cultiva papa, fue proporcionada por el Colegio de Postgraduados en forma liofilizada. La cepa se creció en medio líquido YPG y se conservó en glicerol al 20 % (v/v) a -15 °C.

Fusarium spp., patógeno del cultivo de papa, fue aislado de tubérculos de papa infectados con este hongo y conservado en cajas Petri con medio de agar papa dextrosa (PDA) a 10 °C. Este hongo fitopatógeno se utilizó como modelo para estudiar el efecto antagónico de *B. subtilis* CPA y sus metabolitos en condiciones *in vitro*.

4.1.2 Composición y preparación de medios de cultivo

4.1.2.1 Medios sólidos

Los medios sólidos utilizados fueron YPG solidificado, para el conteo en placa de UFC/ml y PDA, para estudios *in vitro* de antagonismo. La composición de estos medios de cultivo se detalla en la **tabla 4.1**.

Tabla 4.1 Composición de los medios de cultivo sólidos.

<u>Medio</u>	<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
YPG	Extracto de levadura	10
	Peptona	10
	Dextrosa	10
	Agar	15
PDA	Infusión de papa (sólidos)	4
	Dextrosa	20
	Agar	15

4.1.2.2 Medios líquidos

Los medio líquidos utilizados fueron; YPG, para la preparación de inóculos, medio infusión de papa (Salgado, 1994; Aranda, 1997) y medio mineral (Martínez *et al*, 1997), ambos para el cultivo de la bacteria.

La composición y preparación de los medios de cultivo YPG, infusión de papa y el medio mineral se detallan en las tablas **4.2**, **4.3** y **4.4**.

Tabla 4.2 Composición del medio de cultivo YPG líquido.

<u>Medio</u>	<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
YPG	Extracto de levadura	10
	Peptona	10
	Dextrosa	10

Tabla 4.3 Preparación del medio de infusión de papa.

Medio infusión de papa (Salgado, 1994; Aranda, 1997)	Se pesan 200 g de papa picada y se calientan en 500 ml de agua hasta que hierva durante 10 min. Posteriormente se filtra y se ajusta a un volumen de 1 L.
---	---

Tabla 4.4 Composición y preparación del medio mineral.

<u>Medio</u>	<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
Medio mineral (Martínez <i>et al</i> , 1997)	(NH ₄) ₂ SO ₄	4
	K ₂ HPO ₄	5.32
	KH ₂ PO ₄	6.4
	Dextrosa	10
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.4
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.00785
	CaCl ₂	0.040
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.030	

Para la preparación del medio mineral, se preparó una solución con el sulfato de amonio y los fosfatos de potasio y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH al 40%. La solución se esterilizó y se añadieron, en condiciones estériles, las soluciones de dextrosa y de cada una de las sales restantes en el orden en que se mencionan. Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave, a excepción de la solución de sulfato de hierro, la cual se esterilizó por filtración.

4.1.3 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se tomó 0.1 ml del glicerol, conteniendo la bacteria, y se estrió en una caja Petri conteniendo YPG+agar. La caja Petri se incubó a 30 °C por 24 h. Posteriormente se activó la cepa transfiriendo 2 asadas de las colonias formadas en medio YPG e incubando el(los) matraz (ces) en una incubadora con agitación a 30 °C, 200 r.p.m.

por 24 h. Finalmente, el preinóculo se transfirió en medio YPG y se incubó el(los) matraz (ces) bajo las mismas condiciones del preinóculo.

4.1.4 Cultivos en matraz

El cultivo en matraz se utilizó para la selección del medio de cultivo, producción de compuestos antifúngicos, así como para estudiar la cinética de crecimiento y producción de esporas de *Bacillus subtilis* CPA.

4.1.4.1 Condiciones de cultivo

Bacillus subtilis CPA se cultivó en matraces de 250 ml, utilizando 25 ml de medio de cultivo. El cultivo se mantuvo en agitación constante a 200 r.p.m. en una agitadora (New Brunswick Scientific, modelo G-25) con una distancia orbital de 2.5 cm y 30 °C por 36 horas. Se determinaron glucosa residual, pH, UFC/ml totales (células vegetativas, células en proceso de esporulación y esporas), esporas/ml (tratamiento térmico a 85 °C/12 min) y amonio residual cada 4 horas del cultivo. Estas técnicas se detallan más adelante en la sección 4.2.

4.1.4.2 Determinación de potencia

Para la determinación de potencia en matraces se utilizó la relación publicada por Büchs *et al* (2000) (ecuación 4.1), empleando las condiciones de trabajo utilizadas para el cultivo de la bacteria en matraz y teniendo en cuenta el número de Reynolds (Re) para recipientes agitados (ecuación 4.2).

$$\frac{P_{it}}{V_L} = C_p \frac{n^3 d^4 \text{Re}^{-0.2}}{V_L^{2/3}} \quad (4.1)$$

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\mu} \quad (4.2)$$

En donde:

P_g/V_L = potencia volumétrica gaseada

$C = 1.94$ (coeficiente de la ecuación de Buchs *et al*)

ρ = densidad

n = velocidad de agitación

d = diámetro máximo del matraz

μ = viscosidad

V_L = volumen del líquido

Para el cálculo de (P/V) , las propiedades del medio de cultivo se asumieron similares a las del agua.

$$\frac{P_g}{V_L} = C \rho \frac{n^3 d^4}{V_L^{2/3}} Re^{-0.2} \quad Re = \frac{\rho n d^2}{\mu}$$

$$Re = \frac{(1000 \text{ kg/m}^3) (3.33 \text{ s}^{-1}) (0.08 \text{ m})^2}{1 \times 10^{-3} \text{ kg/ms}} = 21312$$

$$\frac{P_g}{V_L} = (1.94) (1000 \text{ kg/m}^3) \frac{(3.33 \text{ s}^{-1})^3 (.08 \text{ m})^4}{(2.5 \times 10^{-5} \text{ m}^3)^{2/3}} (21312)^{-0.2} = \underline{\underline{0.4675 \text{ W/L}}}$$

4.1.5 Cultivos en fermentador de 10 L

Se empleó el criterio de potencia volumétrica (P/V) constante para el escalamiento de matraz a fermentador de 10 L. Posteriormente se estudió la cinética de crecimiento y la producción de esporas a lo largo del cultivo.

4.1.5.1 Condiciones de cultivo

Se realizaron cultivos en biorreactores de 14 L de volumen nominal (New Brunswick Scientific, modelo Microferm, **figura 4.1**). Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: volumen de trabajo de 10 L, 3 turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.105 m ($D/T = 0.5$), aireación de 1 vvm (10 litros/min), 30 °C, 230 r.p.m., 36 horas, NaOH 2N para el control de pH a un valor de 7.

Se determinaron UFC/ml totales, esporas/ml, glucosa residual, amonio residual, pH y tensión de oxígeno disuelto cada 4 horas a lo largo de la fermentación.

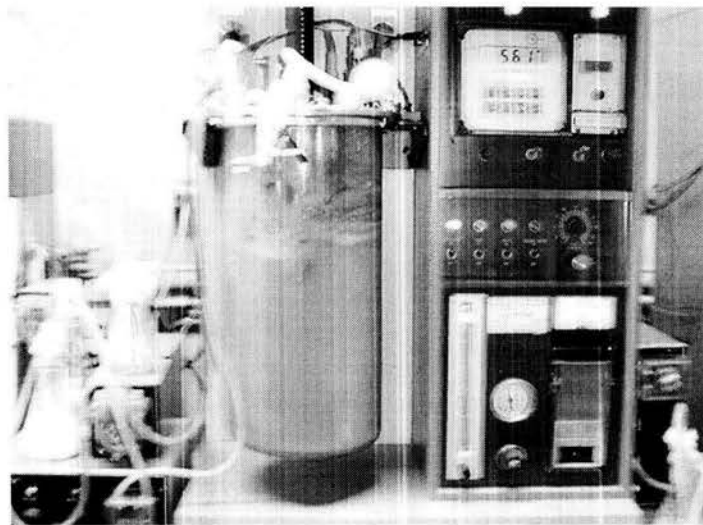


Fig. 4.1 Fermentador de 10 L (New Brunswick Scientific, Microferm)

4.1.5.2 Determinación de potencia

La determinación de la potencia volumétrica en biorreactor se llevó a cabo en un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al*, 1991, **figura 4.2**). Este sistema tiene similitud geométrica al biorreactor de 10 L, utilizando 10 L de agua, 3 turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.105 m ($D/T = 0.5$), aireación de 1 vvm (10 litros/min) y

diferentes velocidades de agitación para determinar aquellas necesarias para obtener la misma potencia volumétrica calculada en el matraz.

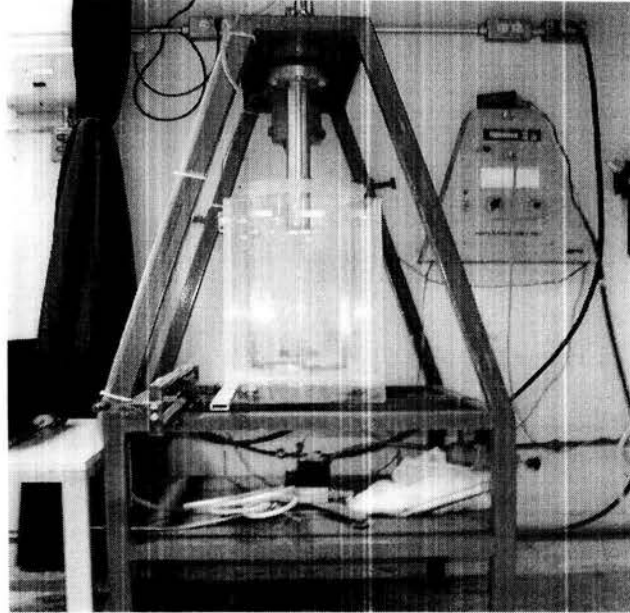


Fig. 4.2 Dinamómetro de cojinete neumático

El dinamómetro para la determinación de P_g/V cuenta con un cojinete neumático colocado en la parte inferior, el cual hace que el tanque flote en un colchón de aire para eliminar la fricción. Cuando el líquido es agitado, el tanque tiende a girar y un brazo de palanca transmite la fuerza de reacción a una celda de carga. El dinamómetro mide el torque de reacción, que es la energía que transmite el impulsor al fluido.

Las ecuaciones 4.3 y 4.4 se utilizan para calcular el torque de reacción y la potencia respectivamente.

$$M = F \cdot B \tag{4.3}$$

$$P = \omega * M \quad (4.4)$$

En donde:

M = torque (N.m)

F = fuerza (N)

B = brazo de palanca utilizado (m)

P = potencia (W)

ω = velocidad angular = $2\pi N$ (S^{-1})

M = velocidad de agitación (S^{-1})

Para el cálculo de la potencia en el biorreactor de 10 L, se realizó un barrido a diferentes velocidades de agitación y se calculó la potencia volumétrica (P/V) para cada caso, como se muestra en la **tabla 4.5**.

Tabla 4.5 Barrido de velocidad de agitación para la determinación de la P/V en el fermentador de 10 L.

rpm	rps	fuerza (g)	M(Nm)	w (s-1)	P(W)	P(W/L)
100	1.7	22.7	0.0445	10.472	0.466	0.04663957
120	2.0	33	0.0647	12.566	0.814	0.08136241
140	2.3	42.1	0.0826	14.661	1.211	0.1210985
160	2.7	51.74	0.1015	16.755	1.701	0.17008854
180	3.0	62.83	0.1233	18.850	2.324	0.23236366
200	3.3	76.28	0.1497	20.944	3.135	0.31345075
220	3.7	93.57	0.1836	23.038	4.229	0.42294895
240	4.0	111.97	0.2197	25.133	5.521	0.55213027
260	4.3	133.74	0.2624	27.227	7.144	0.71443596
280	4.7	162.22	0.3183	29.322	9.332	0.9332351
300	5.0	186.57	0.3661	31.416	11.500	1.14998375
320	5.3	205.47	0.4031	33.510	13.509	1.35091193
340	5.7	230.54	0.4523	35.605	16.105	1.61047446
360	6.0	254.5	0.4993	37.699	18.824	1.88243038
380	6.3	285.6	0.5603	39.794	22.298	2.22982323
400	6.7	314.2	0.6165	41.888	25.822	2.58222932
230	3.8	99.7	0.1956	24.086	4.711	0.47114179

Se realizó una gráfica P/V vs r.p.m. (**figura 4.3**) para obtener la velocidad de agitación aproximada para una potencia de 0.47 W/L en el biorreactor de 10 L. La velocidad de agitación determinada experimentalmente fue de 230 r.p.m.

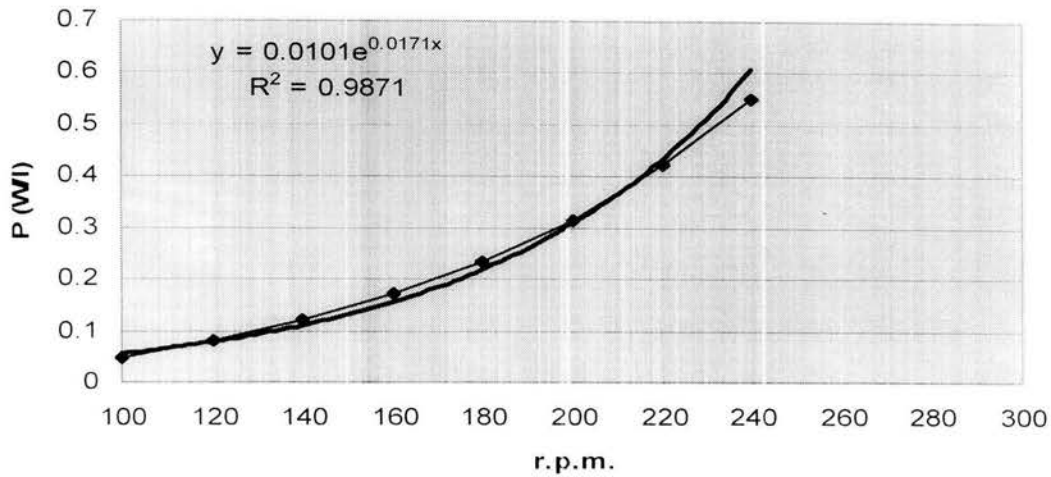


Fig. 4.3 Relación entre P_g/V y la velocidad de agitación.

4.1.6 Cultivos en fermentador de 30 L

Se realizaron cultivos en fermentador de 30 L para obtener suficiente material y proceder a la formulación del producto y la aplicación en campo.

4.1.6.1 Condiciones de cultivo

Se realizaron cultivos en un biorreactor de 43 L de volumen nominal (B. Braun, modelo Biostat UD, **figura 4.4**). Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: volumen de trabajo de 30 L, 3 turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.129 m ($D/T = 0.5$), aireación de 1 vvm (30 litros/min), 30 °C, 235 r.p.m., 24 horas.

Se determinaron UFC/ml totales, esporas/ml, glucosa residual, amonio residual, pH y tensión de oxígeno disuelto cada 4 horas a lo largo de la fermentación.

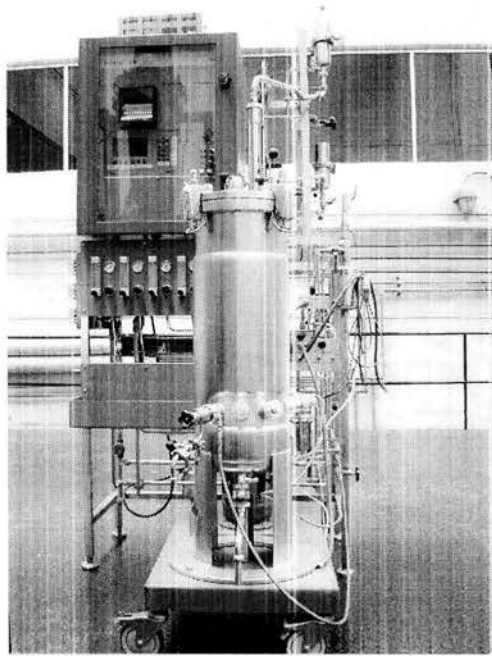


Fig. 4.4 Fermentador de 30 L (B. Braun, Biostat UD).

4.1.6.2 Determinación de potencia

Para el escalamiento de fermentador de 10 L a fermentador de 30 L se igualó la potencia en los dos fermentadores mediante la ecuación 4.5 y se determinó la velocidad de agitación necesaria para tener una potencia volumétrica de 0.47 W/L.

$$P = P_o \rho N^3 D^5 \quad (4.5)$$

En donde:

P_o = número de potencia

P = potencia

ρ = densidad

N = velocidad del impulsor

D = diámetro del impulsor

En la ecuación anterior, P se sustituye por la potencia volumétrica calculada en el fermentador de 10 L. Por lo que se obtiene la ecuación 4.6.

$$\frac{P}{V} = \frac{P_o \rho N^3 D^5}{V} \quad (4.6)$$

La potencia volumétrica es la misma para el fermentador de 10 y de 30 L, por lo que la ecuación anterior se iguala de la siguiente manera:

$$P/V \text{ en fermentador de } 10 \text{ L} = P/V \text{ en fermentador de } 30 \text{ L}$$

$$\frac{P_o \rho N^3 D^5}{V} = \frac{P_o \rho N^3 D^5}{V}$$

La densidad del medio de cultivo es la misma en los dos fermentadores, así como el número de potencia. Por lo tanto se tiene:

$$10 \text{ L} = 30 \text{ L}$$

$$\frac{N^3 D^5}{4} = \frac{N^3 D^5}{4}$$

$$\frac{\pi T^2 H_L}{4} = \frac{\pi T^2 H_L}{4}$$

En donde:

$$\Pi_1 = 3.1416$$

H_L = altura del líquido

T = diámetro del tanque

Al sustituir los valores:

$$10 \text{ L} = 30 \text{ L}$$

$$\frac{4 (230 \text{ r.p.m.})^3 (0.105 \text{ m})^5}{(3.1416) (0.210 \text{ m})^2 (0.300 \text{ m})} = \frac{4 N^3 (0.129 \text{ m})^5}{(3.1416) (0.258 \text{ m})^2 (0.588 \text{ m})}$$

$$N^3 = 12872538.21 = \underline{\underline{234.362}}$$

4.1.7 Formulaci3n preliminar del producto

El caldo de fermentaci3n obtenido de los cultivos desarrollados en el biorreactor de 30 L se deshidrat3 en un secador por aspersi3n (Bowen Engineering, modelo Niro Atomizer, figura 4.5), disponible en la Planta Piloto del Instituto de Biotecnolog3a (UNAM). Se formul3 el caldo a1adiendo un soporte inerte (almid3n de ma3z, *Maizena*) al 4 % (p/v) previo a su deshidrataci3n. Por otra parte, el caldo se deshidrat3 sin la adici3n del soporte para determinar su efecto sobre la viabilidad de las esporas y el porcentaje de recuperaci3n del producto en el secador por aspersi3n. El secador oper3 bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada 120 3C, temperatura de salida 60 3C y un flujo de 120 ml/min. Se determinaron el porcentaje de recuperaci3n de s3lidos, el porcentaje de recuperaci3n de UFC, la viabilidad de las esporas despu3s del secado, el efecto del secado sobre los compuestos antif3ngicos producidos por la bacteria, la actividad de agua (A_w) en el producto seco y las esporas viables en el producto a trav3s del tiempo para determinar el comportamiento de la vida de anaquel.

