



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

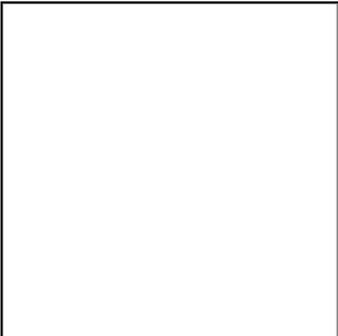
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**“Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la
producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83
con alta viabilidad”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
I.B.Q. DANIELA MORALES SÁNCHEZ

TUTOR: DR. ENRIQUE GALINDO FENTANES



Cuernavaca, Morelos, Marzo 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

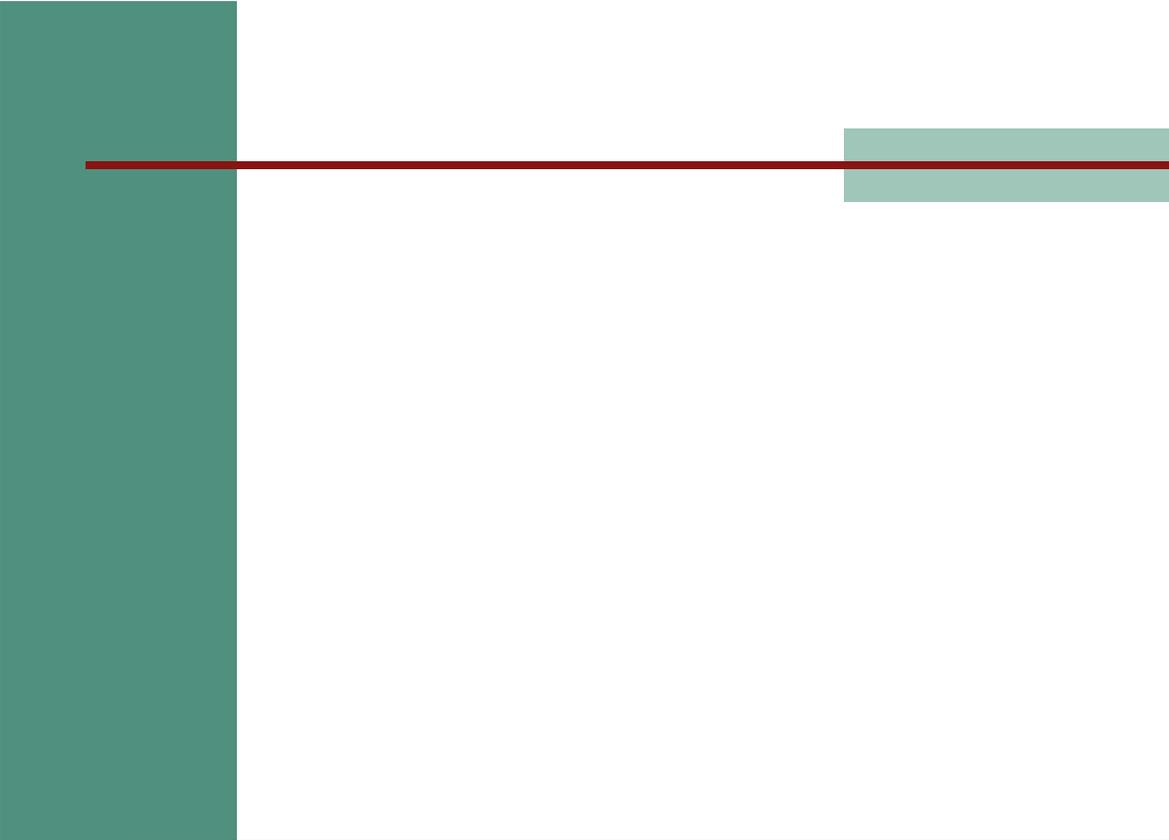


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de los proyectos SAGARPA/CONACyT 741 y DGAPA IN216905 y la beca de maestría CONACyT

Dedicatoria

A mis padres

Javier y Coqui

Por su amor, fortaleza y apoyo incondicional

A Sergio

Por su amor y por darle luz a mi vida

A mis hermanos y sus retoños

Gaby, Ale, Javier, La Nena,
Gabrielito y La Negrita

A toda mi familia

A mis amigos

Marina, Liz, Eliane, Chio, Alexis, Alvarito,
Raunel, Adriana, Erika, Sol, Celia, Leo,
Muñeco, Cris, Ivette, Inés, Adelfo, Pablo,
Blanca, Antonino, Sir Caspeta, Yuri, Itzma y
Germán.

Agradecimientos

- **Dr. Enrique Galindo Fentanes**

Gracias por su apoyo (académico y personal), su confianza, sus enseñanzas y la dedicación para dirigirme en la elaboración de esta tesis.

- **Al comité Tutoral**

Dra. Alejandra Bravo de la Parra
Dr. Alfredo Martínez Jiménez

- **Miembros del jurado**

Dr. Guillermo Gosset Lagarda (Presidente)
Dr. Enrique Galindo Fentanes (Secretario)
Dr. José de Jesús Caballero Mellado (vocal)
Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera (Suplente)
Dr. Leobardo Serrano Carreón (Suplente)

- **Planta Piloto del Instituto de Biotecnología**

T. L. C. Mario Caro
Q. F. B. Miriam Ortíz
Ing. Veronica Albiter
M. en C. Juan Carlos Canul
Sr. Arturo Escobar

- **Staff del grupo Galindo**

Dr. Leobardo Serrano
Dr. Carlos Peña
Dra. Marisol Córdova
M. en C. Celia Flores
Sra. Leticia Díaz
Sr. Javier Dorantes
Biól. Dulce Pacheco

INDICE GENERAL

Índice General	i
Índice de figuras	iv
Índice de Cuadros y Tablas	vi
Resumen	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	7
2.1 Control biológico con <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.2 <i>Bacillus subtilis</i> , productor de antibióticos	9
2.3 Esporulación en <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.3.1 Proceso de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.4 Cepa <i>Bacillus subtilis</i> 83	13
2.4.1 <i>Bacillus subtilis</i> 83 como agente de control biológico en cultivos	de mango
13	
2.5 Productos comerciales hechos a base de <i>Bacillus subtilis</i> para control biológico	14
2.6 Producción de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> en cultivo en lote	15
2.7 El uso del cultivo en lote alimentado como estrategia para lograr altas densidades celulares	17
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. Estrategia experimental.....	23
6. Materiales y métodos.....	26
6.1 Materiales	26
6.1.1 Microorganismos	26
6.1.2 Composición y preparación de medios de cultivo	27
6.1.2.1 Medios sólidos	27
6.1.2.2 Medios líquidos	27

6.1.3 Preparación del inóculo	29
6.1.4 Cultivos en fermentador de 10 L	29
6.1.4.1 Condiciones de cultivo	29
6.1.5 Cultivos en lote alimentado	30
6.1.5.1 Cultivo alimentado A	30
6.1.5.1.1 Condiciones de cultivo	30
6.1.5.2 Cultivos alimentados B y C	31
6.1.5.1.1 Condiciones de cultivo	31
6.1.5.2.2 Reproducción de resultados fermentador de 4 L	33
6.2 Métodos analíticos	34
6.2.1 Cuantificación de células totales mediante conteo directo	34
6.2.2 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC)	36
cuenta en placa	36
6.2.3 Cuantificación de esporas	36
6.2.4 Determinación de glucosa residual	36
6.2.5 Determinación de NH ₄ residual	37
6.2.6 Bioensayos de antagonismo in vitro	38
6.2.3 Técnica de eliminación de gas para la determinación del k _{1a}	39
7. Resultados y discusión.....	41
7.1 Cinéticas de crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> 83	83
en el medio mineral	41
7.2 Cinéticas de crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> 83	83
en diferentes medios de cultivo	45
7.3 Selección del medio de cultivo	50
7.4 Cultivos alimentados	54
7.4.1 Cultivo alimentado A	55
7.4.2 Cultivo alimentado B	59
7.4.2.1 Traslado del proceso de producción de esporas viables	
al biorreactor de 4 l	59
7.4.2.2 Cinéticas de crecimiento y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en el cultivo B	62

7.4.4 Cultivo alimentado C	67
7.4.5 Comparación de los cultivos de acuerdo al modo de alimentación del nutriente limitante	73
7.4.6 Producción de compuestos antifúngicos termorresistentes por <i>Bacillus subtilis</i> 83 en los cultivos alimentados A, B y C	75
8. Conclusiones	77
8.1 Conclusión general	77
8.2 Conclusiones particulares	77
9. Perspectivas	79
10. Referencias bibliográficas	80
Anexo A	89
Anexo B	91
Anexo C	92
Anexo D	93
Anexo E	94

Índice de Figuras

Fig. 2.1	Ciclo de vida de <i>Bacillus subtilis</i>	11
-----------------	--	-----------

Fig. 5.1	Esquema de la estrategia general del presente proyecto	24
Fig. 6.1	<i>Bacillus subtilis</i> 83 vista al microscopio compuesto en inmersión a 100x	26
Fig. 6.2	<i>Fusarium spp.</i> cultivado en caja con medio PDA	26
Fig. 6.3	Biorreactor de 10 L ubicado en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBT/UNAM	29
Fig. 6.4	Biorreactor de 4 L ubicado en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBT/UNAM	31
Fig. 6.5	Sistema de análisis de imágenes acoplado a un microscopio	35
Fig. 6.6	Esquema de uso de la cámara de Neubauer	35
Fig. 6.7	Bioensayos	38
Fig. 7.1	Cinética de crecimiento y esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en Cultivo lote con el medio mineral	41
Fig. 7.2	Cinética de crecimiento y esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en medio mineral (a), concentración de sustratos (b), evolución de pH y de la tensión del oxígeno disuelto (TOD)(c), producción de compuestos antifúngicos (d)	40
Fig. 7.3	Cinética de crecimiento y esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en los medios suplementados con extracto de levadura (a), caldo nutritivo (b), peptona (c) y la combinación de todos los suplementos (d)	46
Fig. 7.4	Cinéticas de crecimiento y de esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en los medios suplementados con extracto de levadura (a) y caldo nutritivo (b). Concentración de sustratos, evolución de pH, evolución del oxígeno disuelto y producción de compuestos antifúngicos	48
Fig. 7.5	Cinéticas de crecimiento y de esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en los medios suplementados con peptona (a) y la combinación de los nutrientes (b). Concentración de sustratos, evolución de pH, evolución del oxígeno disuelto y producción de compuestos antifúngicos	49