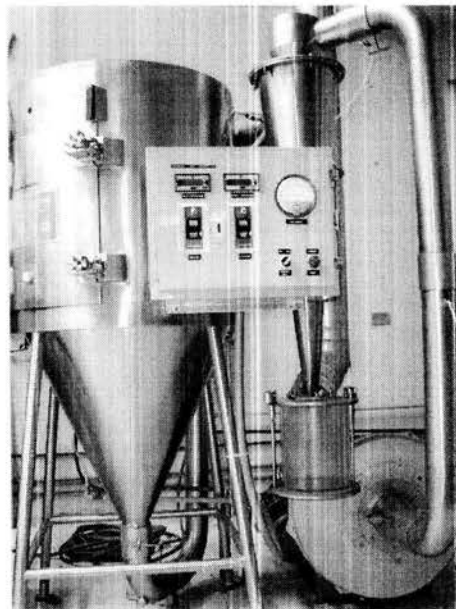


Fig. 4.5 Secador por aspersi3n (Bowen Engineering, Niro Atomizer).

4.1.8 Comparación de *Bacillus subtilis* CPA y el producto comercial “Serenade”

Se comparó, a nivel de campo, el formulado de *B. subtilis* CPA con 4 % de soporte con el producto comercial "Serenade" (a base de esporas de *B. subtilis*).

Ambos productos se aplicaron en el cultivo de papa. La siembra del cultivo inició el 26 de marzo de 2004 y se cosechó el 30 de agosto de 2004. El experimento se realizó en el ejido Puerto México, del municipio de Saltillo Coahuila, con un diseño de bloques al azar y bajo los tratamientos descritos en la **tabla 4.6**.

Tabla 4.6 Tratamientos de la aplicación de *B. subtilis* CPA y “Serenade” en camp

Tratamiento	Descripción
1	Testigo, tratamiento con fungicidas e insecticidas químicos
2	Una aspersión al follaje con <i>B. subtilis</i> CPA
3	Dos aspersiones al follaje con <i>B. subtilis</i> CPA
4	Bacterización de semilla con <i>B. subtilis</i> CPA
5	Bacterización de semilla + una aspersión al follaje con <i>B. subtilis</i> CPA
6	Bacterización de semilla + dos aspersiones al follaje con <i>B. subtilis</i> CPA
7	Una aspersión al follaje con “Serenade”
8	Dos aspersiones al follaje con “Serenade”

9	Bacterización de semilla con "Serenade"
10	Bacterización de semilla + una aspersión al follaje con "Serenade"
11	Bacterización de semilla + dos aspersiones al follaje con "Serenade"

Se utilizó la variedad de papa *Gigant*, cuya semilla fue producida en campo con un brotado uniforme y un tamaño aproximado de 4.5 cm de diámetro. Las semillas presentaron infecciones ligeras por el hongo *Rhizoctonia solani*. El experimento se llevó a cabo por triplicado y consistió en sembrar 100 semillas en una extensión de 10 mts para cada tratamiento, como se ilustra en la **figura 4.6**.

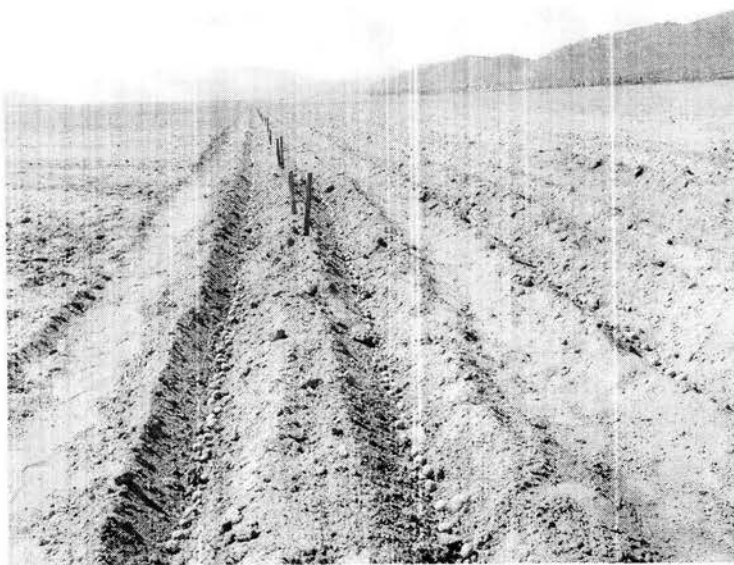


Fig. 4.6 Siembra de los tubérculos.

La bacterización de la semilla consistió en sumergir las semillas durante 10 min, en una solución a una concentración de 1×10^8 UFC/ml del producto y 1 g/l de goma xantana (Keltrol

CG-RD, Kelco Industrial Biopolymers) como adherente (**figura 4.7**). Las aplicaciones foliares (**figura 4.8**) se realizaron con una mochila de aspersión. La primera se realizó el 13 de mayo de 2004, cuando la planta comenzó a emerger y la segunda se realizó el 25 de junio de 2004. El testigo consistió en sumergir las semillas en una solución de 1 g/l de goma xantana y aplicaciones foliares con agua.

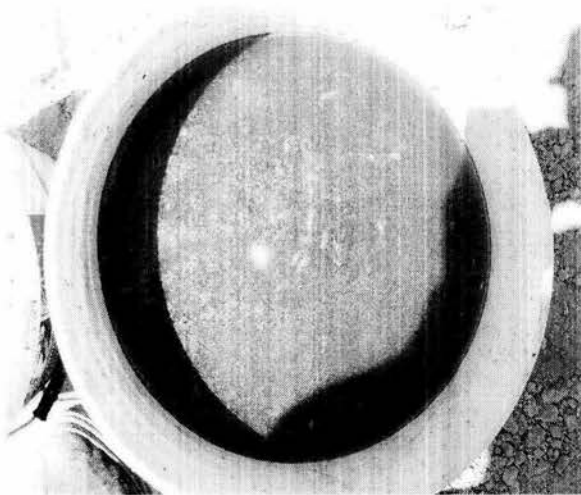


Fig. 4.7 Bacterización de semillas.



Fig. 4.8 Aplicaciones foliares del producto.

El cultivo se regó una vez por semana mediante un sistema de pivote central (**figura 4.9**) y una vez emergida la planta se realizaron 4 aplicaciones de 25 kg/riego de nutrientes foliares *Tec 19* y 2 aplicaciones de los insecticidas *Tamaron*, *Tiodan* y *Karate* cada 7 días y de manera alternada. Por cada aplicación de los insecticidas se realizó una aplicación del fungicida *Mancozeb* y nutrientes foliares *Polifil triple 19* mas ácido húmico. Todos los tratamientos, incluyendo el testigo, recibieron el tratamiento con insecticidas y fungicidas. Se realizaron 4 aplicaciones con tractor y 4 aplicaciones con avioneta

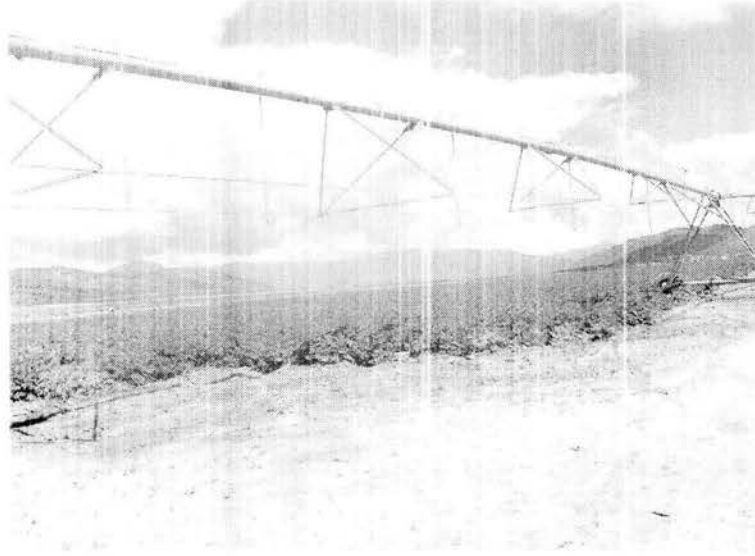


Fig. 4.9 Sistema de pivote central para el riego del cultivo.

El cultivo se cosechó el 30 de agosto y se aplicó el desecante *Reglone* 15 días antes de la cosecha para eliminar las plantas de la papa. Se evaluaron: peso total de los tubérculos, peso por categorías (tamaño de los tubérculos) y sanidad de los tubérculos respecto a la presencia del hongo fitopatógeno de la papa (*Rhizoctonia solani*).

Las categorías de los tubérculos se presentan en la **figura 4.10**. La clasificación de las categorías se realizó en base al tamaño de los tubérculos, siendo la categoría 1, la de mayor valor comercial, el tubérculo más grande y teniendo 3 categorías subsecuentes.

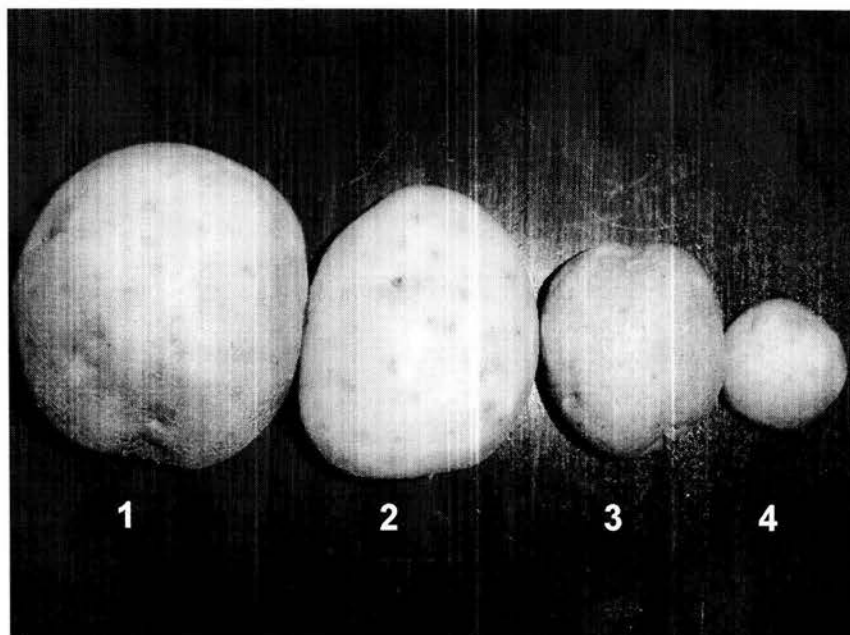


Fig. 4.10 Categoría de los tubérculos en base al tamaño.

R. solani produce, en la superficie de los tubérculos maduros, esclerosios de color negro o castaño oscuro, fácilmente detectados, que desmeritan la calidad del tubérculo. Los esclerosios pueden ser aplanados y superficiales o grandes e irregulares en forma de terrones, de ahí el nombre común de “Costra negra”. El hongo mata los brotes subterráneos y a los estolones, retardando o anulando su emergencia. Esto da como resultado desigualdad de crecimiento, plantas débiles y reducción en el rendimiento (Rubio *et al*, 2000). Para detectar la presencia de este hongo en los tubérculos se seleccionaron al azar 20 tubérculos de cada uno de los tratamientos y se calificó la presencia de esclerosios de manera visual mediante una escala hedónica. En la **figura 4.11** se presenta la escala hedónica utilizada para evaluar la sanidad de los tubérculos con respecto a la presencia de *R. solani*. En la escala, el número cero representa un tubérculo sin la presencia del hongo,

mientras que del número 1 al 3 representan tubérculos infectados por el hongo de menor a mayor grado, respectivamente.

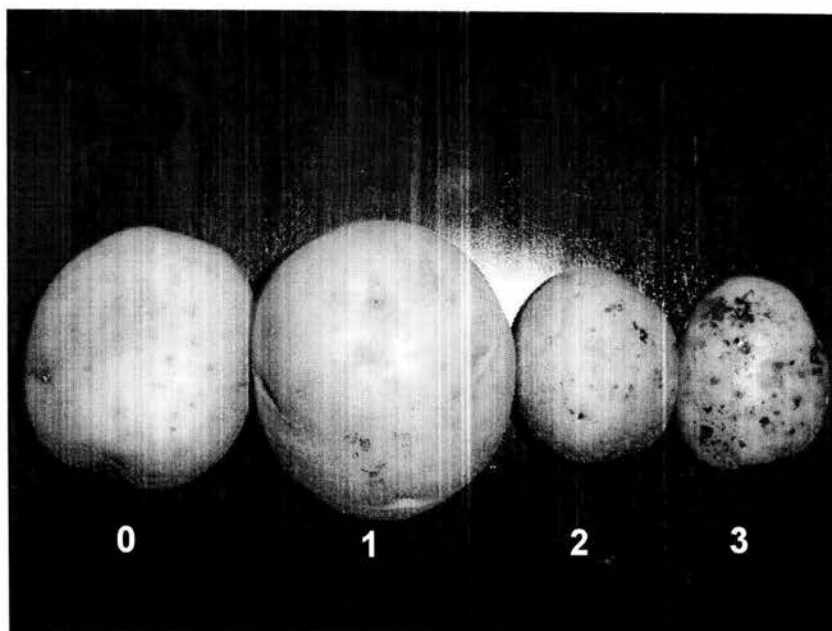


Fig. 4.11 Escala hedónica para evaluar la presencia de *R. solani*.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mediante cuenta en placa

- Se realizaron diluciones de la muestra en tubos de vidrio de 13x150 mm conteniendo solución salina al 0.85 %.
- Se tomaron 0.1 ml de las diluciones y se colocaron en cajas Petri con medio YPG+agar. La muestra se homogenizó con perlas de vidrio sobre la superficie de la caja.
- Las cajas Petri inoculadas se incubaron durante 48 horas a 30 °C y se revisaron a las 24 y 48 h de incubación. La cuantificación de UFC/ml se realizó

a las 48 de incubación empleando la ecuación 4.7. y se consideraron estas UFC/ml como totales (células vegetativas, células en proceso de esporulación y esporas).

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{UFC}}{\text{Dilución x volumen de muestra (ml)}} \quad (4.7)$$

4.2.2 Cuantificación de esporas

Las esporas se cuantificaron mediante cuenta en placa, sólo que las diluciones que se inocularon se sometieron a un tratamiento térmico para eliminar las células vegetativas del cultivo.

En la **tabla 4.7** se muestran las UFC/ml obtenidas a las 12 y 24 horas de cultivo, sometiendo las muestras a diferentes tratamientos térmicos. A las 12 horas de cultivo se obtuvieron UFC/ml del orden de 10^8 en el testigo (sin tratamiento térmico) y en la muestra tratada a 80 °C, mientras que en las muestras tratadas a 85,90 y 96 °C no se detectaron UFC/ml en las diluciones inoculadas. Esto sugirió que, a las 12 horas de cultivo, la bacteria no había esporulado ya que la glucosa residual en el medio era de 2.7 g/l y el tratamiento térmico a 80 °C no eliminó completamente las células vegetativas. Por otra parte, se consideró que bajo los tratamientos térmicos a 85,90 y 96 °C se eliminaron completamente las células vegetativas.

Tabla 4.7 Determinación de esporas bajo diferentes tratamientos térmicos.

Tiempo de cultivo (h)	Tratamiento térmico (12 min)	UFC/ml (10^8)	Glucosa (g/l)
12	Sin tratamiento	4.3	2.7
	80 °C	5.0	
	85 °C	no detectadas	
	90 °C	no detectadas	
	96 °C	no detectadas	
24	Sin tratamiento	1.0	0
	80 °C	2.0	
	85 °C	1.5	
	90 °C	0.9	
	96 °C	no detectada	

A las 24 horas de cultivo, no se detectó glucosa residual en el medio, por lo que, bajo estas condiciones, el proceso de esporulación de la bacteria seguramente inició por la limitación de la fuente de carbono. La concentración de UFC en la muestra que no recibió tratamiento térmico fue del orden de 1×10^8 , la cual fue muy similar al de las muestras que fueron tratadas a 80,85 y 90 °C. En consecuencia, a las 24 horas la mayoría de las células presentes en el cultivo son esporas que soportaron el efecto de las altas temperaturas. En la

muestra tratada a 96 °C, no se lograron cuantificar las UFC, ya que a ésta temperatura, la gran mayoría de las esporas presentes en el cultivo fueron eliminadas.

Dado los resultados anteriores, la determinación de esporas se realizó sumergiendo las diluciones en un baño de agua a una temperatura de 85 °C por un tiempo de 15 minutos

4.2.3 Determinación de glucosa residual

La muestra se filtró en una membrana de 0.22 micras para eliminar las células bacterianas y se analizó, para la determinación de glucosa residual, en un analizador Yellow Spring Instruments (YSI). El método de análisis del YSI se basa en la oxidación de la glucosa mediante la enzima glucosa-oxidasa, la cual se encuentra inmovilizada en una membrana en el sensor y cuyo producto de reacción (H_2O_2), es cuantificado y es proporcional a la concentración de glucosa.

4.2.4 Determinación de NH_4 residual

La cuantificación de amonio se basó en el método del indofenol (Kaplan, 1965). En esta técnica, el amonio reacciona con el hipoclorito de sodio, formándose la cloramina. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol para formar el cromógeno p-hidroxifenil imino benzoquinona, el cual es cuantificado colorimétricamente a 635 nm.

Para el análisis de la muestras, libres de células, se procedió de la siguiente manera:

- Se prepararon dos soluciones con agua desionizada: solución A (fenol 0.106 M y nitroferricianuro de sodio 0.17 mM) y solución B (hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM).

- Se prepararon estándares a concentraciones de 0.5, 1,2,3,4 y 5 mM de sulfato de amonio a partir de una solución de 6 mM.
- Se adicionó 1 ml de la solución A en un tubo con rosca y se colocaron 25 μ l de la muestra problema (estándares o caldo de fermentación). Posteriormente se agitó en un vortex, se adicionó 1 ml de la solución B y se agitó nuevamente.
- El tiempo de reacción de la mezcla fue de 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU 650). Para la solución blanco se utilizó agua desionizada como muestra problema.
- Una vez realizadas las lecturas de absorbancia de los estándares, éstas se graficaron contra su respectiva concentración y se construyó una curva de calibración mediante el ajuste de los puntos por el método de mínimos cuadrados. Posteriormente se obtuvo la pendiente y la ordenada en el origen para calcular las concentraciones de amonio de las muestras problema.

4.2.5 Cuantificación de sólidos totales en el cultivo

- Se colocaron 40-50 ml del caldo de cultivo de la bacteria en un recipiente de vidrio, llevado previamente a peso constante en un horno (Felisa, modelo 291A) durante 24 h a una temperatura de 85 °C.
- El recipiente de vidrio, conteniendo la muestra, se colocó en el horno durante 24 h a una temperatura de 85 °C.
- Posteriormente, el recipiente de vidrio se transfirió a un desecador con sílica gel por un periodo de 24 h.

- Finalmente se pesó el recipiente de vidrio en una balanza analítica (Ohaus GA110) y se determinaron los sólidos totales presentes en la muestra, utilizando la ecuación 4.8.

$$\text{Sólidos totales} \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right) = \frac{\text{peso (recipiente + muestra)} - \text{peso (recipiente)}}{\text{volumen de muestra (L)}} \quad (4.8)$$

4.2.6 Determinación de la actividad de agua (A_w) en los productos

deshidratados

La determinación de la A_w se realizó con un medidor de actividad de agua (Novasina, modelo A_w SPRINT), de la siguiente forma:

- Se encendió el aparato y se fijó la temperatura de la cámara a la cual se realizó la determinación. La temperatura se ajustó con el preselector del panel frontal del equipo y se dejó estabilizar.
- Se colocó aproximadamente 1 g del formulado en polvo en la charola de la muestra y se introdujo a la cámara de medición.
- Una vez cerrada la cámara de medición, se oprimió el botón *Start* durante unos segundos, hasta el encendido de la luz *Analyzing*, para dar inicio a la determinación.
- La lectura finalizó cuando se observó la palabra *Stable* en la pantalla y se encendió la luz *Ok*.

- Una vez finalizada la determinación, se oprimió el botón *Stop* y se removió la charola con la muestra.
- Antes de iniciar las determinaciones, el equipo se calibró utilizando soluciones estándar con una A_w conocida.

4.2.7 Bioensayos de antagonismo *in vitro*

En la **figura 4.12** se muestra un ejemplo de un bioensayo de antagonismo *in vitro* realizado para evaluar la inhibición del hongo fitopatógeno *Fusarium spp.* Se depositaron 50 μ l del tratamiento a evaluar (metabolitos, metabolitos+células, células) en dos orificios equidistantes hechos en una caja Petri con medio PDA (A). En otros dos orificios equidistantes se depositaron 50 μ l de medio de cultivo o agua destilada estéril como testigo (B). *Fusarium spp.* se inoculó en el centro de la caja Petri (C) como explante de 5 mm de diámetro de medio PDA con micelio del hongo previamente crecido durante 6 días.

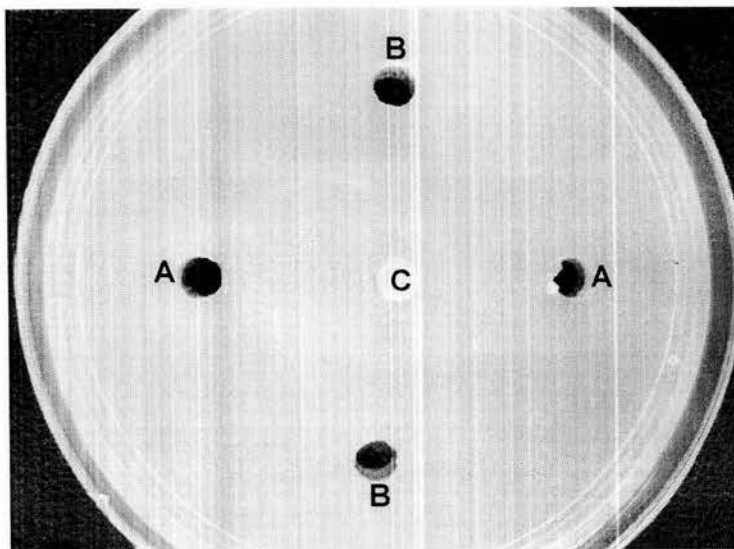


Fig. 4.12 Bioensayo de antagonismo *in vitro*.

Las cajas se incubaron a 30 °C por 6 días y se comparó el crecimiento de *Fusarium spp.* en presencia del tratamiento y el testigo para obtener un porcentaje de inhibición.

La **figura 4.13** muestra un resultado típico de un bioensayo de antagonismo *in vitro* realizado con *Fusarium spp.* en presencia de los compuestos antifúngicos producidos por *B. subtilis* CPA. Se midió el crecimiento del hongo hacia el testigo (B), obteniéndose una distancia de 6.7 cm, la cual se consideró como el 100 % del crecimiento del hongo. El crecimiento del hongo hacia los tratamientos fue de 5 cm (A), por lo que al relacionar dicho valor con el testigo (100 % de crecimiento) el crecimiento del hongo fue de un 74.6 % y el porcentaje de inhibición fue de 25.4 %.

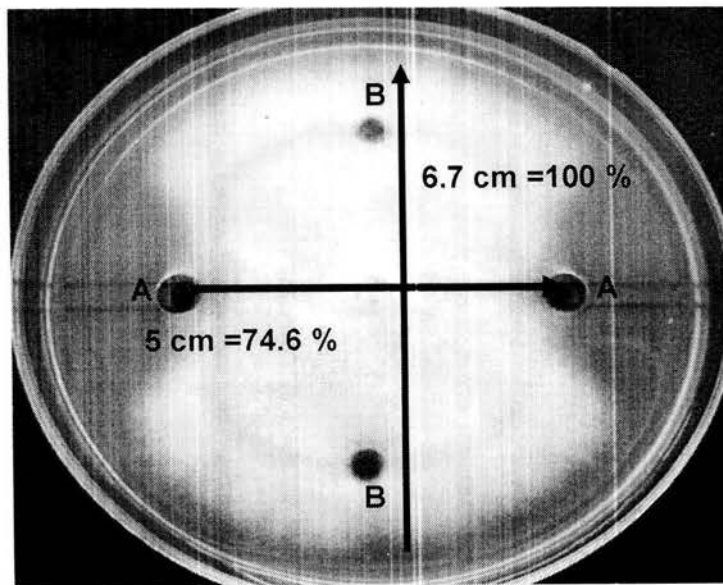


Fig. 4.13 Resultado típico de un bioensayo *in vitro*.

4.2.8 Técnica de eliminación de gas para la determinación del k_{La}

La técnica de eliminación de gas es un método indirecto para la determinación del k_{La} y que se realiza en sistemas donde no se lleva a cabo una fermentación. Los valores

obtenidos se emplean para hacer comparaciones entre diferentes biorreactores que operan bajo condiciones similares (Quintero, 1987).

Esta técnica se realiza de la siguiente manera:

- Se monta el biorreactor bajo las condiciones de trabajo: medio de cultivo, impulsores, velocidad de agitación, aireación, temperatura y un electrodo para la medición de la tensión de oxígeno disuelto.
- Estando en operación el biorreactor, se suspende el suministro de aire en el sistema y se alimenta nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto en el biorreactor.
- Una vez que la tensión de oxígeno disuelto sea igual o cercana a cero, se airea nuevamente y se toman lecturas, a tiempos iguales, del incremento en la tensión del oxígeno disuelto hasta que la lectura sea igual o cercana a 100.
- De acuerdo con el balance del oxígeno en el biorreactor se obtiene la ecuación 4.9.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_g^* - C_L) - Q_{O_2} X \quad (4.9)$$

En donde:

$k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferencia de masa

C_g^* = concentración de saturación de oxígeno disuelto

C_L = concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido

Q_{O_2} = velocidad específica de consumo de oxígeno

X = concentración celular

- El término de consumo de oxígeno (Q_{O_2}) es cero, puesto que ningún microorganismo está presente, por lo que se tiene la ecuación 4.10:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_g^* - C_L) \quad (4.10)$$

- Rearreglando la ecuación 4.10 se obtiene la ecuación 4.11:

$$\ln \frac{1 - C_L}{C_g^*} = -k_L a \quad (4.11)$$

- Si se realiza una gráfica con la ecuación 4.11 vs tiempo, se obtiene una línea recta en donde la pendiente es $-k_L a$.

Para la determinación del $k_L a$ en el fermentador de 10 L las condiciones fueron las siguientes: 230 r.p.m. para una P/V de 0.47 W/L, 1 v.v.m., 30 °C y 10 L de medio mineral, mientras que para el fermentador de 30 L las condiciones fueron: 235 r.p.m. para una P/V de 0.47 W/L, 1 v.v.m., 30 °C y 30 L de medio mineral.

5. Estrategia experimental general

La **figura 5.1** muestra la estrategia utilizada en el presente trabajo. Se realizaron cultivos de *B. subtilis* CPA en matraces agitados y se seleccionó un medio mineral para la producción de la bacteria en base a las UFC/ml producidas y a la producción de compuestos antifúngicos termorresistentes. Se caracterizó la cinética de crecimiento y producción de esporas en el medio mineral, se descartó la limitación de ciertos elementos requeridos por la bacteria durante su proceso de esporulación en el medio mineral y se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* para observar la producción de compuestos antifúngicos a lo largo del cultivo.

Posteriormente se escaló el proceso de producción de esporas de matraz a fermentador de 10 L y se determinó el efecto del cambio en el pH a lo largo del cultivo sobre el crecimiento de la bacteria y la producción de esporas, también se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* para observar la producción de compuestos antifúngicos a lo largo del cultivo.

Se escaló el proceso de producción de esporas de fermentador de 10 L a fermentador de 30 L y se deshidrataron 3 lotes de fermentación mediante secado por aspersión bajo dos condiciones diferentes: añadiendo un soporte inerte al caldo de cultivo y sin la adición del soporte. Se determinó la necesidad del soporte para incrementar el porcentaje de recuperación del producto en el secador por aspersión y se determinó la concentración de esporas viable a través del tiempo.

Finalmente se realizaron pruebas de campo en el cultivo de papa con el formulado de *B. subtilis* CPA y el producto comercial "Serende" y se comparó el efecto de ambos productos sobre el rendimiento y la sanidad del cultivo.

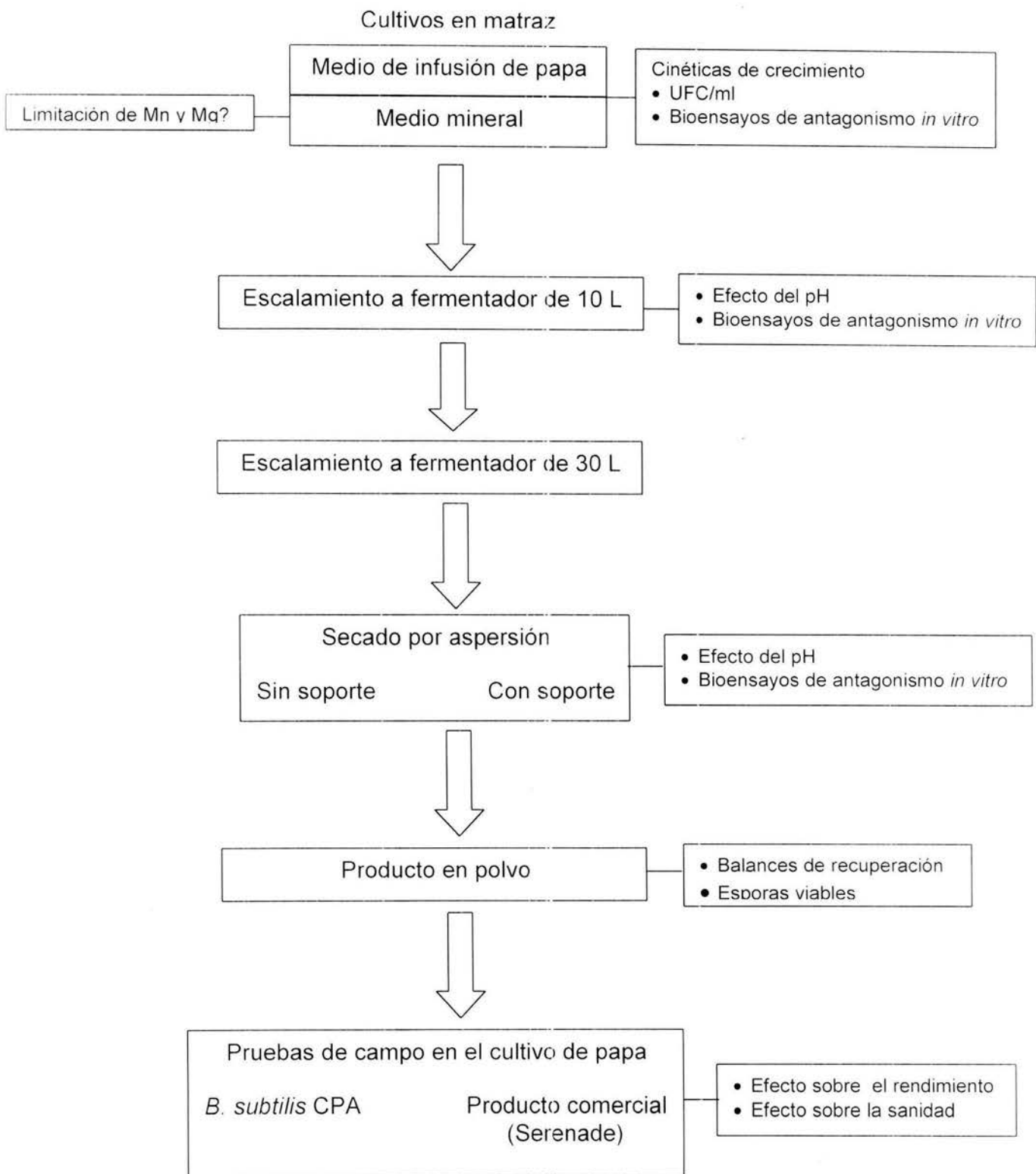


Fig. 5.1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

6. Resultados y discusión

6.1 Selección del medio de cultivo

La **tabla 6.1** muestra el crecimiento de *B. subtilis* CPA en el medio de papa y en el medio mineral, así como la producción de compuestos antifúngicos termorresistentes. Se obtuvieron UFC/ml ligeramente mayores en el medio mineral (y en un tiempo mucho menor) a las obtenidas en el medio de papa. Esta comparación se realizó a las 48 h para el caso del medio de papa, para comparar el proceso de producción de la bacteria bajo las condiciones reportadas anteriormente por Salgado (1994) y Aranda (1997), y a las 12 h para el caso del medio mineral, tiempo en que se detectó una pequeña concentración de la fuente de carbono. Además, la bacteria no fue capaz de sintetizar compuestos antifúngicos termorresistentes en el medio de papa, ya que en los bioensayos *in vitro* no se observó inhibición sobre *Fusarium spp.* Por su parte, en el medio mineral la bacteria sintetizó el(los) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s) como lo reportan Wang *et al* (2002) y Pusey y Wilson (1984) en medios complejos. La producción de este(os) compuesto(s) termorresistente(s) coincide con lo reportado por Mannanov y Sattarova (2001) y Nishio *et al* (1983) en donde mencionan que *Bacillus subtilis* produce el antibiótico subtilina, el cual retiene prácticamente toda su actividad a pH ácido y altas temperaturas.

La relevancia de estos resultados radica en que *B. subtilis* CPA logró sintetizar este(os) compuesto(s) en un medio químicamente definido y de bajo costo. Además se contará con la ventaja de poder formular un producto, mediante secado a altas temperaturas, que contenga esporas de *B. subtilis* CPA y sus compuestos antifúngicos. Un medio mineral favorece el proceso de esporulación en *Bacillus subtilis* (Schaeffer *et al*, 1965; Ellard y

Lundgren, 1966), lo que sería benéfico si lo que se desea es producir esporas que resistan el secado por aspersión para la formulación de un producto.

Tabla 6.1 Crecimiento de *B. subtilis* CPA y porcentaje de inhibición producido por los compuestos antifúngicos sometidos al proceso de esterilización.

Medio	Tiempo de cultivo (h)	UFC/ml	% de inhibición
Papa	48	9.67×10^7	0
Mineral	12	1.5×10^8	18

6.2 Cinética de crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* CPA en el medio de papa

La **figura 6.1a** muestra la cinética de crecimiento y la producción de esporas de *B. subtilis* CPA en el medio de cultivo de papa. La población bacteriana no aumentó ni siquiera un orden de magnitud según la **figura 6.1a**. Se presentaron problemas metodológicos para la cuantificación de UFC/ml debido a la formación de agregados celulares (de tamaños muy heterogéneos) en este medio de cultivo, como se muestra en la **figura 6.2**. Schaeffer *et al* (1965) reportan también problemas metodológicos para la cuantificación de UFC/ml en cultivos de *Bacillus subtilis* debido a la formación de agregados celulares en medios de cultivo complejos. Por otra parte, Kunioka y Goto (1994) reportan la producción de un biopolímero (ácido poli-glutámico) por *B. subtilis*, el cual puede contribuir al fenómeno de agregación de la bacteria.