Fig. 7.6	Concentración de células vegetativas de <i>B. subtilis</i> 83 en los diferentes medios de cultivo evaluados	52
Fig. 7.7	Cinética de crecimiento y esporulación (a)y (d), concentración de sustratos (b) y evolución de pH y de la TOD (c) de <i>B. subtilis</i> 83 en cultivo alimentado A.	57
Fig. 7.8	Cinética de crecimiento (a), esporulación (b), concentración de sustratos (c) y (d), evolución del pH y de la TOD (e) y (f) de <i>B. subtilis</i> 83 en cultivo en lote en biorreactor de 4 y 10 L	60
Fig 7.9	Cinética de crecimiento y esporulación (a) y (d), concentración de sustratos (b)y evolución de pH y de la TOD (c) de <i>B. subtilis</i> 83 en el cultivo alimentado B	64
Fig. 7.10	Cinética de crecimiento y esporulación (a) y (d), concentración de sustratos (b) y evolución de pH y de la TOD (c) de <i>B. subtilis</i> 83 en el cultivo alimentado C.	70
Fig. 7.11	Producción de compuestos antifúngicos termorresistentes por <i>Bacillus subtilis</i> 83 en los cultivos alimentados A, B y C	75
Fig. B	Inhibición de <i>Fusarium spp.</i> a diferentes cantidades del caldo de fermentación libre de células y sometido al proceso de esterilización	
Fig. D	Cinéticas de crecimiento y esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en el cultivo alimentado C. Tres experimentos por separado	93
Fig. E	Cinética de la velocidad de transferencia de oxígeno en los biorreactores de 10 y 4 L	94

Índice de Cuadros y Tablas:

Cuadro 2.1	Productos comerciales hechos a base de <i>B. subtilis</i>	15
Cuadro 2.2	Resumen de la concentración de esporas obtenidas en la Literatura de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. subtilis</i>	20

Cuadro 7.1	Concentraciones de las células vegetativas de <i>B. subtilis</i> 83 a las 12 h de cultivo y de las esporas viables de la bacteria al final del cultivo (24 h), en los diferentes medios de cultivo formulados. Tambien se muestra la concentración de células vegetativas viables y esporas viables a las 12 y 24 h de cultivo, respectivamente, normalizadas con respecto a la concentración inicial de células	51
Cuadro 7.2	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en los biorreactores de 4 y 10 l	62
Cuadro 7.3	Datos sobresalientes con respecto a las células de los cultivos realizados con diferentes modos de alimentación	74
Cuadro 7.4	Rendimientos de los cultivos realizados con diferentes modos de alimentación	74
Tabla 6.1	Composición del medio de cultivo YPG	27
Tabla 6.2	Composición del medio de cultivo PDA	27
Tabla 6.3	Composición del medio de cultivo YPG líquido	28
Tabla 6.4	Composición del medio mineral	28
Tabla A	Datos utilizados para el cálculo de los diferentes parámetros	89

Cómo maximizar la viabilidad de las esporas de *Bacillus subtilis* 83?

Bacillus subtilis 83 fue aislada del follaje de mango por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (unidad Culiacán). Esta cepa presenta características sobresalientes para su uso como agente de control biológico de hongos fitopatógenos a nivel de laboratorio y de campo. Además, en vista de que genera esporas resistentes al calor y la desecación, es posible formular productos estables a base de esta bacteria para su aplicación en campo. Se estudió inicialmente la cinética de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83 en un medio de cultivo mineral operado en cultivo en lote. Se determinó la viabilidad de las esporas en este medio. La fuente de carbono fue el sustrato limitante para el proceso de esporulación de la bacteria y se obtuvo una concentración de esporas viables de 1×10^8 esporas/ml con una viabilidad del 36.4 %. La eficiencia de esporulación, que esta definida como la proporción de células vegetativas viables que se convierten a esporas viables, fue de 58.1 %. Además, en bioensayos *in vitro* se observó que la bacteria sintetizaba compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización a partir de las 12 h de cultivo.

Se estudió, en cultivo en lote el efecto del crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83 en el medio mineral suplementado con nutrientes como caldo nutritivo, extracto de levadura, peptona y la mezcla de ellos. Sin embargo, estos nutrientes no incrementaron la concentración de células vegetativas y esporas viables, por lo que la mejor opción para el cultivo de *B. subtilis* 83 fue el medio mineral.

Posteriormente se realizaron cultivos alimentados con glucosa. El primer cultivo alimentado se realizó mediante pulsos de glucosa (cultivo alimentado A). La solución alimentadora consistía de 300 g/l de glucosa y sales minerales en una concentración dos veces mayor a la utilizada en un cultivo lote convencional (2x). En este cultivo se logró incrementar casi un orden de magnitud la concentración de esporas, comparado con el cultivo en lote, llegando a una concentración de 4.8×10^9 esporas viables/ml. Además, se incrementó casi al doble la viabilidad de las esporas (69.2 %) y la eficiencia de esporulación aumentó a 68.6 %.

Durante la alimentación del cultivo A, la concentración de glucosa descendía en intervalos a valores cercanos a 0 g/l. Por esta razón y para evitar la esporulación de la bacteria al llegar a estos niveles de azúcar, se realizó un cultivo exponencialmente alimentado (cultivo alimentado B). La formulación de la solución alimentadora fue la misma que en el cultivo alimentado A. En este cultivo (un solo experimento), durante la alimentación, la glucosa se acumuló en el medio hasta llegar a una concentración de 27.2 g/l. Los resultados de esta forma de cultivo fueron similares al cultivo

alimentado A en cuanto a la concentración de esporas viables (5×10^9 esporas/ml) pero con una mas elevada viabilidad de las esporas (83.9 %). Si bien en el cultivo alimentado B se obtuvo una mayor concentración de células vegetativas, comparado con la forma de cultivo A, la conversión efectiva de células vegetativas a esporas viables fue deficiente ya que la eficiencia de esporulación fue de 15.2 % comparado con el cultivo alimentado A.

La reducción en la eficiencia de esporulación nos permitió deducir que probablemente la alta concentración de sales minerales en la solución alimentadora pudiera afectar la conversión efectiva de las células vegetativas a esporas viables. En consecuencia, se realizaron cultivos exponencialmente alimentados con glucosa, pero en este último caso, la concentración de sales minerales fue la misma que para un cultivo en lote (1x). En este cultivo se obtuvo una productividad 25 veces mayor comparada con las otras formas de cultivo. Se logró obtener una concentración de esporas viables de 7.4×10^{10} esporas/ml, lo que significa un aumento de casi 2 órdenes de magnitud con respecto al cultivo en lote. La viabilidad fue de 72 % y la conversión de células vegetativas a esporas viables fue de 85.7 %. En este caso, la cinética indicó que el nutriente limitante fue la fuente de nitrógeno, cuando a cuyo agotamiento se inició la esporulación, aún existía glucosa en el medio de cultivo.

Se concluye que realizando cultivos alimentados con glucosa, permitiendo la acumulación de ésta en el medio y además promoviendo condiciones de no limitación del crecimiento de las células vegetativas por oxígeno, pero sí por la fuente de nitrógeno, es posible incrementar sensiblemente la producción de esporas viables de *B. subtilis* 83 hasta en 2 ordenes de magnitud, logrando una productividad hasta 25 veces mayor con respecto a un cultivo en lote.

1. Introducción

El control de enfermedades y plagas en las plantas es una urgente necesidad para la agricultura. La creciente demanda por alimentos sanos surge por el crecimiento de la población humana. Debido a problemas fitosanitarios en las plantas, éstas requieren del control de diversas enfermedades. Las enfermedades reducen el rendimiento de cosechas y ocasionan importantes pérdidas económicas (Eckert y Ogawa, 1985).

El control biológico constituye una alternativa viable para combatir plagas o enfermedades. Éste se define como el uso de microorganismos y/o sus metabolitos, que son enemigos naturales de la plaga o enfermedad con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas y/o sus productos (Serrano-Carreón y Galindo, 2006). El control biológico presenta apreciables ventajas frente al control químico, entre las que se encuentran: un reducido impacto ambiental, su inocuidad en el ser humano y su especificidad antagónica (Thomas y Willis, 1998).

Dadas las ventajas que ofrece el control biológico, se han realizado numerosas investigaciones para crear productos a base de microorganismos antagonistas de plagas o enfermedades.

Se han reportado resultados satisfactorios al realizar ensayos con organismos a nivel de laboratorio; sin embargo, su producción y el desarrollo de una formulación efectiva, estable y económica han causado que la gran mayoría no logren alcanzar un lugar en el mercado (Cook, 1993).