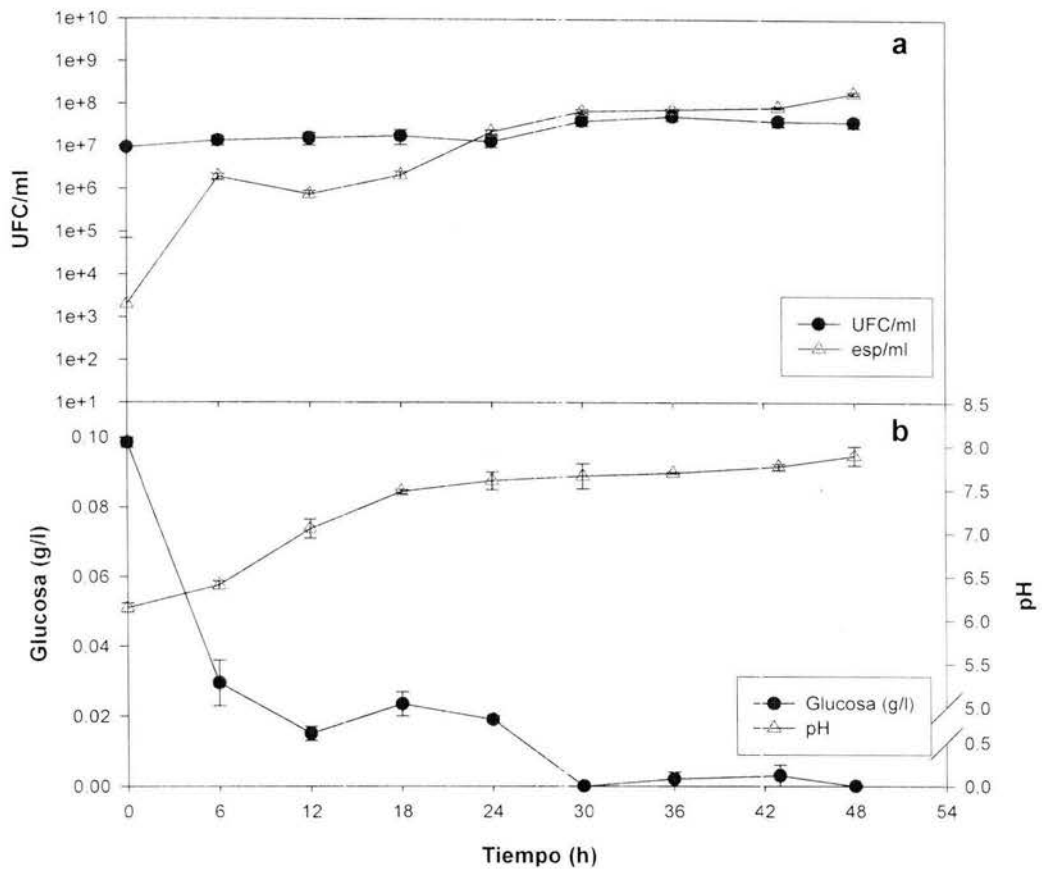


Fig. 6.1 Cinética de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* CPA en medio de papa, concentración de glucosa y evolución del pH.

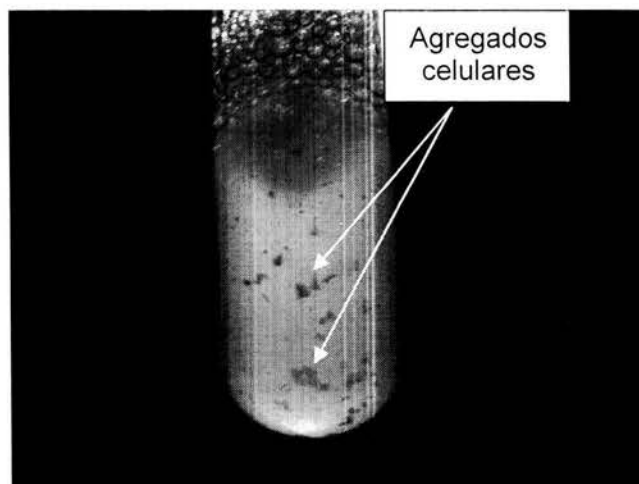


Fig. 6.2 Formación de agregados celulares de *B. subtilis* CPA en medio de papa.

No se pueden considerar como esporas todas las UFC/ml sometidas al tratamiento térmico (**figura 6.1.a**) ya que éstas fueron superiores, casi en un orden de magnitud, a las máximas UFC/ml alcanzadas en las muestras que no recibieron tratamiento térmico y una célula vegetativa solo puede generar una espora (Harwood, 1989) . Se estimó que el tratamiento térmico aplicado no eliminó todas las células vegetativas, posiblemente a problemas de transferencia de calor dentro de los agregados celulares y que el calentamiento de la muestra solo disgregó las células presentes en los agregados, por lo que se obtuvieron UFC/ml mayores en la muestra sometida al tratamiento térmico al final del cultivo.

La **figura 6.1b** muestra la concentración de glucosa a lo largo del cultivo, en donde la fuente de carbono principal es el almidón de la papa. El consumo de la fuente de carbono se inicia con la degradación del almidón por enzimas hidrolíticas como α -amilasas, secretadas por la bacteria, para la generación de azúcares más simples hasta la glucosa (Voet y Voet, 1995). La concentración de glucosa detectada a lo largo del cultivo es muy baja, por lo que la generación de este monosacárido fue muy poca o su consumo fue mayor a su generación. Por otra parte, la **figura 6.1b** muestra un incremento en el pH a lo largo del cultivo.

Al realizar bioensayos de antagonismo *in vitro* con el caldo de cultivo (libre de células) se observó que *B. subtilis* CPA produjo compuestos antifúngicos en el medio de papa, ya que la inhibición sobre *Fusarium* sp fue de un 22 % con respecto al crecimiento del hongo sin la presencia del caldo de cultivo. Sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, la bacteria no sintetizó compuestos antifúngicos termorresistentes en el medio de cultivo de

papa, ya que estos perdieron su actividad inhibitoria al someterlos al proceso de esterilización.

6.3 Cinéticas de crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* CPA en el medio mineral

En la **figura 6.3a** se presenta la cinética de crecimiento de *B. subtilis* CPA y la producción de esporas a lo largo del cultivo en el medio mineral. Se observó un incremento significativo en la concentración de esporas a partir de las 20 h de cultivo, lo que corresponde a 4 horas después de que la fuente de carbono (glucosa) se agotó completamente en el medio de cultivo (**figura 6.3b**). Esto coincide con lo reportado por Walker (2000), en términos de que el proceso de esporulación en bacterias del género *Bacillus* se presenta en un tiempo aproximado de 6 horas a partir del agotamiento del nutriente limitante. Por otra parte, el crecimiento de la bacteria no se vió limitado por la fuente de nitrógeno ya que el amonio no se agotó durante el cultivo (**figura 6.3b**). El pH disminuyó considerablemente (**figura 6.3c**), a diferencia del cultivo en el medio de papa (**figura 6.1b**). Shuler y Kargi (1992) reportaron que si el amonio es la única fuente de nitrógeno en cultivos de bacterias, los iones hidronio son liberados al medio como resultado de la utilización microbiana del amonio, resultando en una disminución del pH. Por otro lado, si la única fuente de nitrógeno es el nitrato, los iones hidronio son removidos del medio para reducir el nitrato a amonio, resultando un incremento en el pH, lo que puede explicar las diferencias observadas en la evolución del pH en el medio mineral y el medio de papa. La **figura 6.3b** muestra también que la disminución en el pH fue concomitante con el consumo de glucosa y el de sulfato de amonio.

En la **figura 6.3a** se observa una disminución en la concentración de células viables a partir de las 12 h del cultivo. A este tiempo, la bacteria no fue limitada por la fuente de

carbono (glucosa), ni por la fuente de nitrógeno (amonio) (**figura 6.3b**), por lo que el efecto del cambio en el pH a lo largo del cultivo, así como una baja concentración de sales presentes en el medio de cultivo ($MnCl_2$ y $MgSO_4$), que son requeridas por la bacteria durante el proceso de esporulación (Charney *et al*, 1951; Laskin y Lechevalier, 1984), pudieron ser la causa de la disminución de las UFC/ml. El efecto del pH se estudió posteriormente en fermentadores de 10 L (al escalar el proceso), mientras que para estudiar el efecto del $MnCl_2$ y $MgSO_4$ se realizaron experimentos en matraces agitados incrementando la concentración de éstas sales en el medio mineral.

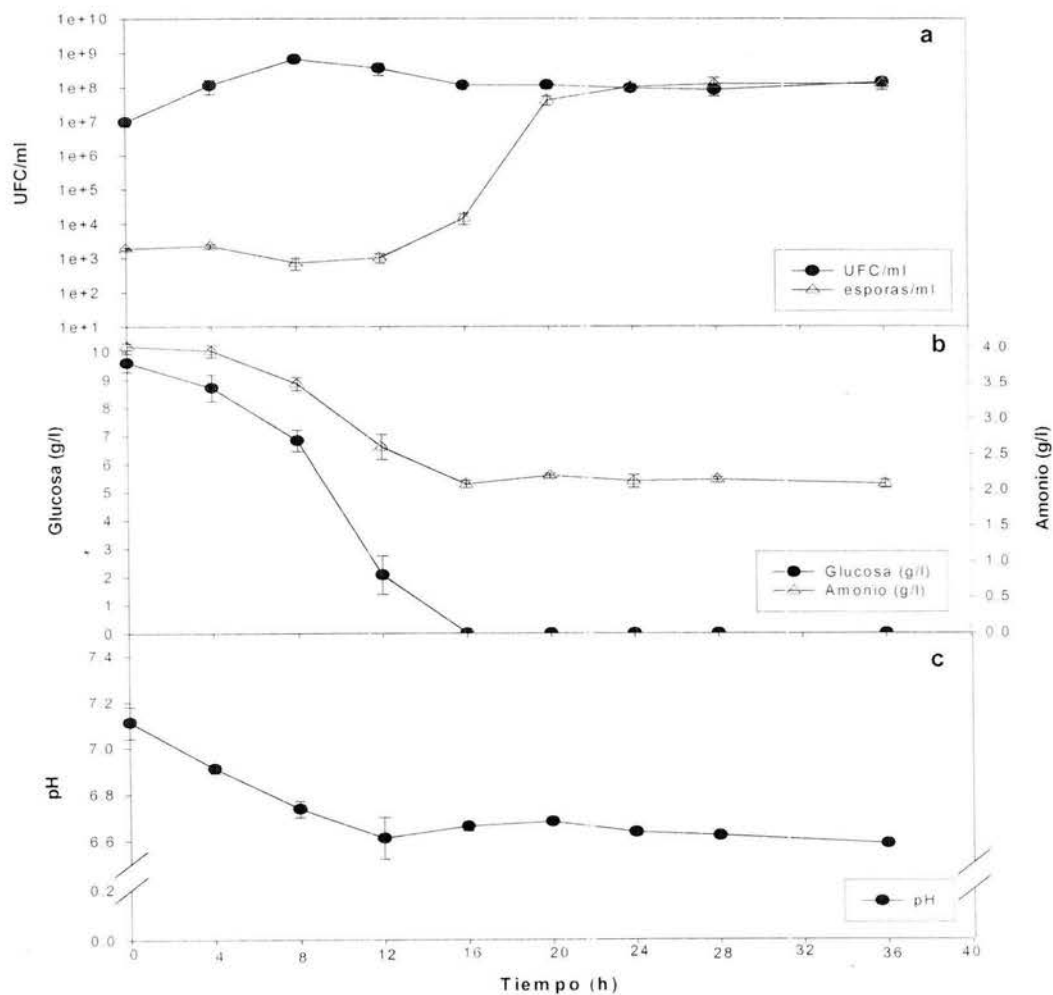


Fig. 6.3 Cinética de crecimiento y de esporulación de *B. subtilis* CPA en medio mineral, consumo de sustratos y evolución del pH.

6.3.1 Crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* CPA bajo diferentes concentraciones de $MnCl_2$ y $MgSO_4$

Los iones manganeso y magnesio son requeridos por bacterias del género *Bacillus* durante su proceso de esporulación (Charney et al, 1951; Laskin y Lechevalier, 1984). El medio mineral contiene estos elementos en forma de $MnCl_2$ y $MgSO_4$, sin embargo, la concentración de éstas sales puede ser deficiente durante la esporulación de *Bacillus subtilis* CPA, por lo que se incrementó su concentración en un 50 % y 100 %, con respecto a la concentración original en el medio mineral, para observar su efecto en el crecimiento y esporulación de *B. subtilis* CPA.

El crecimiento de *B. subtilis* CPA y la producción de esporas no se vieron afectadas al aumentar la concentración de $MnCl_2$ y $MgSO_4$ en un 50 % (**figura 6.4b**) y en un 100 % (**figura 6.4c**), ya que la concentración final de UFC/ml y esporas/ml a lo largo del cultivo fue la misma a la obtenida en el medio mineral original (**figura 6.4a**). La disminución de un orden de magnitud en la concentración de UFC/ml a partir de las 12 horas (sección anterior) no se debió a la falta de iones requeridos por *B. subtilis* CPA durante el proceso de esporulación, por lo que la concentración de estos iones no fueron deficientes en el medio mineral.

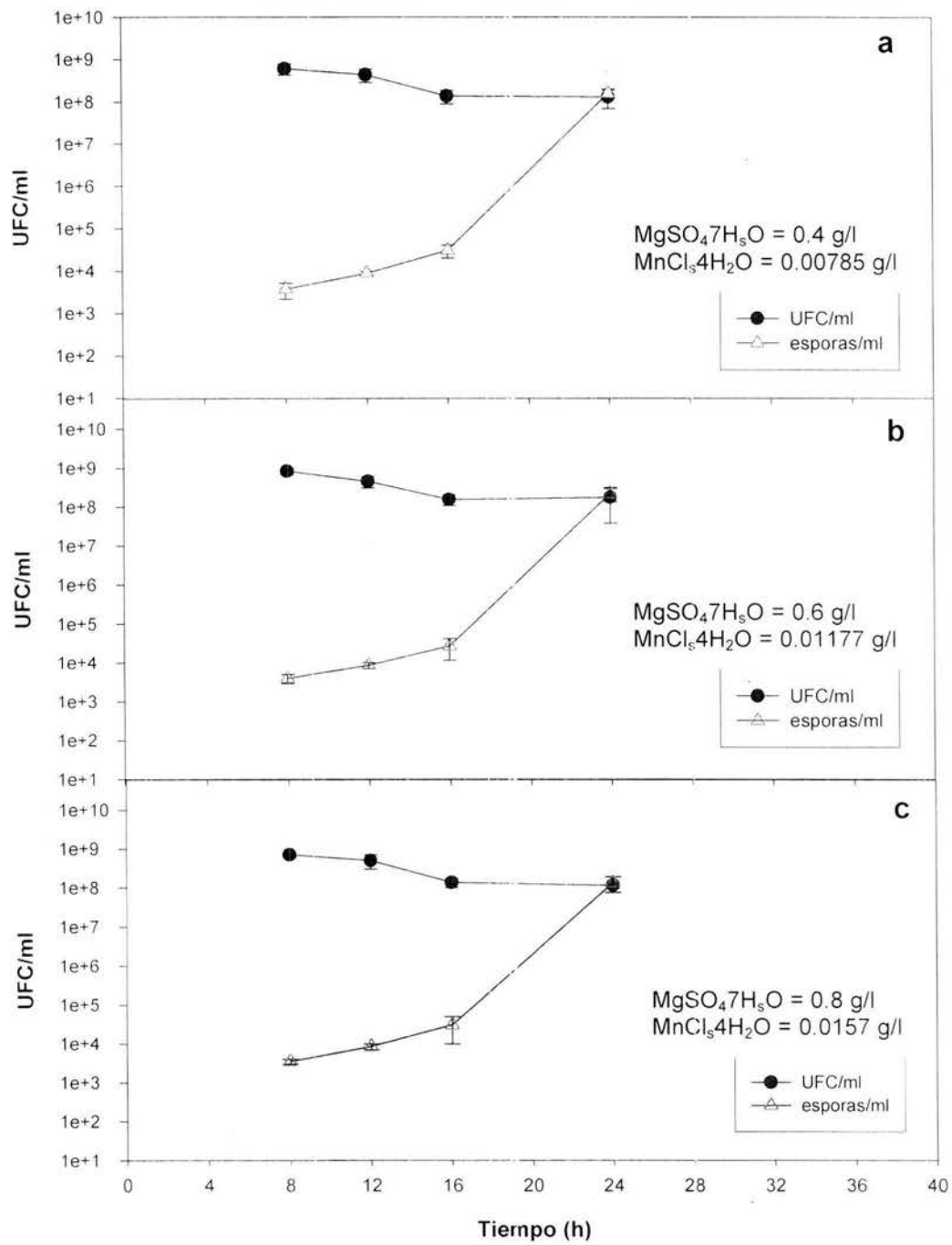


Fig. 6.4 Crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* CPA bajo diferentes concentraciones de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

6.4 Escalamiento de matraz a fermentador de 10 L

Para el escalamiento del proceso, se calculó una potencia volumétrica en matraz de 0.47 W/L, por lo que se requirió una velocidad de agitación de 230 r.p.m. (determinada experimentalmente en el dinamómetro) en el fermentador de 10 L para conseguir la misma potencia volumétrica.

La **figura 6.5a** compara las cinéticas de crecimiento en matraz y en fermentador de 10 L. A diferencia del matraz, la concentración de UFC en el fermentador no disminuyó un orden de magnitud a partir de las 12 h de cultivo, lo que probablemente se debió a limitaciones de transferencia de oxígeno para el caso del matraz.

En la **figura 6.5a** también se observa que la máxima concentración de UFC se alcanzó a las 8 h de cultivo, tanto en matraz como en fermentador. A este tiempo la bacteria no se vió limitada por la fuente de carbono (**figura 6.5c**) ni por la fuente de nitrógeno (**figura 6.6a**) por lo que el crecimiento de la bacteria, a partir de las 8 h, se vio limitado probablemente por la disminución del pH, tanto en matraz como en fermentador (**figura 6.6b**). El posible efecto inhibitorio del pH sobre el crecimiento de la bacteria se estudió posteriormente en fermentadores de 10 L.