Algunos de los organismos ensayados para su uso como agentes de control biológico han sido las bacterias y de este grupo se ha encontrado que *Bacillus subtilis* es un efectivo agente para este propósito. Esta bacteria genera esporas resistentes al calor y a la desecación, con lo cual se pueden formular productos muy estables para su aplicación (Janisiewicz y Korsten, 2002). Su principal mecanismo antagonista es la antibiosis, ya que produce antibióticos que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias (Foster y Woodroff, 1946) y produce compuestos quelantes de hierro (sideróforos), con los cuales compete por espacio y nutrientes contra el fitopatógeno (Thonart *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1998). Además, produce cantidades moderadas de giberelina, hormona que incrementa el desarrollo de las plantas, exoenzimas de alto peso molecular (como laminarasa, quitinasa y celulasa) que degradan la pared celular de hongos fitopatógenos y tiene la capacidad de transformar minerales no asimilables para las plantas a componentes orgánicos asimilables (Broadbent *et al.*, 1977). *B. subtilis*

es considerado por la EPA (agencia de protección ambiental de E.E.U.U.) como un organismo GRAS (generalmente considerado como seguro) (Harwood, 1989).

Actualmente, en México existen productos comerciales de importación con base de *B. 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. Además, en la mayoría de los productos que se comercializan, la información que presentan en la etiqueta en cuanto a la calidad del producto con base en la viabilidad de las esporas no es verídica, y estos productos carecen de más del 90 % de la viabilidad de las esporas que aseguran en el envase, de acuerdo con los análisis realizados por Romero (2005).

En el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (unidad Culiacán) se aisló, de la filosfera de mango, la cepa *B. subtilis* 83 (Juárez, 2001), que presenta características sobresalientes para su uso como agente de control biológico. Esta cepa ha mostrado antagonismo, en condiciones *in vitro* y en campo, contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, que afecta severamente al cultivo de mango, el cual, es de importancia económica nacional (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005; Patiño *et al.* 2004).

La aplicación de *B. subtilis* 83 en campo ha sido poco estudiada, y aunque se cuenta con una metodología para la producción de esporas viables de *B. subtilis* (en concentraciones hasta de 1×10^9 esp/ml) en cultivo en lote con un medio mineral (Rodríguez, 2005), es conveniente maximizar la producción de esporas viables de *B. subtilis*, lo que brindaría ventajas competitivas al disminuir los costos de producción y de inversión. Además, en el trabajo realizado por Rodríguez (2005) no se determinó la viabilidad de las esporas de *B. subtilis*, siendo esta característica muy importante en el proceso, ya que refleja la proporción de esporas viables con respecto al total de las esporas producidas. Por consiguiente, si la viabilidad de las esporas en la metodología propuesta por Rodríguez (2005) resultara baja (en relación al máximo valor de viabilidad que se pueda alcanzar) se tendría un posible margen para incrementarla. Maximizar, ya sea la concentración de esporas viables, o la viabilidad de las esporas, traería ventajas al disminuir los costos de producción y de inversión de la posible planta productora. Es decir, desde el punto de vista del proceso se disminuirían los volúmenes y tiempos necesarios de fermentación, lo que significa menores costos de producción y de inversión. Además, en cuanto a la formulación del producto, también se tendrían ventajas ya que se

disminuiría el volumen de operación del secador (si fuera el caso) y la cantidad del soporte en la formulación.

El proceso de producción de esporas viables de *B. subtilis* 83 podría ser maximizado aumentando la concentración de células vegetativas mediante el enriquecimiento del medio de cultivo con otros nutrientes que han sido reportados para el crecimiento de *B. subtilis* y procurando que, posteriormente, la mayoría de las células vegetativas se conviertan en esporas viables. Otra manera de maximizar el proceso es realizando cultivos de alta densidad celular. Este tipo de cultivo permitiría incrementar la concentración de células vegetativas mediante la alimentación de la fuente de carbono, la cual, al agotarse conduciría a la esporulación de la bacteria. Los cultivos alimentados han sido muy usados para incrementar la concentración de producto o la masa celular (Kang *et al.*, 1992) (en nuestro caso es conveniente incrementar la masa celular viable ya que es el principal objetivo cuando se produce un agente de control biológico). En los cultivos alimentados se lleva a cabo una alimentación continua o discontinua de algún(os) nutriente(s), la cual puede efectuarse mediante diferentes perfiles de alimentación (Yamane y Shimizu, 1984).

Dadas las características de *B. subtilis* 83 como agente de control biológico y la necesidad de la existencia de un producto que tenga garantía de altas cuentas viables con un menor costo de producción, en el presente trabajo se llevó a cabo con el fin de aumentar la concentración de esporas viables y/o la viabilidad de las esporas de esta bacteria, iniciando con el establecimiento de la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* 83 para después seleccionar un medio de cultivo que aumente la viabilidad de las esporas (en caso de ser necesario) y, finalmente, realizar cultivos alimentados, permitiendo una posterior esporulación de la bacteria, con el objeto de obtener altas concentraciones de células vegetativas y, posteriormente, estimular la producción de una alta concentración de esporas viables de *B. subtilis* 83.

2. Antecedentes

2.1 Control biológico con *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ha probado ser antagonista de varios hongos fitopatógenos (McKeen *et al.*, 1986). Por esta razón se ha usado como agente de control en diversas enfermedades en plantas (Cercos, 1957; Chang y Kommedahl, 1968; Utkhede, 1984; Ferreira *et al.*, 1991). Su principal mecanismo de control es debido a la producción de antibióticos (antibiosis) (Wehnhold y Bowman, 1968; Chang y Kommedahl, 1968). Cook y Baker (1983) definen la antibiosis como la inhibición o destrucción de un organismo por medio de un producto metabólico. Además, produce compuestos quelantes de hierro (sideróforos), con los cuales compite por espacio y nutrientes contra el patógeno (Thonart *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1998).

Aranda (1997) realizó un estudio *in vitro* con *B. subtilis* y observó un efecto fungistático frente a cinco hongos patógenos de la papa. Asimismo, en condiciones de invernadero, la aplicación de *B. subtilis* en cultivos de papa de la variedad *Alpha* incrementó en 26 % el número de tubérculos producidos y en 48 % en el peso con respecto al testigo. En la variedad *Atlantic*, *B. subtilis* incrementó en 45 % el número de tubérculos producidos y en 11 % el peso, con respecto al testigo.

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

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

Wang *et al.* (2002) realizaron estudios *in vitro* en donde observaron la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* a causa de los metabolitos producidos por dos cepas de *B. subtilis*. Esta inhibición fue debida a la degradación de la pared celular del hongo (constituida por quitina),

debido a la presencia de quitinasas, producidas por ambas cepas bacterianas. La producción de quitinasas por las cepas de *B. subtilis*, fue estimulada, adicionando al medio de cultivo un suplemento de quitina.

En estudios en invernadero, Szczech y Shoda (2004) analizaron el efecto antagonista de una cepa de *B. subtilis* combinada con una cepa de *Burkholderia cepacia* contra el hongo *Rhizoctonia solani*, causante de la enfermedad del marchitamiento temprano en cultivos de tomate. Estos investigadores observaron que la mezcla de ambas bacterias suprimían la enfermedad y determinaron que el tratamiento que mejores resultados mostró fue cuando inoculaban a la bacteria *Burkholderia cepacia* dos días después de inocular *B. subtilis* en las plantas de tomate.

Cavaglieri *et al.* (2005) realizaron estudios *in vitro* para evaluar el efecto antagonista de *B. subtilis* en la inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* y la producción de fumonisina B₁ (que es un metabolito secundario producido por este hongo y que afecta la salud humana y de animales) en la rizosfera y endorizosfera de maíz. Ellos determinaron que la inoculación de *B. subtilis* a concentraciones de entre 1×10^7 y 1×10^8 UFC/ml en las semillas de maíz, lograba disminuir la colonización de *F. verticillioides* en las raíces de las plantas de maíz, tratadas bajo condiciones de invernadero.

Jayaraj *et al.* (2005) evaluaron el efecto antagonista de un formulado con base en *B. subtilis* contra el hongo *Pythium aphanidermatum*, causante de la enfermedad del marchitamiento temprano en semillas de tomate. Los resultados mostraron que el tratamiento con el formulado de *B. subtilis* logró ser más efectivo para el control de la enfermedad, comparado con el testigo químico comercial “metalaxil”.

2.2 *Bacillus subtilis*, productor de antibióticos

Algunos de los agentes de control biológico más efectivos son bacterias productoras de antibióticos, cuya acción determina su efectividad (Rodríguez 2005). El principal mecanismo de control de *B. subtilis* es la antibiosis (Martín y Gottlieb, 1955; Mannanov y Sattarova, 2001). 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; Jiang *et al.* 2001; Wang *et al.* 2002).

Katz y Demain (1977) reportaron que *B. subtilis* 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, tales como ácidos grasos o aminoácidos no proteicos.

Foster y Woodroff (1946) aislaron varios antibióticos a partir de cultivos de *B. subtilis* tales como actinomicina, circulina, heliomicina, neomicina y viomicina. De la misma manera, Besson *et al.* (1979) aislaron y purificaron bacilomicina-L, bacitracina y micosubtilina. Por otra parte, Besson y Michel (1987) reportaron que *B. subtilis* produce iturina A, iturina-AL, iturina-E, subtilina A y sobrenulina de naturaleza péptido lipídica.

Dunleavy (1955), usando una cepa de *B. subtilis* aislada del suelo, reportó la inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia spp.*, causante del *damping-off* (marchitamiento temprano) en remolacha, por la acción del antibiótico subtilina.

Pusey y Wilson (1984) indicaron que las iturinas producidas por *B. subtilis* tienen un amplio espectro antifúngico y son útiles en micosis humanas y animales, ya que muestran baja toxicidad y despreciable efecto cancerígeno.

2.3 Esporulación en *Bacillus subtilis*

Una de las ventajas que ofrece *B. subtilis* como agente de control biológico sobre otras bacterias es su habilidad para formar esporas, que son células metabólicamente inactivas con alta resistencia a condiciones adversas de crecimiento (Cavaglieri *et al.*, 2005). Estas formas bacterianas soportan efectos bactericidas, tales como calor y sequedad. Esta ventaja hace que se pueda formular productos en base seca y con alta estabilidad. También las esporas soportan radiaciones, congelamiento y productos químicos tóxicos (Driks, 2002).