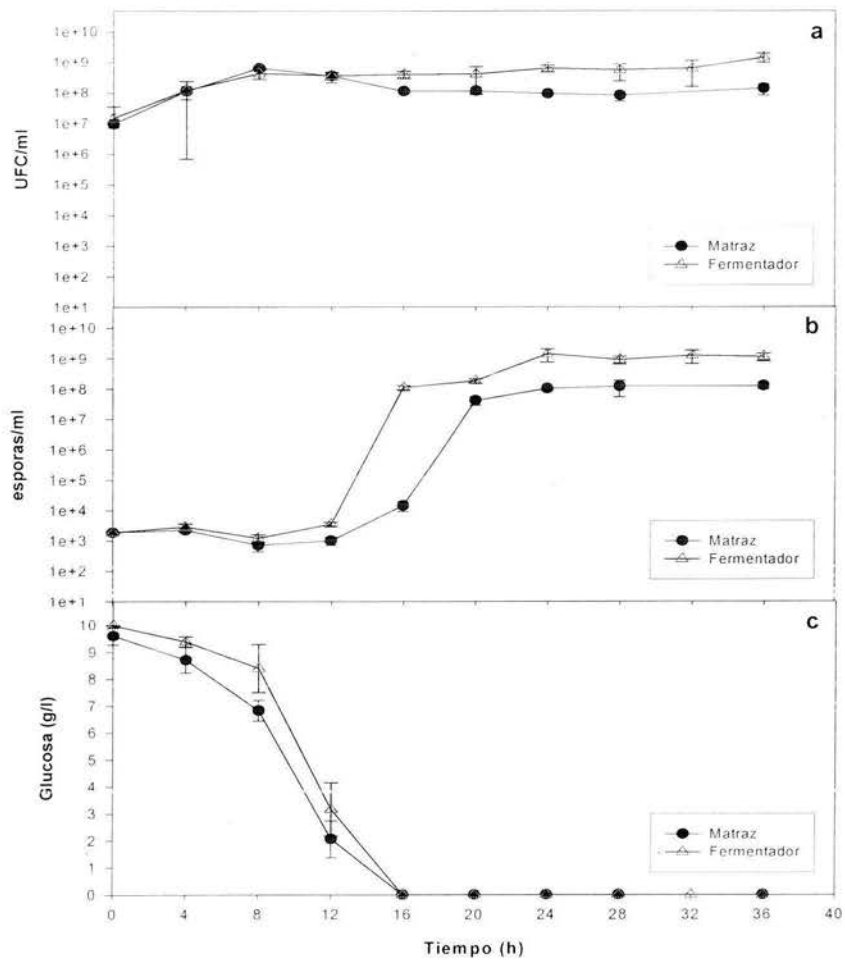


Fig. 6.5 Cinéticas de crecimiento, esporulación y consumo de la fuente de carbono en matraz y en fermentador.

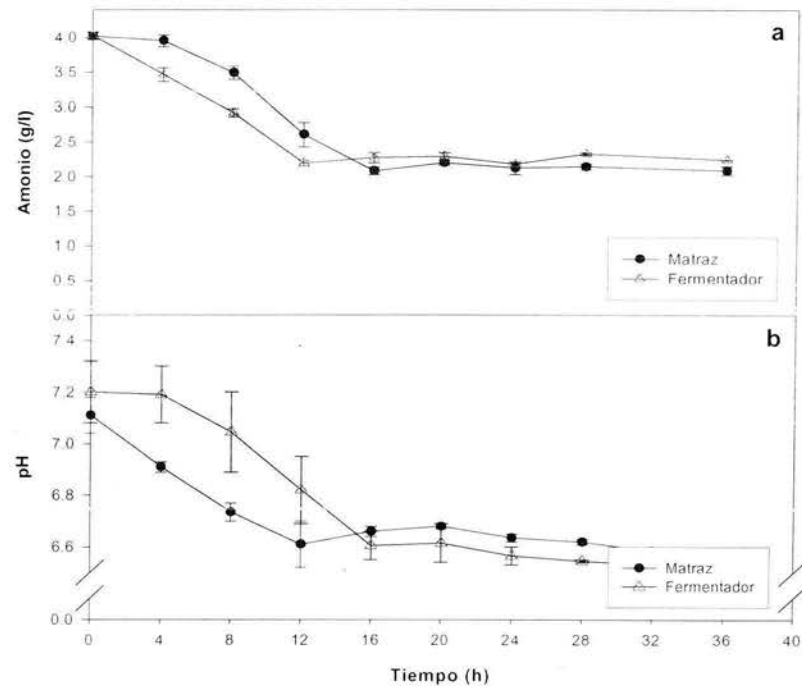


Fig. 6.6 Consumo de la fuente de nitrógeno y evolución del pH en matraz y en fermentador.

La **figura 6.5b** compara la producción de esporas a lo largo del cultivo en matraz y en fermentador. En ambos casos, la fuente de carbono (glucosa) fue el sustrato limitante (**figura 6.5c**), ya que la concentración de esporas se incrementó significativamente a partir de la limitación por este sustrato y la bacteria no se vió limitada por la fuente de nitrógeno (amonio) (**figura 6.6a**). Harwood y Cutting (1990) reportaron que la esporulación en bacterias del género *Bacillus* es inducida por la limitación de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno. La concentración final de esporas fue mayor en el fermentador que en el matraz, obteniéndose 1×10^9 esporas/ml en el fermentador y 1×10^8 esporas/ml para el caso del matraz.

6.4.1 Efecto del pH en el crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* CPA

Bacillus subtilis crece a un pH óptimo de 7 (Harwood y Cutting, 1990), por lo que se realizaron cultivos de *Bacillus subtilis* CPA en fermentadores de 10 L bajo condiciones no controladas y controladas de pH para observar el efecto de este sobre el crecimiento y la producción de esporas de la bacteria.

En las **figuras 6.7a** y **6.8a** se observa que la concentración máxima de UFC alcanzada fue de 1×10^9 cuando el pH disminuyó a lo largo del cultivo (**figura 6.7c**) y cuando fue controlado (**figura 6.8c**), por lo que la disminución en del pH no influyó en el crecimiento de *B. subtilis* CPA. Amanullah *et al* (2001) reportaron que en cultivos de *B. subtilis*, la máxima concentración de biomasa no fue afectada por fluctuaciones en el pH; sin embargo, el metabolismo de la bacteria si fue modificado.

La **figura 6.7a** muestra también que la concentración de esporas se incrementó significativamente a las 16 h del cultivo cuando el pH no fue controlado, mientras que para condiciones de pH controlado, la concentración de esporas se incrementó de manera significativa hasta las 20 h del cultivo (**figura 6.8a**), aunque la concentración final de esporas fue la misma para ambas condiciones. Probablemente, la disminución del pH representó una condición adversa para *B. subtilis* CPA y contribuyó a acelerar el proceso de esporulación en la bacteria.

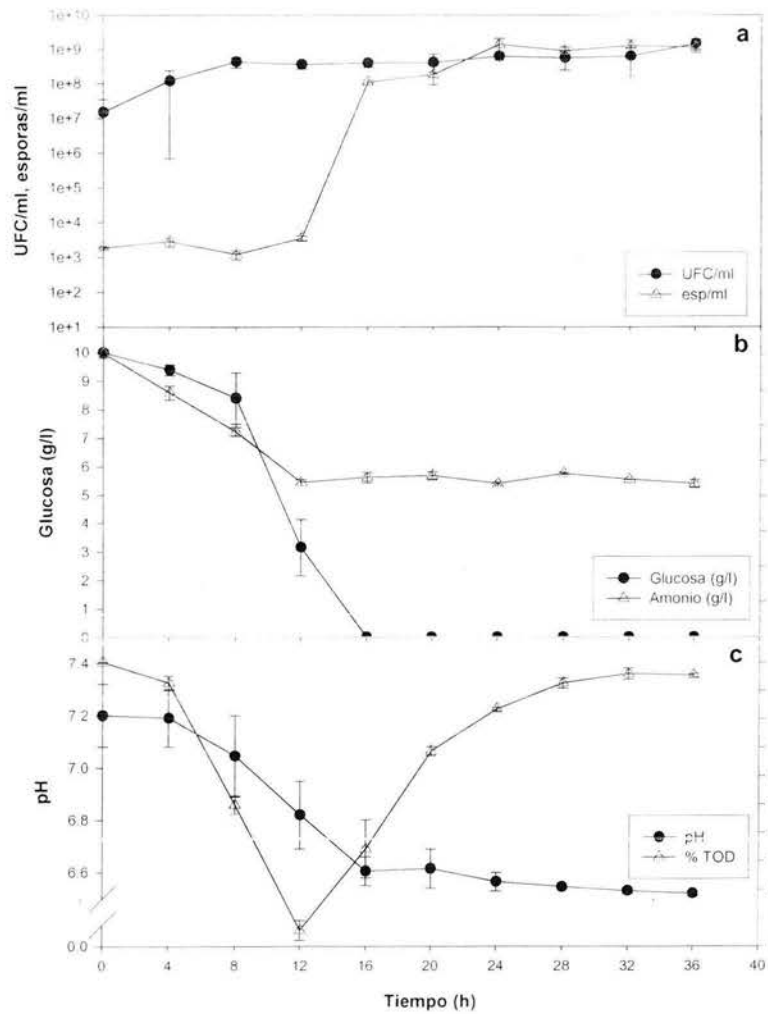


Fig. 6.7 Fermentación de *B. subtilis* CPA en condiciones de pH no controlado.

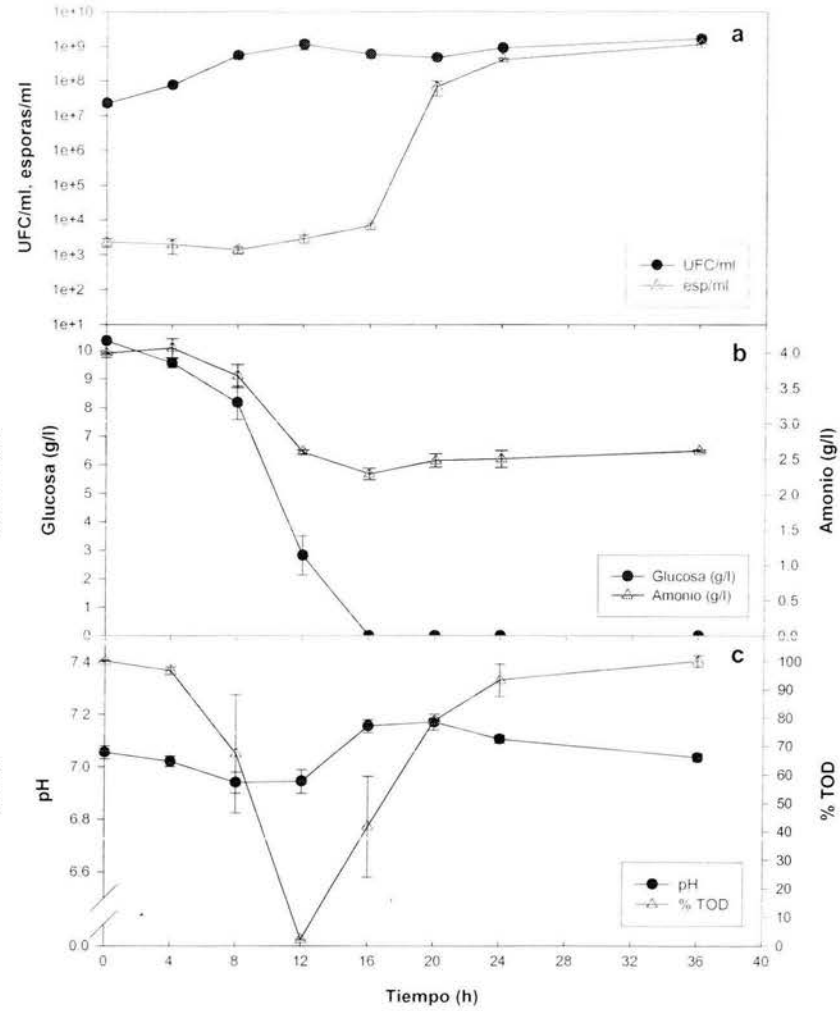


Fig. 6.8 Fermentación de *B. subtilis* CPA en condiciones de pH controlado.

Para ambas condiciones estudiadas, el consumo de la fuente de carbono (glucosa) y la fuente de nitrógeno (amonio) fueron muy similares (**figuras 6.7b y 6.8b**) y fueron concomitantes con la disminución del pH (**figura 6.6c**) y el porcentaje de oxígeno disuelto (TOD) (**figuras 6.7c y 6.8c**).

La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue cercana a cero a las 12 h de los cultivos (**figuras 6.7c y 6.8c**) y se incrementó a tiempos posteriores, cuando la bacteria inició su proceso de esporulación (**figuras 6.7a y 6.8a**), llegando a 100 % al final del cultivo, cuando se alcanzó la máxima concentración de esporas. Este incremento en el oxígeno disuelto asociado con el proceso de esporulación en *B. subtilis* CPA coincide con lo reportado por Park *et al* (1997), en donde la máxima producción de esporas de una cepa de *B. subtilis* representó un aumento en el porcentaje de oxígeno disuelto en cultivos en fermentador.

6.4.2 Producción de compuestos antifúngicos por *Bacillus subtilis* CPA en matraz y en fermentador de 10 L

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* utilizando el caldo del cultivo, esterilizado y sin esterilizar, de *Bacillus subtilis* CPA producido en matraz y en fermentador de 10 L a diferentes tiempos.

En la **figura 6.9a** se observa que entre las 4 y 8 h de cultivo, *Bacillus subtilis* CPA empezó a sintetizar compuestos antifúngicos en el matraz, ya que a partir de las 8 h se presentó inhibición sobre *Fusarium spp.* La inhibición sobre *Fusarium spp.* se incrementó a las 12 h para mantenerse constante a tiempos posteriores, por lo que entre las 8 y 12 h la bacteria sintetizó la mayor cantidad de compuestos antifúngicos. La **figura 6.9b** muestra que la bacteria sintetizó el(los) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s) entre las 4 y las 8 h de cultivo. Al comparar la **figura 6.9a** con la **figura 6.9b**, la diferencia en los porcentajes de inhibición a las 8 h puede indicar la posible existencia de dos tipos de compuestos antifúngicos: los resistentes a altas temperaturas y los que pierden su actividad bajo éstas condiciones. Es muy posible que algunos compuestos antifúngicos perdieron su actividad antimicrobiana durante el proceso de esterilización y por lo tanto el porcentaje de inhibición sobre *Fusarium spp.* disminuyó. Pusey y Wilson (1984) reportaron que la inhibición producida por los compuestos antifúngicos de una cepa de *B. subtilis* sobre *M. fructicola* disminuyó por efecto de la esterilización a altas temperaturas de éstos compuestos, aunque la actividad inhibitoria sobre éste hongo permaneció por la presencia de algún(os) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s). *B. subtilis* es un importante productor de compuestos antimicrobianos; sin embargo, en la literatura sólo se conoce

a la subtilina, antibiótico de naturaleza peptídica formado por 32 aminoácidos, que mantiene su actividad antimicrobiana a temperaturas altas (Stein y Entian, 2002; Banerjee y Norman, 1988).

En el caso del fermentador, *Bacillus subtilis* CPA sintetizó compuestos antifúngicos entre las 0 y 4 h, logrando sintetizar la mayor cantidad de estos en un período comprendido entre las 4 y 8 h (**figura 6.10a**). La síntesis del(los) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s) se presentó entre las 4 y 8 h (**figura 6.10b**). Al comparar la **figura 6.10a** con la **figura 6.10b**, la diferencia en la inhibición sobre *Fusarium spp* a las 4 h evidenció la presencia de dos tipos de compuestos antifúngicos producidos por la bacteria: compuestos termoestables y compuestos que pierden su actividad a altas temperaturas.

En el fermentador, la bacteria sintetizó la mayor cantidad de compuestos antifúngicos entre las 4 y 8 h de cultivo, a diferencia del cultivo en matraz, en donde la bacteria sintetizó la mayor cantidad de compuestos antifúngicos entre las 8 y 12 h de cultivo (**figura 6.9a y figura 6.10a**). Seguramente la producción de estos compuestos se vió favorecida por las condiciones controladas de aireación prevalecientes en el fermentador. Esto coincide con lo reportado por Wang *et al* (2002) donde mencionan que la producción de compuestos fungicidas, por dos cepas de *B. subtilis*, fue mayor al mejorar las condiciones de transferencia de oxígeno en matraces.

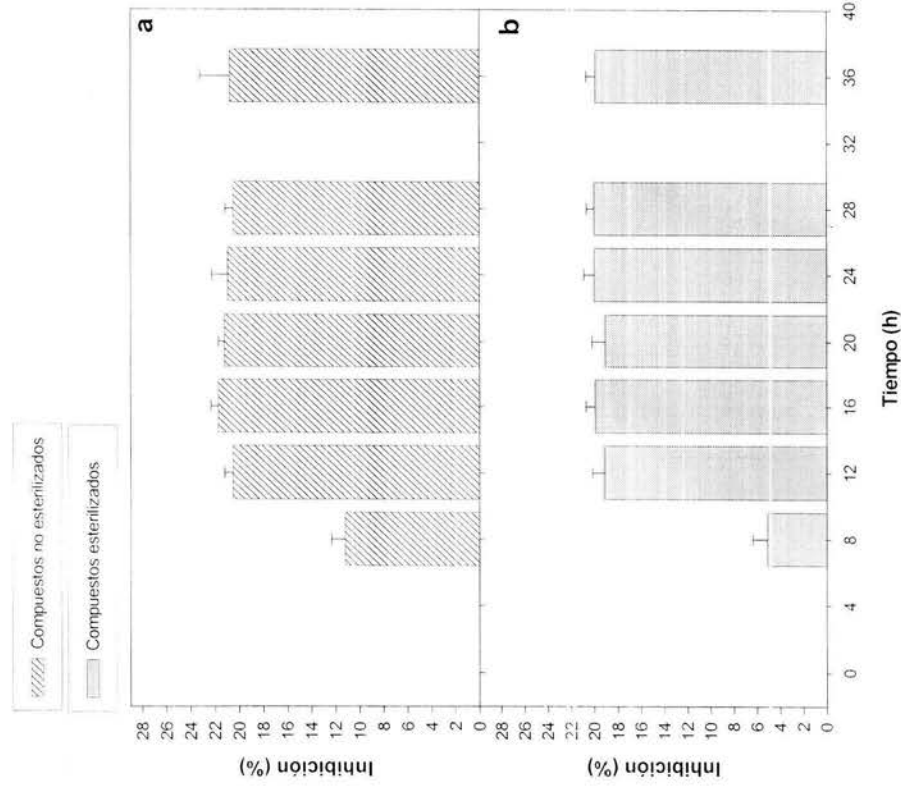


Fig. 6.9 Inhibición de *Fusarium* spp. producida por los compuestos antifúngicos producidos en matraz.