2.3.1 Proceso de esporulación en *Bacillus subtilis*

El evento de diferenciación de *B. subtilis* es un proceso fisiológico complejo desde el punto de vista bioquímico y genético. Cuando *B. subtilis* es cultivado en un medio rico de nutrientes, el proceso de esporulación se lleva a cabo en aproximadamente ocho horas (Schaeffer *et al.*, 1965). El proceso de esporulación se inicia en la fase estacionaria y se ha dividido en siete estadios, basados en los principales cambios citológicos que ocurren durante la formación de la spora (Errington, 2003). La **figura 2.1** muestra esquemáticamente el proceso de esporulación. En general, después de que se ha iniciado el proceso de esporulación, ocurren en primer lugar, la formación del septo de la célula, seguido del engullimiento, posteriormente la formación de la corteza y la cubierta y, finalmente, la maduración y lisis de la célula madre.

Durante la etapa vegetativa del crecimiento, *B. subtilis* se divide centralmente para producir dos células idénticas (**Fig. 2.1**). En contraste, durante las primeras etapas del proceso de esporulación, el proceso de septación ocurre asimétricamente, cerca de un polo de la célula. Si durante las dos primeras horas del proceso se añade una cantidad suficiente de los nutrientes cuya falta haya inducido la esporulación, las células de *B. subtilis* reanudan el crecimiento vegetativo y continúa el proceso de crecimiento celular.

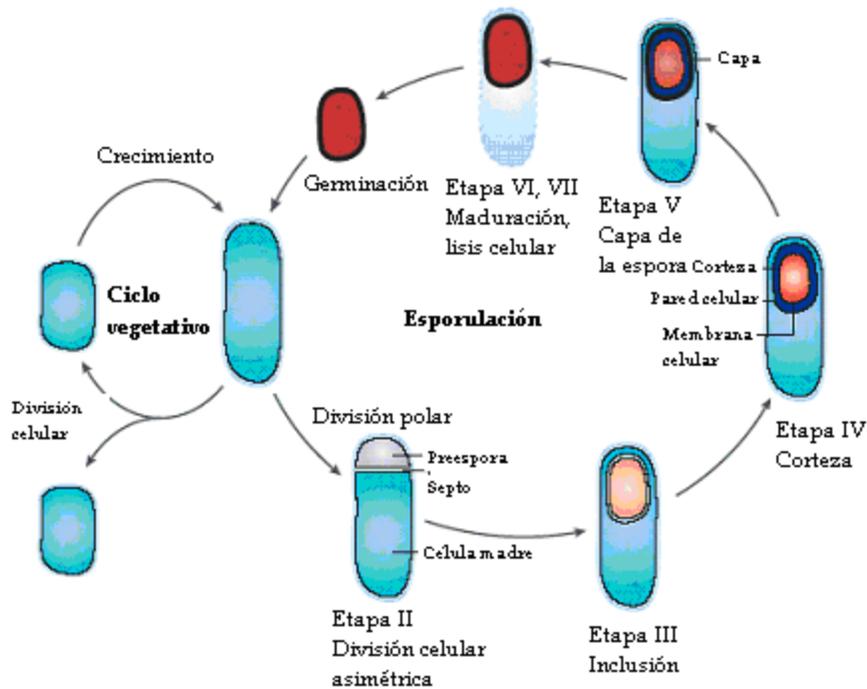


Fig. 2.1 Ciclo de vida de *Bacillus subtilis*

Durante la transición de la segunda a la tercera hora después del inicio de la esporulación, se forma el septo y la célula madre engulle a la pre-espora. La tercera hora después del inicio del proceso de esporulación generalmente es considerada como el estadio durante el cual el proceso ya no puede revertirse hacia la formación de células en crecimiento vegetativo. A partir de este tiempo, la mayor parte de la expresión genética se da por separado, tanto temporal como espacialmente, entre la célula madre y la pre-espora (Losick y Stragier, 1992).

Las esporas bacterianas tienen una apariencia muy diferente a las células vegetativas, ya que están rodeadas de varias capas gruesas, y por ello, las esporas resisten las condiciones ambientales adversas. El citoplasma de la bacteria en forma de espora se llama parte interna, contiene sólo una copia del cromosoma bacteriano, carece de RNA mensajero, tiene poco RNA de transferencia y posee sólo algunas enzimas. Los aminoácidos se almacenan como proteínas citoplasmáticas de peso molecular bajo y se llaman proteínas pequeñas solubles en ácido (SASP). Algunas SASP contribuyen a la capacidad de la espora para resistir las radiaciones ultravioleta (y quizá el calor) ya que crean un efecto protector al unirse al DNA. No hay actividad metabólica continua en la espora madura y la energía se almacena como 3-fosfoglicerato, que es más estable que el ATP (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 peptidoglucano que contiene enlaces cruzados poco comunes, como anillos de lactama murámica. Lo más importante es que la corteza contiene ácido dipicolínico (DPA) o ácido piridín-2,6-dicarboxílico. El DPA, que también se encuentra en la parte interna, es un agente quelante de calcio y constituye hasta el 15 % del peso de la espora. Cuando el DPA, depositado en la corteza, forma compuestos quelados con calcio, pone éste elemento en contacto cercano con el peptidoglucano polianiónico sobre la corteza. Los enlaces iónicos que se forman ocasionan que el peptidoglucano se contraiga y expulse agua en un proceso semejante a exprimir el agua de una toalla. Casi todas las células vegetativas están formadas por cerca de 77.5 % de agua, pero sólo el 15 % de la endoespora es agua. Por eso, la endoespora es tan seca como la caseína o la lana. Se creó que la resequedad imparte a la espora la resistencia al calor, inclusive hasta el punto de permitirle sobrevivir varias horas a temperatura de ebullición (Walker, 2000).

La esporulación se inicia cuando se cumplen tres requisitos. Primero, la bacteria debe estar bajo condiciones de estrés nutricional, tales como, limitación de carbono, nitrógeno o fósforo. En segundo lugar, el cultivo debe tener alta densidad para inducir en las células la secreción y reconocimiento del factor 1 de diferenciación extracelular (EDF-1), factor que aparentemente, 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. El último requisito necesario para la esporulación es que la bacteria debe encontrarse en la fase estacionaria de crecimiento (Walker, 2000).

2.4 Cepa *Bacillus subtilis* 83

Investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., en Culiacán, Sinaloa, aislaron la cepa *Bacillus subtilis* 83 del follaje de mango. Estudios previos con esta cepa han mostrado características sobresalientes para su uso como agente de control biológico. *Bacillus subtilis* 83 ha mostrado antagonismo, en condiciones *in vitro* contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, que afecta severamente al cultivo de mango, cuya producción, es de importancia económica nacional (Juárez, 2001). El principal mecanismo antagonista de esta cepa es por antibiosis, es decir, la producción de antibióticos (Allende *et al.* 2001).

2.4.1 *Bacillus subtilis* 83 como agente de control biológico en cultivos de mango

El mango es una de las frutas más apreciadas y populares de nuestro país, además es la fruta más importante en el comercio internacional. Los países cercanos al ecuador y a los trópicos son los mayores exportadores del fruto, siendo México el principal exportador de mango en el mundo, participando con el 33 % de la exportación mundial, seguido de Brasil, Pakistán, Filipinas y la India (Balderas, 2004). En México se cultivan cerca de 150,000 hectáreas de mango, de las cuales 38,000 son las proveedoras para exportación, cuyo principal destino es Estados Unidos (66 % del mango que entra a E.E.U.U. se produce en México). La producción que se destina a la exportación está concentrada en nueve estados del país, estos son: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa (Balderas, 2004).

Existen diversos problemas fitosanitarios que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo del mango. La enfermedad más común en la etapa de postcosecha es la antracnosis, ocasionada por el

hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones de alta temperatura y humedad relativa (Balderas, 2004). El control biológico con *B. subtilis* 83 representa una potencial alternativa para controlar esta enfermedad y disminuir el uso de agentes químicos y las desventajas que estos agentes representan.

B. subtilis 83 ha sido probado exitosamente en campo en cultivos de mango. Allende *et al.* (2001) realizaron estudios de campo con una formulación líquida de *Bacillus subtilis* 83 a una concentración de 3×10^8 UFC/ml. Esta formulación fue asperjada cada 15 días durante los dos últimos meses previos a la cosecha de mango (cultivar Keitt). Los resultados mostraron mayores niveles de control de antracnosis en la formulación líquida de *B. subtilis* 83, comparados con un fungicida químico comercial.

Carrillo-Fasio *et al.* (2005) evaluaron el efecto de las aplicaciones de *B. subtilis* 83, combinada con la levadura *R. minuta*, en precosecha de frutos de mango de la variedad *Haden*. El parámetro de evaluación fue la severidad de antracnosis en los frutos. Carrillo-Fasio *et al.* (2005) tomaron como indicador de la severidad de antracnosis la presencia de síntomas de la enfermedad. Los resultados indicaron que los tratamientos de *B. subtilis* 83 y la levadura mostraron mayor efectividad para controlar antracnosis en los frutos, comparado con el producto comercial, Benlate (testigo).

Asimismo, Carrillo-Fasio *et al.* (2005) realizaron estudios en donde evaluaron la efectividad de *B. subtilis* 83, en combinación con la levadura *R. minuta*, en aplicaciones en precosecha, para el control en poscosecha de antracnosis en mango (cultivar Kent) y su efecto en la calidad poscosecha de los frutos. Estos investigadores compararon el efecto de los biofungicidas sobre el desarrollo de la enfermedad en frutos tratados con un producto químico y un testigo absoluto (agua). Se llevaron a cabo cinco aplicaciones previas a la cosecha de mango. Los frutos cosechados se almacenaron hasta por 15 días a 20° C y 85% de humedad relativa. Después de este tiempo, *B. subtilis* 83 (y en combinación con la levadura), mostraron mayor efectividad en el control de antracnosis en comparación con el control químico. Además, la aplicación de *B. subtilis* 83 no afectó negativamente la calidad poscosecha de los frutos, observándose un desarrollo normal en los sólidos solubles totales, acidez titulable y evolución de la firmeza.