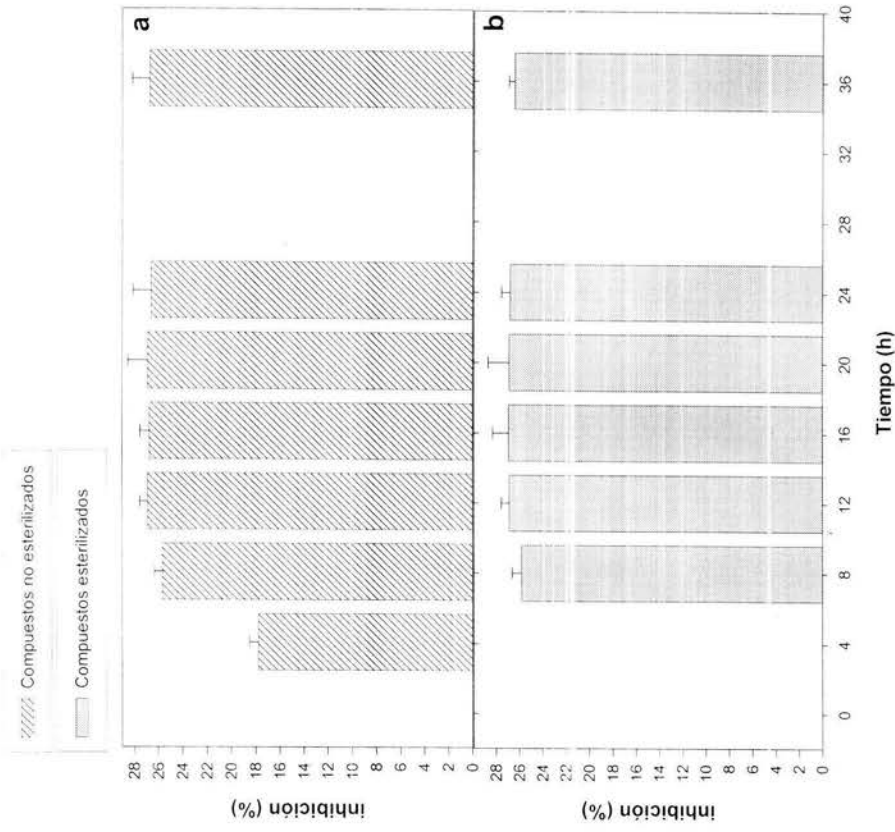


Fig. 6.10 Inhibición de *Fusarium* spp. producida por los compuestos antifúngicos producidos en fermentador de 10 L.

6.5 Escalamiento a fermentador de 30 L

Para llevar a cabo el escalamiento de fermentador de 10 L a fermentador de 30 L, se determinó una agitación de 235 r.p.m. (determinada a partir de una correlación empírica) en el fermentador de 30 L, para trabajar a una potencia volumétrica de 0.47 W/L.

En la **figura 6.11a** se compara la concentración de UFC a lo largo del cultivo en matraz y en fermentadores de 10 y 30 L. En el matraz, el valor final de UFC/ml fue de 1×10^8 , mientras que en los fermentadores la concentración fue mayor en un orden de magnitud, seguramente por problemas de transferencia de oxígeno en el matraz (como se mencionó en la **sección 6.4**). La **figura 6.11b** indica que en los fermentadores de 10 y 30 L, la concentración final de esporas fue mayor en un orden de magnitud a la obtenida en matraz. La producción de esporas inició a partir de la limitación por la fuente de carbono (**figura 6.11c**) en el matraz y en el fermentador de 10 L; sin embargo, en el fermentador de 30 L, la producción de esporas inició a partir de las 4 horas, cuando la bacteria no se encontraba limitada por la fuente de carbono (**figura 6.11c**). Una posible explicación a esto es que gran parte de la biomasa presente en el inóculo pudo haber iniciado su proceso de esporulación antes de la inoculación y finalizó éste proceso poco tiempo después en el fermentador, aunque no estuviera limitada por ningún nutriente. Lincoln (1960) reportó que en bacterias del género *Bacillus*, el proceso de esporulación es irreversible, ya que una vez iniciado, la bacteria debe de terminarlo hasta formar esporas maduras. En la **figura 6.11b** se observa que los cultivos en matraz y en fermentadores iniciaron con la misma concentración de esporas; sin embargo, el inóculo del fermentador de 30 L pudo contener una alta concentración de biomasa en proceso de esporulación, la cual no es termorresistente

sino hasta que finaliza este proceso (Driks, 2002). Las diferencias en los inóculos se pudieron deber a que las células presentes en el inóculo del fermentador de 30 L pudieron estar limitadas por oxígeno, ya que el nivel de llenado de los matraces para su preparación fue mayor al de los inóculos del matraz y el fermentador de 10 L, lo que pudo ser una condición limitante para la bacteria y desencadenar su proceso de esporulación.

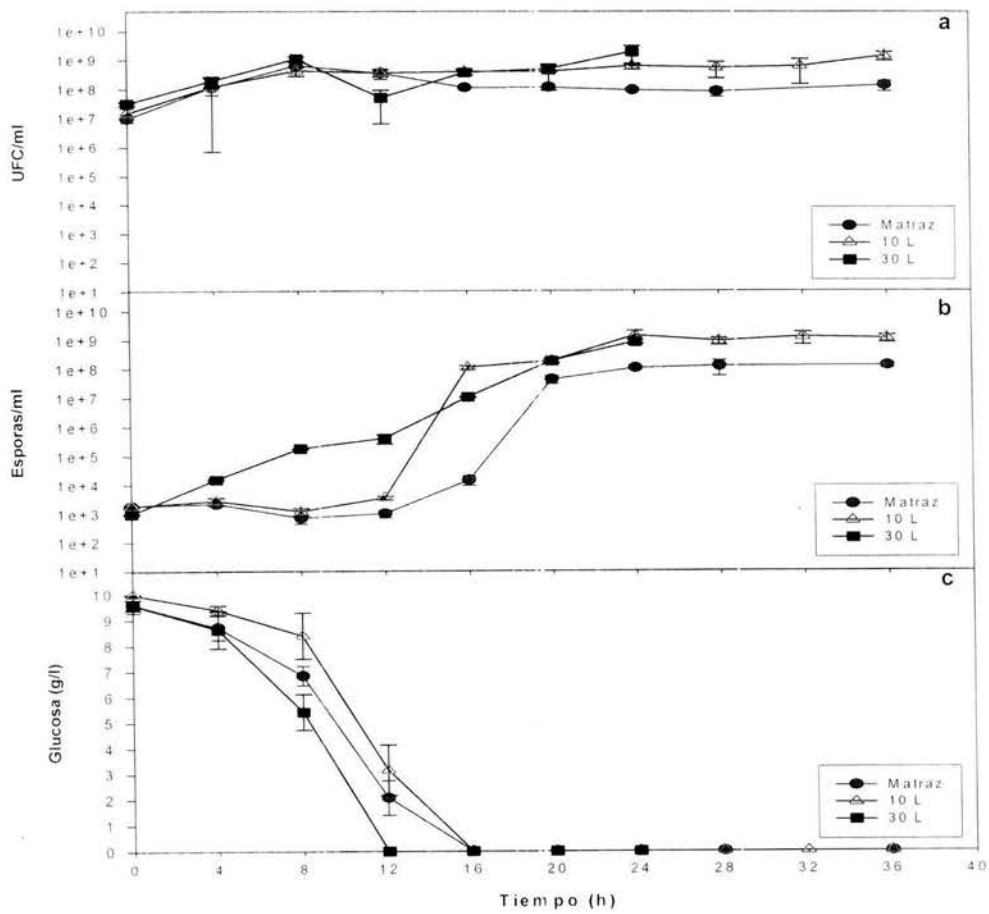


Fig. 6.11 Cinéticas de crecimiento, esporulación y consumo de la fuente de carbono en matraz y en fermentadores.

La fuente de carbono se agotó a las 12 h de cultivo en el fermentador de 30 L, mientras que para el matraz y el fermentador de 10 L, la fuente de carbono se agotó hasta las 16 h (**fig. 6.11 c**). Esta diferencia en cuanto al consumo de la fuente de carbono pudo deberse a diferencias en la capacidad de transferencia de oxígeno de los fermentadores. Para investigar esto se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) en ambos fermentadores mediante la técnica de eliminación de gas (Quintero, 1987). La **tabla 6.2** muestra que el k_{La} en el fermentador de 30 L fue mayor al del fermentador de 10 L, por lo que seguramente al crecer bajo mejores condiciones de oxigenación, la bacteria consumió los sustratos de manera más rápida.

Tabla 6.2 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en los fermentadores piloto.

Fermentador	k_{La} (h^{-1})
10 L	92.5
30 L	105.3

El consumo de la fuente de nitrógeno fue muy similar en el matraz y en los fermentadores, consumiéndose 2 g de amonio a lo largo de los cultivos, por lo que este sustrato no limitó el crecimiento de la bacteria (**figura 6.12a**).

En la **figura 6.12b** se observa que la tensión de oxígeno disuelto disminuyó como resultado de la actividad metabólica de la bacteria en los fermentadores de 10 y 30 L, posteriormente se incrementó a consecuencia de la disminución del consumo de

oxígeno, producto del incremento en la concentración de esporas, lo que coincide con lo reportado con Driks (2002) en términos de que las esporas son células metabólicamente inactivas en términos de consumo de oxígeno.

El pH disminuyó a lo largo de los cultivos en matraz y en fermentadores (**figura 6.12c**). La evolución del pH en los cultivos coincide con lo reportado por Nakata y Halvorson (1960) en donde mencionan que cuando *Bacillus cereus* crece en presencia de glucosa, el pH disminuye hasta 5-6 como resultado de la producción de ácidos orgánicos como el piruvato y el acetato.

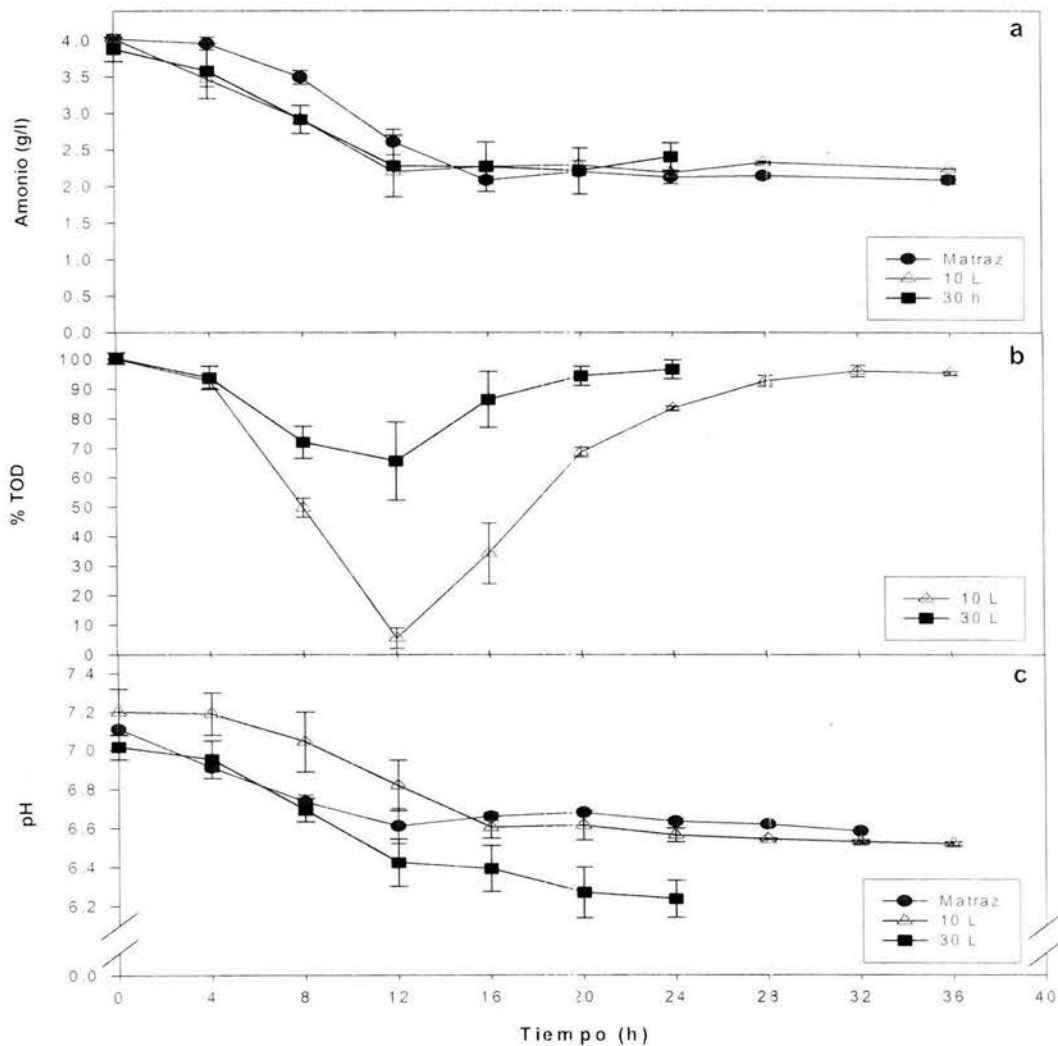


Fig. 6.12 Consumo de la fuente de nitrógeno, evolución del oxígeno disuelto y evolución del pH en matraz y en fermentadores.

6.6 Recuperación y balances en el secador por aspersión

Una vez establecido el proceso para la producción de esporas de *Bacillus subtilis* CPA y teniendo en cuenta la producción de compuestos antifúngicos termorresistentes por la bacteria, se procedió a formular un producto, mediante secado por aspersión, que contuviera esporas y compuestos antifúngicos.

Se secaron 3 lotes del fermentador de 30 L bajo dos condiciones: utilizando un soporte inerte (almidón de maíz) a una concentración de 4 % (p/V) y sin soporte. Para cada condición se secaron 12 L del caldo de cultivo y se cuantificó la concentración de sólidos totales y la concentración de UFC en cada muestra para determinar el porcentaje de recuperación de sólidos y el porcentaje de recuperación de UFC en el secador por aspersión.

La **tabla 6.3** muestra de manera detallada el balance de la recuperación de sólidos en el secador por aspersión. Para la determinación del porcentaje de recuperación de sólidos se determinaron los sólidos totales (biomasa, sólidos solubles, soporte) a secar en las muestras del caldo de cultivo y se relacionaron con los sólidos recuperados después del proceso de secado. La **tabla 6.3** muestra que el porcentaje de recuperación de sólidos fue mayor cuando se utilizó el soporte, obteniéndose un promedio de 77.1 % de recuperación, mientras que cuando se deshidrató el caldo de cultivo sin soporte, el promedio del porcentaje de recuperación fue de 50.1.

Tabla 6.3 Balance de sólidos en el secador por aspersion.

Lote	Soporte	Sólidos totales (g/l)	Sólidos totales a secar (g/12 l)	Sólidos recuperados (g)	% de recuperación
1	No	22.8	273.6	138.9	50.8
1	Si	62.8	753.6	590.4	78.3
2	No	23.1	277.5	154	55.5
2	Si	63.1	757.5	587.7	77.6
3	No	23.2	278.9	122.8	44.0
3	Si	63.2	758.9	571.9	75.4

La **tabla 6.4** detalla el balance de recuperación de UFC en el secador por aspersion. Para la determinación del porcentaje de recuperación de UFC se determinaron las UFC totales a secar, presentes en el caldo de cultivo antes del secado, y se relacionaron con las UFC recuperadas en el producto deshidratado. La **tabla 6.4** muestra que el porcentaje de recuperación de UFC fue mayor cuando se utilizó el soporte, obteniéndose un promedio de 83 % de recuperación, mientras que cuando se deshidrato el caldo de cultivo sin soporte, el promedio del porcentaje de recuperación fue de 50.94.

Tabla 6.4 Balance de UFC en el secador por aspersión.

Lote	Soporte	UFC/ml ($\times 10^9$)	UFC totales a secar (UFC/12 l) ($\times 10^{13}$)	UFC/g de producto seco ($\times 10^{10}$)	Producto seco recuperado (g)	UFC recuperadas ($\times 10^{12}$)	% de recuperación
1	No	1.1	1.32	5.0	138.9	6.5	49.6
1	Si	1.1	1.32	2.0	590.4	11.0	83.4
2	No	1.2	1.44	5.2	154.0	7.9	55.2
2	Si	1.2	1.44	2.0	587.7	11.7	81.6
3	No	1.0	1.20	4.7	122.8	5.8	48.1
3	Si	1.0	1.20	1.8	571.9	10.1	83.9

En la figura 6.12 se resumen los porcentajes de recuperación de sólidos y UFC presentados en las **tablas 6.3 y 6.4**. Durante el secado del producto, los sólidos se adhirieron a las paredes del secador por aspersión. Éste problema operacional fue más drástico al secar el caldo de cultivo sin soporte por lo que los porcentajes de recuperación fueron menores que los obtenidos al secar el caldo con soporte.

Dados los resultados anteriores, se determinó el uso del soporte para incrementar los porcentajes de recuperación en el secador por aspersión.

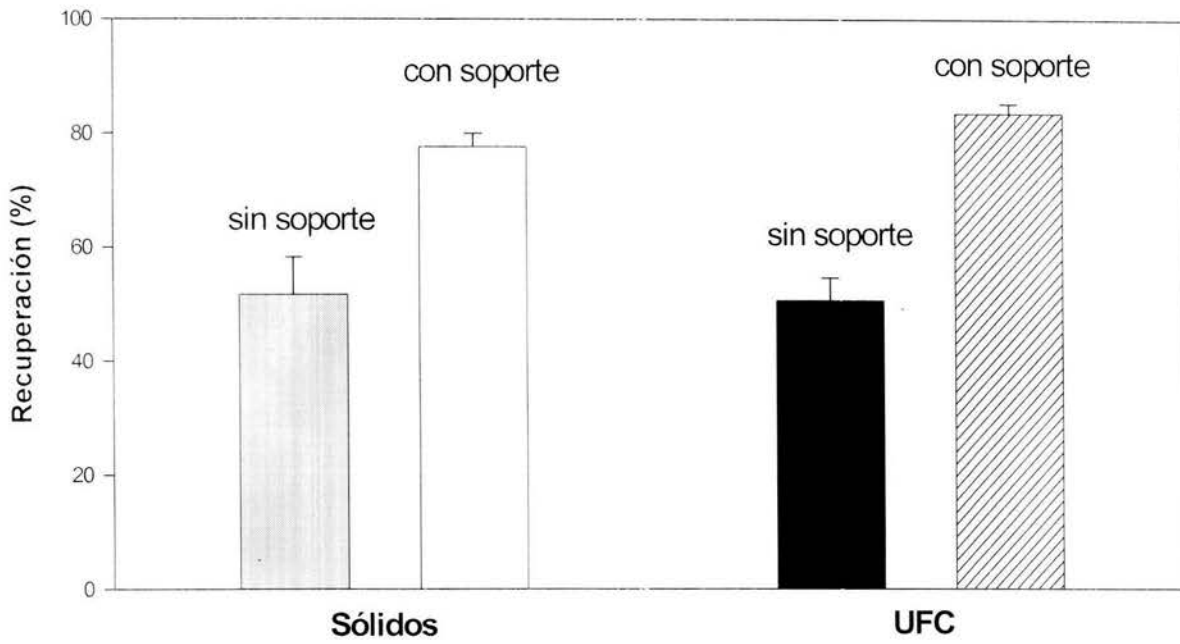


Fig. 6.13 Recuperación de sólidos y de UFC en el secador por aspersion.