2.5 Productos comerciales hechos con base en *Bacillus subtilis* para control biológico

Debido al efecto antifúngico que posee *B. subtilis* contra diferentes hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés comercial, se han desarrollado productos comerciales con base en esta bacteria para el control de enfermedades en las plantas. El **cuadro 2.1** muestra algunos productos que se comercializan actualmente y que han tenido resultados interesantes.

Cuadro 2.1 Productos comerciales hechos a base de *B. subtilis*..

Producto	Compañía
Epic™	Gustafson, Inc.
Kodiak™	Gustafson, Inc.
MBI 60	Gustafson, Inc.
Serenade (QST713)	AgraQuest Inc
System3 (+metalaxyl +PCNB)	Helena Chemical Company
Companion (EPA Experimental Use Permit)	Growth Products
HiStick N/T (a <i>Rhizobium</i> and <i>B. subtilis</i> mix)	MicroBio Group
Subtilex	MicroBio Group

Fuente: <http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bioprod.htm>

Gracias a la capacidad de las esporas de *B. subtilis* para soportar altas temperaturas y baja actividad de agua, se pueden formular productos en base seca, tales como polvos deshidratados. Estos han sido de gran interés por su larga vida de anaquel, fácil transporte y aplicación con equipos convencionales para tratamiento de plagas y enfermedades de los cultivos (Schisler *et al.*, 2004).

Sin embargo, un gran número de los productos que se comercializan en México carecen de la calidad expresada en la etiqueta. En estudios realizados por Romero (2005), se determinó que la concentración viable de *B. subtilis* en diferentes productos tenían menos del 10 % de cuenta viable que lo que se manifestaba en la etiqueta.

2.6 Producción de esporas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* en cultivo en lote

Desde el punto de vista tecnológico, es necesario generar metodologías de producción que resulten en altas concentraciones de esporas viables de *B. subtilis*, ya que al aumentar la concentración de esporas viables se disminuye el volumen de producción, lo que conduce a evidentes ventajas a nivel industrial, principalmente económicas y operacionales. En trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis* para la producción de esporas, usando cultivos en lote y continuos, las concentraciones

de esporas reportadas han alcanzado valores de hasta 7×10^9 esp/ml (Arcas *et al.* 1984; Avignone-Rossa y Mignone, 1993).

Rodríguez (2005) realizó estudios con la cepa *B. subtilis* CPA. Seleccionó un medio de cultivo para la producción de esporas viables de esta bacteria en matraz y posteriormente escaló el proceso a fermentadores de 10 y 30 L de volumen de operación. Rodríguez (2005) estableció que la mejor opción para el cultivo de *B. subtilis* CPA fue un medio mineral químicamente definido (Martínez *et al.*, 1997), con el cual logró obtener una concentración de esporas viables de 1×10^8 UFC/ml en 12 h. Además, en bioensayos *in vitro* observó que al cultivar la bacteria en este medio de cultivo, fue capaz de sintetizar compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización. Rodríguez (2005) determinó que la fuente de carbono fue el sustrato limitante que inició el proceso de esporulación de la bacteria. Asimismo, Rodríguez (2005) logró escalar el proceso de matraz a fermentadores de 10 y 30 L utilizando como criterio la potencia volumétrica gaseada constante. Mediante este criterio, Rodríguez (2005) logró obtener una concentración de esporas viables de *B. subtilis* CPA de 1×10^9 UFC/ml.

En el trabajo anterior se determinó que la fuente de carbono (glucosa) fue el sustrato limitante; por lo tanto, una posibilidad de incrementar la concentración de esporas viables es aumentando la concentración de este sustrato. Sin embargo, existen numerosas razones por las que ésta alternativa no es viable y se presentan a continuación.

Algunos nutrientes, incluyendo las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, cuando están presentes en el medio de cultivo por arriba de cierta concentración, inhiben el crecimiento celular (Martínez *et al.*, 1997). En el caso de glucosa como fuente de carbono, concentraciones muy altas de este nutriente puede ocasionar autólisis debida a una alta presión osmótica en el medio (Harwood y Archibald, 1990).

En *B. subtilis* se ha demostrado que la glucosa y otras fuentes de carbono que son metabolizadas rápidamente, reprimen la síntesis de enzimas que son requeridas para incrementar las funciones catabólicas (Hanson y Cox, 1967; Sonenshein, 1989; Chambliss, 1993). Además, inhiben el proceso de esporulación (Fisher y Sonenshein, 1991). El término "represión catabólica de la esporulación por glucosa" es utilizado para describir este fenómeno (Marks y Freese, 1987).

En general, durante el cultivo de bacterias en presencia de exceso de glucosa, aún en condiciones aerobias, se producen ácidos orgánicos, los cuales disminuyen el rendimiento de glucosa para la formación de biomasa. En el caso de *B. subtilis* se ha demostrado que bajo condiciones aerobias, este microorganismo produce acetato, formato, lactato, propionato y acetoina. (Snay *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1992; Cayuela *et al.*, 1993; Vierheller *et al.*, 1995).

El diseño de los medios de cultivo para obtener los rendimientos de biomasa (en este caso esporas viables) o producto deseables es muy importante. Dependiendo de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo suministradas al cultivo, éstas se desviarán para la formación de células o productos. Por lo que es conveniente diseñar con precisión cada uno de los componentes del medio de cultivo con el que se cultivarán los microorganismos.

2.7 El uso del cultivo en lote alimentado como estrategia para lograr altas densidades celulares

Los cultivos en lote alimentado han sido muy usados para incrementar la concentración de producto o la masa celular viable (Kang *et al.*, 1992). Esta condición se persigue como principal objetivo para producir un agente de control biológico. Además, este tipo de cultivos permite controlar la velocidad de crecimiento (Ramírez *et al.*, 1994). Esta característica es muy importante, ya que se ha demostrado que la frecuencia de esporulación se incrementa conforme se reduce la velocidad de crecimiento en la fase vegetativa (Dawes y Mandelstam, 1970; Dawes y Thornley, 1970).

En cultivos en lote alimentado se lleva a cabo una alimentación continua o discontinua de algún(os) nutriente(s), la cual puede efectuarse mediante diferentes perfiles de alimentación. Este tipo de cultivos se ha utilizado exitosamente para contender con mecanismos de regulación celular tales como, represión catabólica y/o inhibición por sustrato (Modak *et al.*, 1986; O'Connor *et al.*, 1992); así como para reducir la producción y/o acumulación de metabolitos tóxicos, tales como ácidos orgánicos (Yee y Blanch, 1992; Lee, 1996).

Arcas *et al.* (1987), lograron obtener hasta 1.2×10^{10} esporas viables/ml realizando cultivos de *Bacillus thuringiensis* en lote alimentado por gradientes (dos reservorios de alimentación conectados entre sí, con concentraciones diferentes del medio de cultivo a alimentar a una velocidad de flujo constante).

Posteriormente, Kang *et al.* (1992), efectuando cultivos en lote alimentado para obtener una alta densidad celular, seguida de un cultivo en lote para inducir la producción de esporas de *B. thuringiensis*, observaron que al realizar cultivos en lote alimentado (intermitentemente con glucosa y extracto de levadura), se logró una alta densidad celular (72.6 g/L) y una alta producción de esporas en el sucesivo cultivo en lote, logrando una concentración de 1.25×10^{10} esporas viables/ml.

Liu *et al.* (1994), realizando un cultivo en lote, seguido de un cultivo en lote alimentado (constantemente y a diferentes flujos de alimentación) para lograr una alta densidad celular de *B. thuringiensis*, observaron que es necesario suplementar macro y micronutrientes para que la célula no tenga limitación de sustratos. Para ello es preciso conocer el rendimiento celular de los diferentes nutrientes en el medio de fermentación y controlar el oxígeno disuelto en el medio. Liu *et al.* (1994) lograron una concentración de 3.9×10^{10} esporas totales/ml.

En los trabajos presentados anteriormente, todos realizados con *B. thuringiensis*, se debe tomar en consideración el hecho de que para fines de control biológico, lo interesante de esta bacteria es la toxina que produce. Además, en ninguno de los trabajos anteriores se reporta la relación de esporas viables con respecto a la concentración de esporas totales alcanzadas.

En la patente No. 6, 010,898 proporcionada a Paik *et al.* (2000) se protege un proceso de producción de esporas viables de *Bacillus polyfermenticus* en cultivo alimentado. Con esta forma de cultivo Paik *et al.* (2000) lograron una concentración de esporas viables de 5.2×10^9 esp/ml.

Por otro lado, Monteiro *et al.* (2005), realizando cultivos en lote alimentado exponencialmente (iniciando la alimentación a la mitad de la fase de crecimiento exponencial y finalizando en la fase de crecimiento tardía) para la producción de esporas de *B. subtilis* lograron obtener hasta 7.4×10^9 esp/ml. Utilizando este tipo de cultivo lograron una eficiencia de esporulación del 21 %, el cual, permitió incrementar 1.33 veces la concentración de esporas con respecto al cultivo en lote (5.6×10^9 esp/ml).