6.7 Efecto del secado por aspersión sobre la concentración de esporas viables

Un soporte es un ingrediente inerte ya que no ejerce ningún efecto sobre el patógeno. El uso de un soporte, como el almidón de maíz, se justifica con el hecho de que, durante el secado, la remoción de moléculas de agua puede producir cambios conformacionales en carbohidratos, lípidos y proteínas. Se ha determinado que algunos carbohidratos pueden proteger el material biológico de la deshidratación al ocupar los lugares del agua con sus grupos OH y estabilizando los diferentes componentes celulares (Aguilera y Karen, 1997), por lo que se estudió el efecto del secado por aspersión sobre la viabilidad de las esporas al ser deshidratadas en presencia de un soporte inerte (almidón de maíz) y sin la adición de éste.

La determinación del efecto del secado sobre la concentración de esporas viables se realizó en base a los sólidos totales (biomasa, sólidos solubles, soporte) presentes en 1 ml del caldo de cultivo a secar. Se determinaron las UFC/ml en el caldo de fermentación antes del proceso de secado, para posteriormente relacionar los sólidos totales (biomasa, sólidos solubles, soporte) presentes en 1 ml del caldo de cultivo con las UFC presentes en la misma cantidad de sólidos del producto deshidratado y establecer un porcentaje de supervivencia. El porcentaje de supervivencia se determinó mediante la ecuación 6.1. En la **tabla 6.5** se detallan las variables utilizadas en la ecuación 6.1 y se muestra que la concentración de esporas viables no fue afectada después del proceso de secado, ya que el porcentaje de supervivencia fue alrededor de 100 aún cuando no se adicionó el soporte. Estos resultados coinciden con los de Pusey *et al* (1988), en donde los autores reportaron que al deshidratar un cultivo de *B. subtilis*, mediante secado por aspersión, la viabilidad de la bacteria fue prácticamente del 100 %, aunque no fueron reportadas las condiciones de operación

del secador, ni la forma en que se determinó el efecto del secador sobre la concentración de esporas viables.

$$\text{Supervivencia } \left[\begin{array}{c} \text{\%} \end{array} \right] = \frac{\left[\begin{array}{c} 100 \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} b \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} a \end{array} \right]} \quad (6.1)$$

Tabla 6.5 Viabilidad de las esporas después de la deshidratación mediante secado por aspersión.

Lote	Soporte	a UFC/ml (x10 ⁹)	Sólidos presentes en 1 ml de caldo de cultivo (g)	UFC/ g producto (x10 ¹⁰)	b UFC/g de producto equivalentes a los sólidos presentes en 1 ml de caldo de cultivo (x10 ⁹)	(a/b) Supervivencia (%)
1	No	1.1	0.0228	5.0	1.1	≥100
1	Si	1.1	0.0628	2.0	1.2	≥100
2	No	1.2	0.0231	5.2	1.2	≥100
2	Si	1.2	0.0631	2.0	1.3	≥100
3	No	1.0	0.0232	4.7	1.1	≥100
3	Si	1.0	0.0632	1.8	1.1	≥100

Los resultados anteriores muestran que el soporte no fue necesario como aditivo para proteger a las esporas de la deshidratación. Sin embargo, el uso del soporte se

justifica por el incremento en el porcentaje de recuperación del producto (**sección 6.6**) y por que podría servir como sustrato a la espora para germinar al momento de su aplicación.

6.8 Compuestos antifúngicos producidos por *Bacillus subtilis* CPA contenidos en los productos deshidratados

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* con el caldo de cultivo (libre de células), esterilizado y sin esterilizar, procedente del fermentador de 30 L para corroborar la producción del(los) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s).

La **tabla 6.6** muestra que *Bacillus subtilis* CPA sintetizó el(los) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s), ya que la inhibición sobre *Fusarium sp* fue del 25 % al someter el caldo de cultivo al proceso de esterilización, muy similar a la obtenida sin esterilizar el caldo de cultivo.

Para determinar si los compuestos antifúngicos mantuvieron su actividad inhibitoria sobre *Fusarium sp* después del secado por aspersion, se procedió de la siguiente manera: se calcularon los sólidos totales (biomasa, sólidos solubles, soporte) presentes en 50 μ l del caldo de cultivo (cantidad utilizada para realizar los bioensayos), posteriormente se pesó la misma cantidad de sólidos de los productos deshidratados y se suspendieron en 50 μ l de agua destilada. Ésta suspensión se esterilizó por filtración y se realizaron los bioensayos de antagonismo con el filtrado.

En la **tabla 6.6** se observa que los compuestos antifúngicos producidos por la bacteria mantuvieron prácticamente el mismo efecto inhibitorio sobre *Fusarium sp* después del secado por aspersión. Ello ocurrió tanto en el producto con soporte como en el producto sin soporte. El secado no afectó la actividad inhibitoria de los compuestos producidos por la bacteria y el soporte no fue necesario para proteger los compuestos antifúngicos producidos por la bacteria.

Tabla 6.6 Inhibición producida por los compuestos antifúngicos producidos por *B. subtilis* CPA en el medio de cultivo y en los productos deshidratados.

Compuestos antifúngicos	Inhibición (%)
Sin esterilizar	26
Esterilizados	25
Producto sin soporte	27
Producto con soporte	25

6.9 Concentración de esporas viables y a_w a través del tiempo en los productos deshidratados

La **figura 6.14** muestra los promedios de las esporas viables a lo largo del tiempo en los productos deshidratados de los 3 lotes de fermentación. La cantidad de esporas viables (por g de producto) se mantuvo prácticamente constante a lo largo de 6 meses tanto en los productos con soporte como en los productos sin soporte.

Janisiewicz y Korsten (2002) mencionan que un producto de control biológico con una vida de anaquel menor a 6 meses requiere de su aplicación casi inmediata, por la rápida pérdida en la concentración de células o esporas viables, mientras que un producto con una vida de anaquel de entre 0.5-2 años es útil para su comercialización.

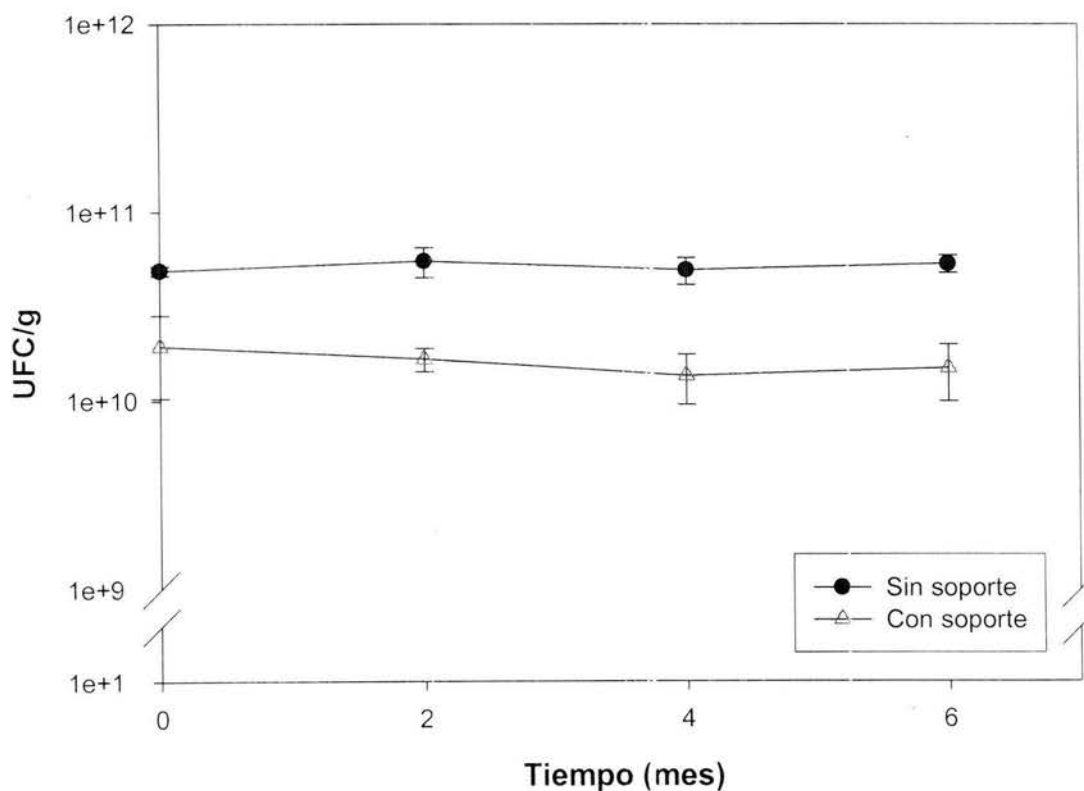


Fig. 6.14 Esporas viables en los productos deshidratados a través del tiempo.

Una función importante de una formulación es regular la disponibilidad de agua (a_w). Un incremento en la humedad regularmente causa que los microorganismos pierdan su dormancia. Se sabe que los microorganismos pierden su viabilidad a medida que la a_w es mayor a 0.83 (Fravel *et al*, 1998). Bajo éstas condiciones, también se estimula el crecimiento de microorganismos contaminantes (Fravel *et al*, 1998). La **figura 6.15** muestra los promedios de la a_w a lo largo del tiempo en los productos deshidratados de los 3 lotes de fermentación. Se observa que, tanto en el producto con soporte como en el producto sin soporte, la a_w se mantuvo prácticamente constante y muy por debajo del valor de 0.83, por lo que se obtuvieron productos suficientemente secos para evitar la pérdida en la concentración de esporas viables por efecto de altos valores de a_w .

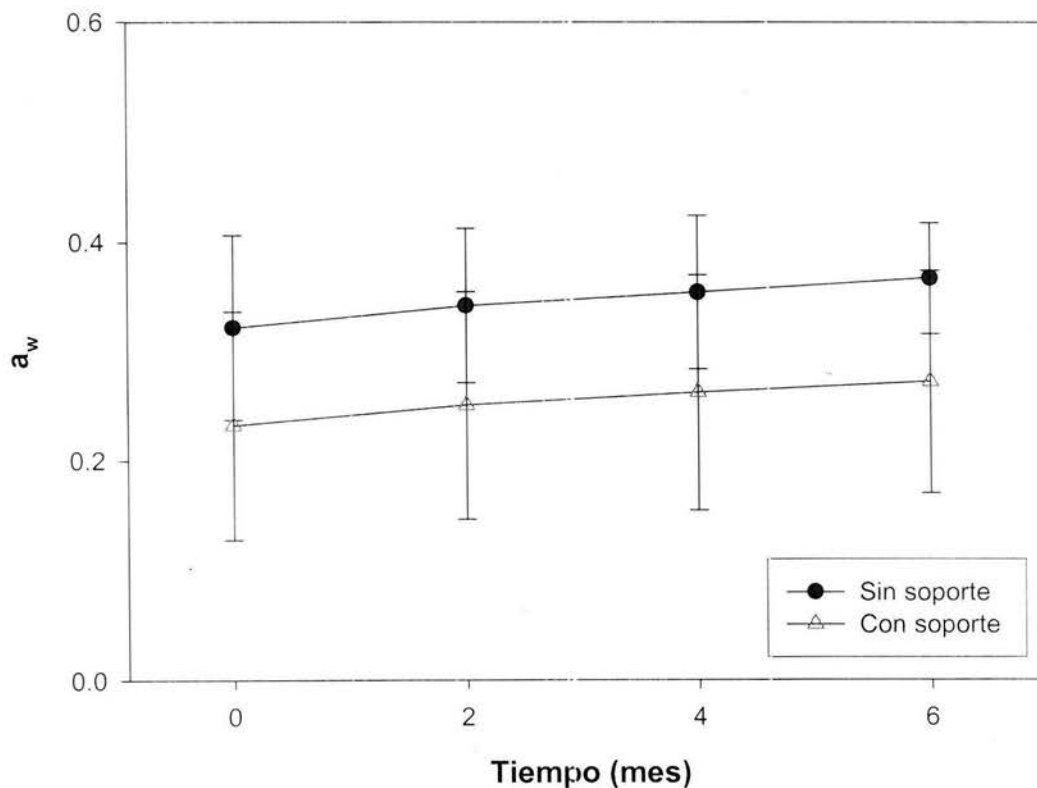


Fig. 6.15 a_w en los productos deshidratados a través del tiempo.

6.10 Bioensayo *in vitro* con *Bacillus subtilis* CPA y “Serenade”

Se comparó el formulado de *B. subtilis* CPA (con soporte) con el producto comercial “Serenade” en condiciones *in vitro*.

Inicialmente se prepararon dos suspensiones con una concentración de 1×10^8 UFC/ml del formulado de *B. subtilis* CPA y el producto comercial “Serenade” (con una concentración de 1×10^9 esporas/ml) para posteriormente realizar bioensayos de antagonismo contra *Fusarium sp.*

También se realizaron bioensayos para observar el efecto antagónico de los compuestos antifúngicos presentes en los dos productos contra *Fusarium sp.* Se resuspendieron 0.5 g de cada uno de los productos en 10 ml de agua destilada, las suspensiones se esterilizaron por filtración para eliminar las esporas presentes y se realizaron bioensayos *in vitro* con el filtrado conteniendo los compuestos antifúngicos de los productos.

La **tabla 6.7** muestra que *B. subtilis* CPA y el *B. subtilis* del producto “Serenade” mostraron porcentajes de inhibición muy similares al antagonizar a *Fusarium sp.* Similarmente, los compuestos antifúngicos presentes en cada uno de los formulados presentaron prácticamente los mismos porcentajes de inhibición sobre *Fusarium sp* (**tabla 6.8**).

Tabla 6.7 Inhibición producida por *B. subtilis* CPA y el producto "Serenade" sobre *Fusarium sp.*

Producto (1×10^8 UFC/ml)	Inhibición (%)
"Serenade"	46
<i>Bacillus subtilis</i> CPA	44

Tabla 6.8 Inhibición producida por los compuestos antifúngicos del formulado de *B. subtilis* CPA y el producto "Serenade" sobre *Fusarium sp.*

Producto	Inhibición (%)
"Serenade"	27
<i>Bacillus subtilis</i> CPA	26

6.11 Pruebas de campo con *Bacillus subtilis* CPA y el producto comercial

"Serenade"

En la **figura 6.16** se muestran los rendimientos totales del cultivo de papa de la variedad *Gigant* bajo diferentes tratamientos. El mayor rendimiento del cultivo se obtuvo con el tratamiento 6, el cual correspondió a la bacterización más dos aplicaciones foliares de *Bacillus subtilis* CPA. Sin embargo, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos y se descartó el efecto de los bloques en el experimento. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Aranda (1997), en donde la aplicación de *B. subtilis* CPA incrementó el rendimiento en cultivos de papa de la variedad *Alpha* y *Atlántic*, encontrándose diferencias significativas

en los resultados. Algunas posibles explicaciones a esto incluyen el hecho de que las pruebas realizadas por Aranda (1997) fueron bajo condiciones de invernadero, la bacteria se produjo en el medio de papa y su aplicación se realizó junto con el medio de cultivo agotado, el cual seguramente contenía nutrientes que beneficiaron el desarrollo de la planta. Además, las aplicaciones se realizaron semanalmente en un período de 3.5 meses.

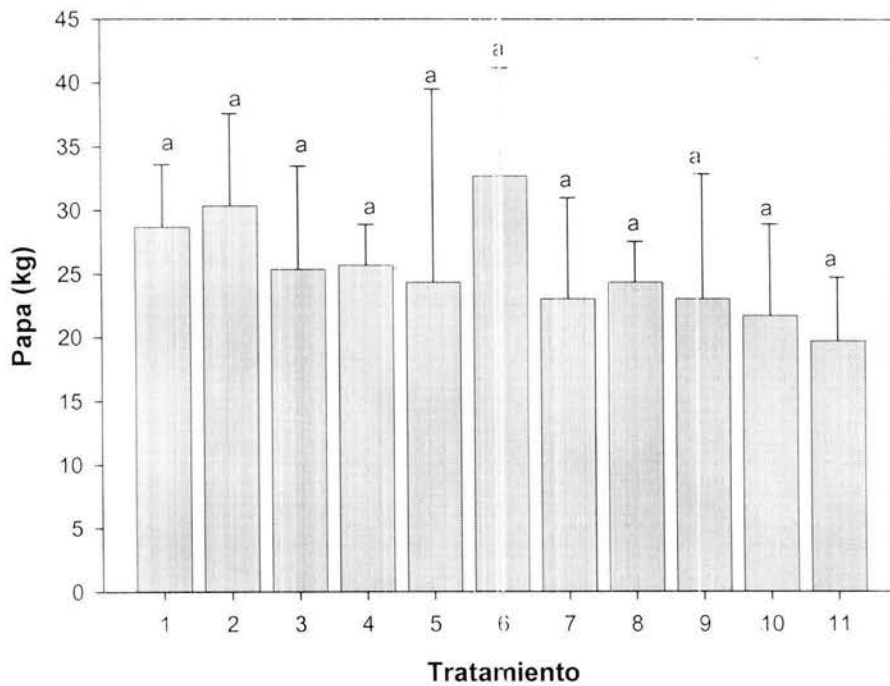


Fig. 6.16 Rendimiento del cultivo de papa bajo diferentes tratamientos.

Al analizar los rendimientos del cultivo en base al tamaño de los tubérculos por categorías, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, y se descartó el efecto de los bloques en el experimento.

La **figura 6.17** muestra la distribución en la sanidad de los tubérculos con respecto a la presencia de *R. solani*. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos al

evaluar el número de tubérculos sanos (calificación 0). El tratamiento que corresponde a la bacterización más dos aplicaciones foliares con *B. subtilis* CPA (tratamiento 6) fue el que representó una mayor cantidad de tubérculos sanos (calificación 0) y una menor cantidad de tubérculos de calificación 3. En la gráfica se observa que, en el testigo (tratamiento 1), la distribución de la enfermedad es muy homogénea, teniéndose la mayor cantidad de tubérculos de calificación 3, mientras que cuando se aplicó *B. subtilis* CPA y "Serenade" se obtuvieron un mayor número de tubérculos de calificación 0 (tubérculos sanos) y tubérculos con calificación 1.

La mejor distribución hacia tubérculos sanos se obtuvo cuando se bacterizó la semilla y se realizaron dos aplicaciones foliares con *B. subtilis* CPA (tratamiento 6), por lo que la aplicación intensiva del producto de *B. subtilis* CPA fue el mejor tratamiento para contrarrestar la enfermedad.

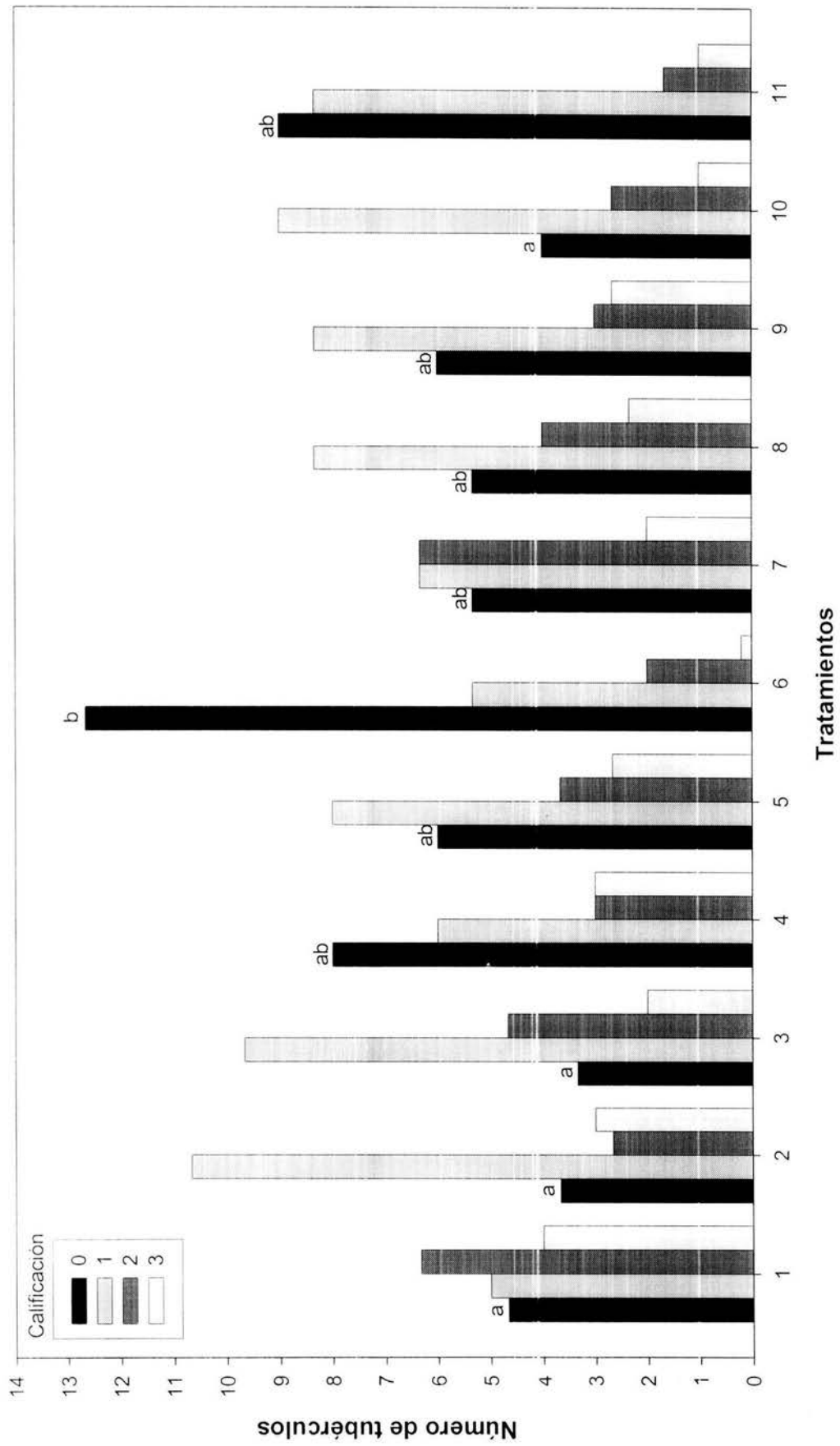


Fig. 6.17 Distribución de la enfermedad en los diferentes tratamientos.

7. Conclusiones

- Desde el punto de vista del proceso, el criterio para el escalamiento de matraz a fermentador de 10 L se considera adecuado, ya que se obtuvo una mayor concentración de esporas y la síntesis de compuestos antifúngicos termorresistentes se presentó en un tiempo de fermentación más corto.
- Al escalar del fermentador de 10 L al fermentador de 30 L, el criterio de P/V fue el adecuado ya que se obtuvo la misma concentración de esporas (1×10^9 esporas/ml) en los dos fermentadores.
- Se logró desarrollar un proceso en cultivo sumergido para la producción de *B. subtilis* CPA utilizando un medio de cultivo químicamente definido.
- El proceso de secado no afectó la concentración de esporas viables de *B. subtilis* CPA, ni la actividad antimicrobiana de los compuestos antifúngicos producidos por la bacteria.
- El soporte no fue necesario como agente protector de las esporas ni de los compuestos antifúngicos presentes en el caldo de fermentación; sin embargo, su uso incrementó el porcentaje de recuperación de sólidos y de UFC en el secador por aspersión.

- Se obtuvo un formulado, utilizando almidón de maíz como soporte, a base de esporas de *Bacillus subtilis* CPA y sus productos de fermentación con una concentración de $1-2 \times 10^{10}$ esporas/g, el cual ha conservado la misma concentración a lo largo de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.
- Las pruebas *in vitro* con *B. subtilis* CPA y el producto "Serenade" mostraron ser muy similares en cuanto a la capacidad de las cepas y de los compuestos antifúngicos presentes en los formulados para antagonizar a *Fusarium sp.*
- *B. subtilis* CPA y el producto "Serenade" no incrementaron el rendimiento en el cultivo de papa; sin embargo, su uso disminuyó la presencia de esclerosios producidos por el patógeno *R. solani*, siendo la aplicación intensiva de *B. subtilis* CPA el tratamiento más efectivo para este propósito.

8. Perspectivas

- Cuantificar e identificar los productos antifúngicos producidos por *B. subtilis* CPA en el medio mineral.
- Determinar las condiciones de cultivo que influyen la producción del(los) compuesto(s) antifúngico(s) termorresistente(s) por *B. subtilis* CPA.
- Realizar estudios en el secador por aspersión a diferentes temperaturas y diferentes porcentajes de soporte para determinar su efecto en el porcentaje de recuperación del producto y eliminar problemas operacionales en el secador.
- Realizar aplicaciones más intensivas del producto en campo y probar diferentes formas de inoculación de la bacteria.

9. Bibliografía

- Aguilera, J. and Karen, M. 1997. Preservation of biological materials under desecation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37(3):287-309.
- Amanullah, A., McFarlane, C.M., Emery, A.N. and Nienow, A.W. 2001. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 73(5):390-399.
- Aranda, O. 1997. Evaluación de *Bacillus subtilis* como agente de control en enfermedades fungosas del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) y su efecto en el rendimiento bajo condiciones de invernadero. *Tesis de Maestría*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México.
- Azizbekyan, R., Kuzin, A., Nikolaenko, M., Smirnova, T. and Shamshina, T. 2001. Biological control of plant fungal diseases. *IOBC Bulletin* 24 (3):93-95.
- Backman, P.A., Brannen, P.M. and Mahaffee, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*. South Australia pp. 3-8.
- Banerjee, S. and Norman, J.H. 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263:9508-9514.
- Belghith, H., Chaabouni, S.E. and Gargouri. 2001. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology* 28:253-258.

- Besson, F. and Michel, G. 1986. Isolation and characterization of new iturins: Iturin D and iturin E. *Journal of Antibiotics* 40(4):437-442.
- Broadbent, P.K., Baker, K.F., Franks, N. and Holland, I. 1977. Effect of *Bacillus sp* on increased growth of seedlings in steamed and nontreated soil. *Phytopathology* 67:1027-1034.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., and Zoels, B. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary machines. I Power consumption measurements in unbaffled flasks at low viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* 68:589-593.
- Chang, I. and Kommedahl, T. 1968. Biological control of seedlings blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology* 58:1395-1401.
- Charney, J.C., Fischer, W.P., and Hegarty, C.P. 1951. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *Journal of Bacteriology* 62:145-148.
- Clegg, J.S. 1986. The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents. The "Water replacement hypothesis". In: *Membranes, Metabolisms and Dry organisms*. Cornell University. Ithaca. pp. 169-187.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31:53-80.
- Doi, R.H. and McGloughlin, M. 1992. Production of Commercially Valuable Products. In: *Biology of Bacilli Applications to industry*. Butterworth-Heinemann. U.S.A. p. 318.
- Driks, A. 2002. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:389-391.
- Eckert, J.W. and Ogawa, J.M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology* 23:421-454.
- Ellard, D.J. and Lundgren, D.G. 1966. Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* in a chemically defined medium. *Journal of Bacteriology* 92:1748-1764.

- Emmert, E.A.B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *Fems Microbiology Letters* 171:1-9.
- Ferreira, J.H.S., Matthee, F.N. and Thomas, A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* of grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81:283-287.
- Flores, E.R., Pérez, F. and De la Torre, M. 1997. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83(6):561-564.
- Fravel, D., Connick, W.J. Jr., Lewis, J.A. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides, In: *Formulation of microorganisms to control plant diseases*. Burges H.D, Boston, pp. 187-202.
- Fry, R.M. 1954. The preservation of bacteria. In: *Biological Applications of Freezing and Drying*. Academic Press. London. pp. 215-252.
- Fucikovsky, L. 1999. La tristeza y la muerte del Agave tequilana Weber Var. Azul (TMA). *Memorias del IV Simposio Internacional y V Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible*. Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, A.C., p. 322.
- Galindo, E. 1996. Traslación de escala. *Notas del XXI Curso Latinoamericano de Ingeniería Bioquímica*. Valparaíso, Chile, pp. 209-227.
- Geankoplis, C.J. 1998. Secado de materiales de proceso. En: *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. CECSA, México, D.F., pp. 579-584.
- Guedner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G. and Cutler, H.G. 1988. Isolation and identification of iturines as antifungal peptides in biological control of peach-brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36:366-370.

- Harvey, J.M. 1978. Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. *Annual Review of Phytopathology* 16:321-341.
- Harwood, C.R. 1989. Sporulation and Germination. In: *Bacillus*. Plenum Press, New York, pp. 169-205.
- Harwood, C.R. and Cutting, S.M. 1990. Sporulation, germination and outgrowth. In: *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, New York, pp. 391-449.
- Hsu, Y.L. and Wu, W.T. 2002. A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal* 11:123-130.
- INEGI.1997. Cultivos Anuales de México. *VII Censo Agropecuario*. p. 293.
- Janisiewicz, W.J. and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.
- Jiang, Y.M., Zhu, X.R., and Li, Y.B. 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 34:430-436.
- Kaplan, A. 1965. Urea nitrogen and urinary ammonia. *Standard Methods in Clinic Chemistry* 5:245-256.
- Katz, E. and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews* 41:449-474.
- Korsten, L., De Villiers, E.E., Wehner, F.C. and Kotzé, J.M. 1997. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81:455-459.
- Krauss, U., Matthews, P., Bidwell, R., Hocart, M. and Anthony, F. 2001. Strain discrimination by fungal antagonists of *Colletotrichum musae*: implications for biocontrol of crown rot of banana. *Mycological Research* 105(1):67-76.

- Kunioka, M. and Goto, A. 1994. Biosynthesis of poly(α -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40:867-872.
- Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. 1984. Effect of nutrition on cellular differentiation in prokaryotic microorganisms and fungi. In: *CRC Handbook of Microbiology*. CRC, Boca Raton, pp. 17-121.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. and Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87(11):1103-1110.
- Lincoln, R.E. 1960. Control of stock culture preservation and inoculum build-up in bacterial fermentations. *Journal of Biochemistry Microbiology and Technology Engineering* 2:481-500.
- Mannanov, R.N. and Sattarova, R.K. 2001. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chemistry of Natural Compounds* 37(2):117-123.
- Martin, M and Gottlieb, D. 1955. The production and role of antibiotics in soil. V. Antibacterial activity of five antibiotics in the presence of soil. *Phytopathology* 45:407-411.
- Martínez, A., Ramírez, O. T. and Valle, F. 1997. Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47:40-45.
- McKeen, C., Reilly, C. and Pusey, P. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76:136-139.
- Nakata, H.M. and Halvorson, H.O. 1960. Biochemical changes occurring during growth

- and sporulation of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 80:801-810.
- Nishio, C., Komura, S., and Kurahashi, K. 1983. Peptide antibiotic subtilin is synthesized via precursor proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 116:751.
- Park, Y., Uehara, H., Teruya, R. and Okabe, M. 1997. Effect of culture temperature and dissolved oxygen concentration on expression of α -amylase gene in batch culture of spore-forming host, *Bacillus subtilis* 1A289. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84(1):53-58.
- Pusey, P.L., Hotchkiss, M.W., Dulmage, H.T., Baumgardner, R.A., Zehr, E.I., Reilly, C.C. and Wilson, C.L. 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Disease* 72:622-626.
- Pusey, P.L and Wilson, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68:753-756.
- Quintero, R. 1987. Escalamiento. En: *Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones*. Alambra, México, D.F., pp. 97-114.
- Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio G., and Galindo, E. 1991. A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurement in stirred tanks. *Chemical and Engineering Technology* 14:105-108.
- Richard, A. and Margaritis, A. 2003. Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 82:299-305.
- Roncal, M., Fucikovsky, L. y Khalil, A. 1991. Efecto de dos especies de *Bacillus* y ajo sobre *Pseudomonas solanacearum* en papa. *Agrociencia*, Serie Protección Vegetal. 2(2), Mayo-Agosto. pp. 97-107.

- Rubio, C., Rangel, G., Flores, L., Magallanes, G. y Díaz, H. 2000. *Manual para la producción de papa en las sierras y valles altos del centro de México*. SAGAR. INIFAP. CIRCE. Campo experimental Valle de Toluca. Libro Técnico No. 1. Edo. de México, México. pp: 1-3, 45-59.
- Rytter, J.L., Lukezic, F.L., Craig, R. and Moorman, G.W. 1989. Biological control of geranio rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 79:367-370.
- Salgado, S. 1994. Control biológico de enfermedades en frutos de postcosecha mediante *Bacillus subtilis*. *Tesis de Maestría*. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Edo. de México.
- Schmiedeknecht, G., Issoufou, I., Junge, H., and Bochow, H. 2001. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108(5):500-512.
- SEP. 1990. *Manuales para educación agropecuaria*. Manual 17: Papas. Área: Producción vegetal. Trillas, pp. 11-13, 21.
- Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J-P. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* 54:704-711.
- Shuler, M.L and Kargi, F. 1992. How cells grow. In: *Bioprocess Engineering. Basic concepts*. Prentice Hall Int., New Jersey, U.S.A., pp. 169-172.
- Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. 1993. Fermentation of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria*. American Society for Microbiology. U.S.A. pp. 872-874.
- Stein, T. and Entian, K-D. 2002. Maturation of the lantibiotic subtilin: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to monitor precursors and their proteolytic processing in crude bacterial cultures. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16:103-110.

- Strange, R.N. 1993. *Plant Disease Control: Towards Environmentally Acceptable Methods*. Chapman and Hall, New York, p. 354.
- Sweere, A.P.J., Luyben, K.Ch.A.M. and Kossen, N.W.F. 1987. Regime analysis and scale down: tools to investigate the performance of bioreactors, *Enzyme and Microbial Technology* 9:386-398.
- Thomas, M.B. and Willis, A.J. 1998. Biocontrol-risky but necessary?. *Public Health Perspectives* 13(8):325-329.
- Towalsky, Z. and Rothman, H. 1986. Enzyme technology. In: *The Biotechnological Challenge*. Cambridge University, Cambridge. pp. 37-76.
- Turner, J.T. and Backman, P.A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75:347-357.
- Utkhede, R.S. 1984. Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. *Canadian Journal of Botany* 62:1032-1035.
- Vargas-Sánchez, A. y Arteaga-Gallegos, J.H. 2002a. Evaluación de *Bacillus subtilis* para el control de la mancha bacteriana *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doige) Dye en tomate. *Memorias del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Monterrey, N.L.. 2-5 Julio 2002. Resumen F-128.
- Vargas-Sánchez, A. y Arteaga-Gallegos, J.H. 2002b. Control de la mancha bacteriana (*Xanthomonas fragariae*) de la fresa con aplicaciones de *Bacillus subtilis* en Zamora, Michoacán, México, 2001. *Memorias del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Monterrey, N.L. 2-5 Julio 2002. Resumen F-126.
- Voet, D. and Voet, J.G. 1995. Sugars and Polysaccharides. In: *Biochemistry*. John Wiley and Sons. pp. 262-263.

- Walker, S. 2000. Clasificación, estructura y funcionamiento de las bacterias. En: *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana. pp. 33-36.
- Wang, J.J. and Shih, J.C.H. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 22:608-616.
- Wang, S.L., Shin, I.L., Wang, C.H., Tseng, K.C., Chang, W.T., Twu, Y.K., Ro, J.J. and Wang, C.L. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:321-328.
- Woodhead, S.H., O'Leary, A.L., O'Leary, D.J. and Rabatin, S.C. 1990. Discovery, development, and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12:328-331.