La importancia de producir esporas viables de *B. subtilis* radica en que se pueden formular productos en base seca, gracias a su capacidad para resistir el calor y la desecación. Rodríguez (2005) desarrolló un proceso de producción de esporas viables de *B. subtilis* CPA, en cultivo en lote sumergido, utilizando un medio mineral de bajo costo, logrando una concentración de esporas de $1 \times$

10⁹ esp/ml. Además, Rodríguez (2005) obtuvo un formulado en base seca que contiene esporas de *B. subtilis* CPA y sus productos de fermentación con una concentración de 1 x 10¹⁰ esp/g el cual conservó prácticamente la misma concentración de cuentas viables a lo largo de seis meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, no se conoce la cantidad total de células (vegetativas viables, vegetativas no viables, esporas viables y esporas no viables) al final de la fermentación y en consecuencia, tampoco se conoce el porcentaje de viabilidad de las esporas en el cultivo. Esto es importante para determinar si el medio mineral necesita un enriquecimiento para satisfacer las necesidades nutricionales de la bacteria y/o emplear otras condiciones de cultivo que incrementen la concentración de células y esporas viables.-

En el cuadro 2.2 se resumen los datos respecto a las concentraciones de esporas reportadas en las referencias citadas anteriormente para *B. thuringiensis*, *B. polyfermenticus* y *B. subtilis*. En la mayoría de estos trabajos se reportan esporas viables. Sin embargo, ninguno indica la viabilidad de las esporas en el cultivo. Este hecho nos proporciona una excelente oportunidad para desarrollar un proceso que maximice la producción de esporas viables de *B. subtilis* para su uso como agente de control biológico y que además nos proporcione información a cerca de la viabilidad de las esporas en el cultivo, teniendo un impacto en la industria de productos de control biológico.

Cuadro 2.2. Resumen de la concentración de esporas obtenidas en la literatura de *B. thuringiensis* y *B. subtilis*.

Referencia	Microorganismo	Esporas/ml	Tipo de cultivo	Comentarios
Arcas <i>et al</i> , 1987	<i>B. thuringiensis</i>	1.2 x 10 ¹⁰	Lote alimentado	Esporas viables
Kang <i>et al</i> , 1992	<i>B. thuringiensis</i>	1.25 x 10 ¹⁰	Lote alimentado	Esporas viables
Liu <i>et al</i> , 1994	<i>B. thuringiensis</i>	3.9 x 10 ¹⁰	Lote alimentado	Esporas totales
Paik <i>et al</i> , 2000	<i>B. polyfermenticus</i>	5.2 x 10 ⁹	Lote alimentado	Esporas viables
Rodríguez, 2005	<i>B. subtilis</i> CPA	1 x 10 ⁹	Lote	Esporas viables
Monteiro <i>et al</i> , (2005)	<i>B. subtilis</i> MB24	7.4 x 10 ⁹	Lote alimentado	Esporas viables

3. Hipótesis

Empleando cultivo en lote alimentado es posible lograr una alta densidad celular de *Bacillus subtilis* 83 que resulte en concentraciones de esporas viables de hasta 1×10^{10} esp/ml.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer un proceso de producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83 en cultivo en lote alimentado con alta viabilidad para su uso como agente de control biológico.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer el porcentaje de viabilidad de esporas de *Bacillus subtilis* 83 durante su cultivo en un medio mineral, para determinar la necesidad de suplementarlo con otros nutrientes.
- Seleccionar el/los nutriente(s) que puedan incrementar la viabilidad de esporas de *B. subtilis* 83 durante su cultivo en el medio mineral.
- Con el medio de cultivo seleccionado, desarrollar un proceso de producción de esporas de *B. subtilis* 83 en cultivo en lote alimentado, para obtener una concentración de hasta 1×10^{10} esporas/ml.
- Evaluar la producción y capacidad antagónica de los compuestos antifúngicos producidos por *B. subtilis* 83 en cultivo en lote alimentado.

5. Estrategia experimental

La estrategia general de trabajo se presenta en la **figura 5**. En un inicio se caracterizó el proceso de producción de esporas viables de *B. subtilis* 83 en cultivo lote usando el medio mineral reportado por Martínez *et al.* (1997). Con este cultivo se implementó una técnica para determinar el porcentaje de viabilidad de las esporas, la cual implica la determinación de la concentración de las esporas totales y la concentración de las esporas viables. Para la cuantificación de las esporas totales se utilizó el método de conteo en un contador de células (Microscopio, cámara de Neubauer). Las esporas viables se cuantificaron mediante cuenta en placa. Las diluciones que se inocularon se sometieron a un tratamiento térmico previo para eliminar las células vegetativas del cultivo, de acuerdo a lo establecido por Rodríguez (2005). El porcentaje de viabilidad esta dado por:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{esporas viables}}{\text{esporas totales}} \times 100$$

Debido a que el porcentaje de viabilidad de las esporas de *B. subtilis* 83 en el medio mineral resultó en un valor bajo (<50%), este medio se suplementó con nutrientes reportados en trabajos previos para el crecimiento y la producción de esporas de *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Estas incluyen caldo nutritivo, extracto de levadura y peptona (Schaeffer, 1969; Kang *et al.*, 1992) y se experimentó con la combinación de los tres suplementos.

Mediante el análisis de cuenta viable total se demostró que la mejor opción para el cultivo de *B. subtilis* 83 fue el medio mineral. Por consiguiente, se realizaron tres cultivos alimentados con glucosa, utilizando el medio de cultivo mineral. El primer cultivo alimentado (A) se realizó en biorreactores de 10 l, mediante pulsos de glucosa, en donde la única condición era mantener el cultivo provisto de glucosa y evitar llegar a concentraciones cercanas a 0 g/l de glucosa para evitar que la bacteria iniciara el proceso de esporulación. Estos experimentos demostraron la necesidad de cambiar el perfil de alimentación a un perfil de tipo exponencial, lo cual dio lugar al segundo cultivo alimentado (B), el cual se realizó en biorreactores de 4 l. La razón por la que este cultivo se realizó en biorreactores de 4 l fue porque en este equipo la alimentación se puede suministrar al reactor de forma automática por medio de un programa que esta acoplado al equipo. De esta manera, se trasladó el proceso de producción de esporas viables de *B. subtilis* 83 al biorreactor de 4 l, utilizando como criterio

de escalamiento a la potencia volumétrica. En la alimentación de los dos cultivos anteriores se adicionaron las sales minerales del cultivo mineral en una concentración dos veces mayor a la de un cultivo en lote convencional (2x). Con respecto al pH, únicamente fue controlado en el segundo caso.

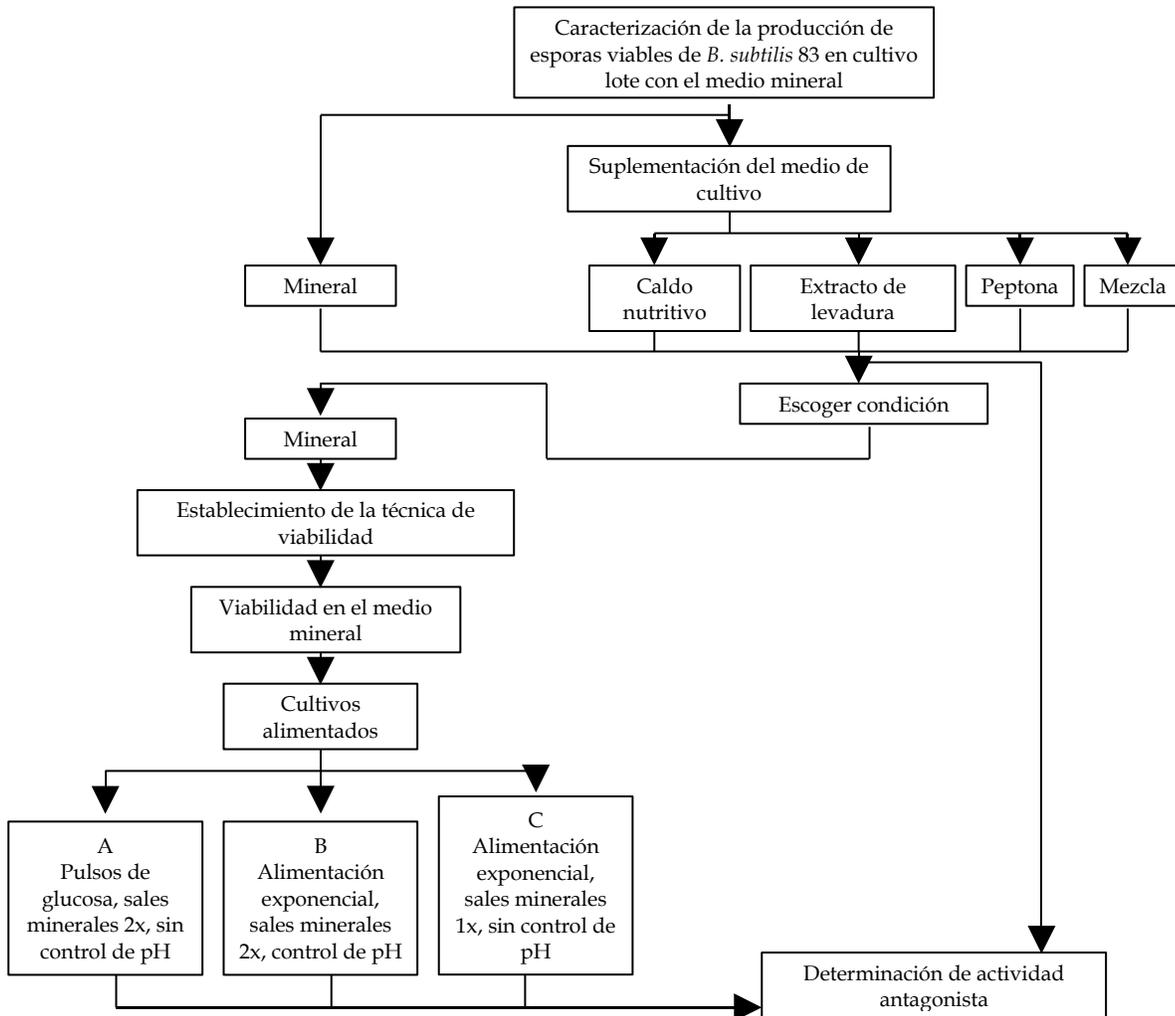


Fig. 5. Esquema de la estrategia general del presente proyecto.

Finalmente, se realizó un cultivo alimentado con un perfil de alimentación de modo exponencial, en donde la concentración de sales minerales en la alimentación fue 1x y no hubo control de pH. Estas características no fueron establecidas previamente pero se obtuvieron resultados interesantes y muy satisfactorios.

Se realizaron pruebas de actividad antagonista de acuerdo a lo establecido por Rodríguez (2005). Estas pruebas se efectuaron para los cultivos en lote y los cultivos alimentados, con el fin de establecer si se producían compuestos antifúngicos termorresistentes. Se realizaron bioensayos *in vitro*

de acuerdo a San-Lang *et al.* (2002), con el hongo fitopatógeno *Fusarium spp.* en cajas Petri, con medio PDA y se ensayó con el sobrenadante (previamente esterilizado y libre de esporas) del caldo de fermentación. Finalmente se determinó el porcentaje de inhibición causado por los compuestos antifúngicos termorresistentes.

6. Materiales y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Microorganismos

Bacillus subtilis 83 (**figura 6.1**), aislada del follaje de cultivos de mango, fue proporcionada por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (unidad Culiacán) en forma liofilizada.

La cepa es crecida en medio líquido YPG (Difco, Bioxon y Baker) y conservada en glicerol al 20 % (v/v) a -15 °C.

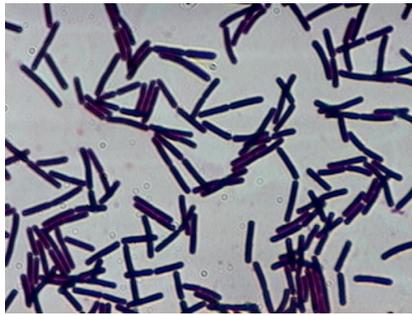


Fig. 6.1 *Bacillus subtilis* 83, vista al microscopio compuesto en inmersión a 100x.

Fusarium spp., (**figura 6.2**) patógeno del cultivo de papa, fue aislado de tubérculos de papa infectados con este hongo y fue proporcionado por el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. *Fusarium spp.* es conservado en cajas Petri con medio de agar papa dextrosa (PDA; Bioxon) a 10 °C. Este hongo fitopatógeno es utilizado como modelo para estudiar el efecto antagónico de *B. subtilis* 83 y sus metabolitos en condiciones *in vitro*.

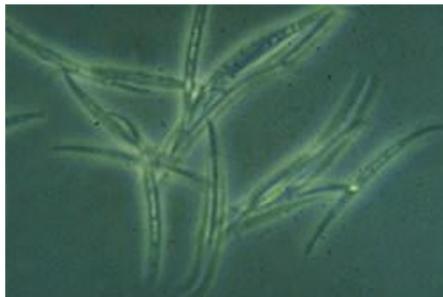


Fig. 6.2 *Fusarium spp.* Fuente: http://content.ll-0.com/pureaircontrols/pureaircontrols_e_a000341316.JPG?i=122204121700

6.1.2 Composición y preparación de medios de cultivo

6.1.2.1 Medios sólidos

Los medios sólidos utilizados son 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 detallan en las **Tablas 6.1 y 6.2**.

Tabla 6.1. Composición del medio de cultivo YPG

Medio	Componente	g/l
YPG	Extracto de levadura	10
	Peptona	10

	Dextrosa	10
	Agar	15

Tabla 6.2. Composición del medio de cultivo PDA

Medio	Componente	g/l
PDA	Infusión de papa (sólidos)	4
	Dextrosa	20
	Agar	15

6.1.2.2 Medios líquidos

Los medios líquidos utilizados son: YPG, para la preparación de inóculos, medio mineral (Martínez *et al.*, 1997) y medio mineral suplementado con medios de cultivo complejos que han sido reportados previamente para el crecimiento y producción de *B. subtilis* (Schaeffer, 1969; Kang *et al.*, 1992).

La composición y preparación de los medios YPG y mineral se detallan en las **Tablas 6.3 y 6.4**. En la preparación de los medios suplementados se utiliza la composición y preparación del medio mineral y se adiciona (previamente esterilizado y por separado) 5 g/l de caldo nutritivo, extracto de levadura y peptona, y una combinación de los tres componentes en una concentración de 1.66 g/l.

Tabla 6.3. Composición del medio de cultivo YPG líquido

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

Tabla 6.4. Composición del medio mineral.

Medio	Componente	g/l
Mineral (pH = 7.2)	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.000
	K ₂ HPO ₄	5.320
	KH ₂ PO ₄	6.400
	Dextrosa	10.000
	MgSO ₄ • H ₂ O	0.400
	MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.00785
	CaCl ₂	0.040
	FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.030

Preparación del medio mineral

Se preparó una solución con el sulfato de amonio y los fosfatos de potasio y el pH se ajustó a 7.2 con NaOH al 40 %. La solución se esterilizó y se añadieron, en condiciones estériles, las soluciones de dextrosa y las sales restantes por separado. Todas las soluciones se esterizaron en autoclave, a excepción de la solución de sulfato de hierro, la cual se esterilizó en filtros con membrana de 0.22 μm de tamaño de poro, previamente esterilizada en autoclave.

6.1.3 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se toman 0.1 ml de glicerol, conteniendo la bacteria, y se estría en una caja Petri conteniendo YPG y agar. La caja Petri se incuba a 30 °C por 24 h. Posteriormente, se activa la cepa transfiriendo 5 asadas de las colonias formadas en medio YPG en una relación de 1 % con respecto al inóculo. A continuación se transfiere a medio YPG fresco, en una relación de 10 % del volumen total, y se incuba el(los) matraz(es) en una incubadora con agitación a 30 °C, 200 rpm por 12 h hasta alcanzar una concentración igual a 2 DO (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml).

6.1.4 Cultivos en fermentador de 10 L

El cultivo en fermentadores de 10 L (**figura 6.3**) se utilizó para la selección del medio de cultivo, producción de compuestos antifúngicos y para estudiar la cinética de crecimiento y producción de esporas de *B. subtilis* 83.



Fig. 6.3 Biorreactor de 10 L ubicado en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBT/UNAM.

6.1.4.1 Condiciones de cultivo

Se realizaron cultivos en biorreactores de 14 L de volumen nominal (New Brunswick Scientific, modelos Labroferm y Microferm). 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 l/min), 30 °C, 230 rpm, sin control de pH, control de espuma (Clerol y AF, Dow Corning, al 30 % p/v, vigilado por medio de un sistema que constituye un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica), 24 horas de cultivo.

Se determinaron glucosa residual, pH, UFC/ml totales (que es igual a la suma de células vegetativas viables y esporas viables), esporas/ml (tratamiento térmico a 80 °C/15 min) y amonio residual cada 4 horas del cultivo. Estas técnicas se detallan más adelante en la sección 6.2. La viabilidad se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{esporas viables}}{\text{esporas totales}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec.1}$$

6.1.5 Cultivos en lote alimentado

El cultivo en lote alimentado se utilizó para incrementar la concentración de células vegetativas, mediante la alimentación del sustrato limitante (glucosa) durante la fase exponencial del cultivo. Se inició con un cultivo en lote, evitando llegar a concentraciones de glucosa que inicien el proceso de esporulación, seguido de una etapa de alimentación del sustrato limitante y finalizando con una etapa en lote para inducir la esporulación.

6.1.5.1 Cultivo alimentado A

Para la realización del cultivo alimentado A se utilizaron biorreactores de 14 L de volumen nominal (New Brunswick Scientific, modelos Labroferm y Microferm).

6.1.5.1.1 Condiciones de cultivo

Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: volumen de trabajo inicial 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 l/min),

30 °C, 230 rpm, sin control de pH, control de espuma (Clerol y AF, Dow Corning, al 30 % p/v, controlado por medio de un sistema que constituye un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica). Se alimentó 1 litro de una solución de glucosa concentrada a 300 g/l (cuando la concentración de glucosa en el medio de fermentación llegaba a aproximadamente 3 g/l, se adicionó 200 ml de la solución, esto se efectuó en cinco ocasiones), conjuntamente con las sales minerales del medio de cultivo en una concentración dos veces mayor (2x) a la de un cultivo lote convencional para *B. subtilis* 83.

Se determinaron glucosa residual, pH, UFC/ml totales (que es la suma de células vegetativas viables y esporas viables), esporas/ml (tratamiento térmico a 80 °C/15 min) y amonio residual. La viabilidad se determinó mediante la **ecuación 1**.

6.1.5.2 Cultivos alimentados B y C

Los cultivos alimentados B y C se llevaron a cabo en biorreactores de 5 L de volumen operacional (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo® 110/software: Biocomand®). Para la adición del sustrato limitante se utiliza una bomba peristáltica de precisión (BioChemTechnology, Malvern, PA).

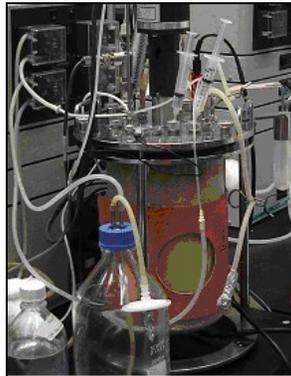


Fig. 6.4 Biorreactor de 4 L ubicado en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBT/UNAM.

6.1.5.2.1 Condiciones de cultivo

Las condiciones de operación fueron las siguientes: volumen de trabajo inicial de 3.5 L, 2 turbinas Rushton de 6 paletas con un diámetro de 0.046 m, aireación de 1 vvm, 30 °C, 759.5 rpm, control de pH con NaOH 2 N (controlado por el CPU), control de espuma (Clerol y AF, Dow Corning,

al 30 % p/v, controlado por CPU). Se alimenta 1 litro de una solución de glucosa concentrada a 300 g/l simultáneamente con las sales minerales del medio de cultivo en una concentración igual (1x) y dos veces (2x) mayor a la de un cultivo lote convencional para *B. subtilis* 83. El perfil de alimentación fue exponencial y esta dado por el siguiente balance de masa:

$$\frac{d}{dt}(VX) = V\mu X \quad (\text{biomasa}) \quad \dots\dots\dots\text{Ec. 2}$$

$$\frac{d}{dt}(VS) = FS_0 - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}} \quad (\text{sustrato}) \quad \dots\dots\dots\text{Ec. 3}$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (\text{volumen}) \quad \dots\dots\dots\text{Ec.4}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento, t es el tiempo, V es el volumen del reactor, X es la concentración de biomasa en el reactor, S es la concentración del sustrato en el reactor, S_0 es la concentración del sustrato en la alimentación, $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato y F es la velocidad de flujo. Considerando el caso donde la velocidad específica de crecimiento (μ) es controlada a un valor constante. Dado un $t = 0$, entonces $V = V_0$ y $X = X_0$, la ecuación puede ser integrada y escrita como:

$$XV = X_0V_0 \exp(\mu t) \quad \dots\dots\dots\text{Ec. 5}$$

Asumiendo que existe un estado pseudoestacionario para la concentración de sustrato, $(d/dt)(VS) = 0$. Si se asume que $Y_{X/S}$ es constante sobre el tiempo, entonces sustituyendo la Ec. 5 en la Ec. 3, obtenemos:

$$F = \frac{\mu XV}{S_0 Y_{X/S}} = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{S_0 Y_{X/S}} = F_0 \exp \mu t \quad \dots\dots\dots\text{Ec. 6}$$

Como puede ser visto en la Ec. 6, el perfil de alimentación es exponencial. Sustituyendo la Ec. 6 en la Ec. 4, tenemos:

$$V = \frac{V_0}{\mu} (\mu + AX_0 \exp(\mu t) - AX_0)$$

donde $A = \frac{\mu}{Y_{X/S} S_0}$ Ec. 7

Entonces, sustituyendo la Ec. 7 en la Ec. 5 se obtiene una expresión para la concentración celular en el curso del tiempo bajo estas condiciones:

$$X = \frac{\mu X_0 \exp(\mu t)}{(\mu + AX_0 \exp(\mu t) - AX_0)} \dots\dots\dots Ec. 8$$

En estos cultivos se determinaron glucosa residual, pH, UFC/ml totales (que es la suma de células vegetativas viables y esporas viables), esporas viables/ml (tratamiento térmico a 80 °C/15 min) y amonio residual. Por su parte, la viabilidad fue determinada mediante la **ecuación 1**.

6.1.5.2.2 Reproducción de resultados en el fermentador de 4 L

En trabajos anteriores dentro de nuestro grupo de investigación, se realizaron pruebas de escalamiento ascendente, de matraz a fermentador de 10 L, con el medio de cultivo mineral utilizado en este trabajo. El criterio de escalamiento utilizado fue el de la potencia volumétrica (Rodríguez, 2005). Con estos antecedentes se decidió trasladar los resultados del biorreactor de 10 L a uno de 4 L.

La potencia volumétrica obtenida para el biorreactor de 10 L fue 0.47 W/L, criterio con el se trabajó en el biorreactor de 4 L. Por lo tanto, siguiendo este criterio, en el biorreactor de 4 L la potencia total es de 4.7 Watts, suponiendo que Pg/P es del 80 %, entonces la potencia total sin airear es de 3.76 Watts, por lo que la potencia por impulsor en el biorreactor de 4 L (2 impulsores) es de 1.88 Watts. La velocidad de agitación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$N = \sqrt[3]{\frac{P}{P_o \rho D^5}} \dots\dots\dots Ec. 9$$

Donde:

N = velocidad de agitación

P = Potencia (1.88 Watts)

Po = Número de potencia (4.5 teórico)

ρ = Densidad (1000 Kg/m³)

D = Diámetro del impulsor (0.046 m)

Estos datos se sustituyeron en la ecuación anterior y resulta una velocidad de agitación de 12.658 rps, igual a 759.5 rpm.

6.2 Métodos analíticos

6.2.1 Cuantificación de células totales mediante conteo directo

La cuantificación de las células totales de *B. subtilis* (células vegetativas viables y no viables y esporas viables y no viables) se determinó mediante conteo directo en el microscopio, utilizando la cámara de Neubauer.

La cámara Neubauer consta de un cubreobjetos de cuarzo y un portaobjetos de un grosor mayor a los de uso común (**figura 6.5**). En la parte superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de 9 mm² de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña (**figura 6.5 A-B**).

Usando el objetivo de 10x de un microscopio óptico, se enfoca de forma que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponda a 1 mm²; generalmente se trabaja con el cuadro central. El área del cuadro central es de 1 mm² y se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide 0.2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será de 0.04 mm² (**figura 6.5 C**).

Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0.1 mm, de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados será 0.004 mm³ (0.04 mm² × 0.1 mm = 0.004 mm³).

Cuando la muestra (100 μL) se haya colocado en el centro de la cámara y se haya colocado el cubre objetos, se coloca la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y se enfoca con el objetivo de 10x. Posteriormente se localiza el cuadro central de la rejilla (ubicando la cuadrícula de 25 cuadros de 0,04 mm^2), se hace un cambio de lente al objetivo de 40x y se realiza un acoplamiento a un sistema de cómputo, el cual permite amplificar y digitalizar la imagen de los cuadrantes de la cámara de Neubauer (**figura 6.5**). La adquisición de la imagen se hizo con el programa comercial *Image Pro Plus 4.1* (Media Cybernetics, MD, E.E.U.U.). Cabe señalar que sin este acoplamiento, la cuenta de células resulta imposible debido al tamaño de las células y a la magnificación del objetivo (40x) del microscopio. Finalmente se realiza el conteo celular. Se realiza el cálculo de la concentración celular empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Cel/ml} = (\text{total de células contadas en la cuadrícula}) \times (4 \times 10^6) \times (\text{factor de dilución}) \quad \text{.Ec. 10}$$



Fig. 6.5 Sistema de análisis de imágenes acoplado a un microscopio

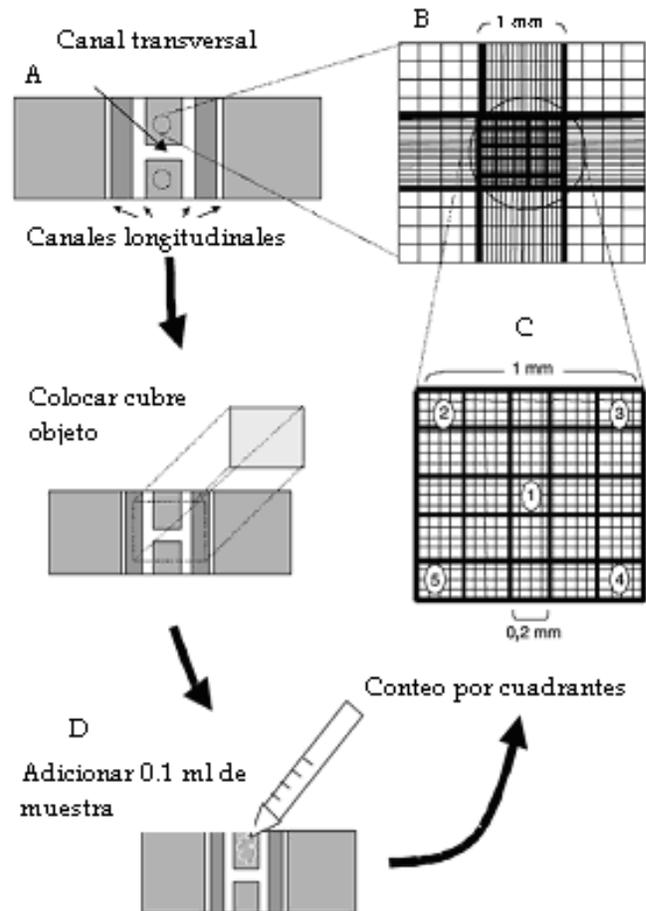


Fig. 6.6 Esquema de uso de la cámara de Neubauer.

6.2.2 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante cuenta en placa

- Se realizan diluciones de la muestra (caldo de fermentación) en tubos de vidrio de 13 x 150 mm conteniendo solución salina al 0.85 %.
- Se toma 0.1 ml de las soluciones y se colocan en cajas Petri con medio YPG y agar. La muestra se homogeniza con perlas de vidrio sobre la superficie de la caja.
- Las cajas Petri inoculadas se incuban durante 48 h a 30 °C y se revisan a las 24 y 48 h de incubación. La cuantificación de UFC/ml se realiza a las 48 h de incubación empleando la siguiente ecuación:

$$\text{UFC/ml} = \text{UFC/volumen de dilución adicionado a la caja} \dots\dots\dots \text{Ec. 11}$$

6.2.3 Cuantificación de esporas

Las esporas se cuantificaron mediante cuenta en placa. Las diluciones que se inoculan se someten a un tratamiento térmico de 85 °C durante 15 minutos para eliminar las células vegetativas del cultivo (Harwood y Cutting, 1990; Rodríguez, 2005). En el tratamiento térmico se utilizaron tubos de ensayo de vidrio (los cuales contenían las muestras en diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}), los cuales se mantuvieron en un baño de agua a una temperatura de 85 °C durante 15 minutos. Posteriormente se tomaron 0.1 ml de la dilución y se colocaron en una caja Petri con medio sólido YPG. La muestra se homogenizó con perlas de vidrio sobre la superficie de la caja. Finalmente, las cajas Petri inoculadas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se cuantifican las colonias formadas a las 24 y 48 h de incubación. La cuantificación de esporas viables/ml se realizó empleando la **Ec. 11**.

6.2.4 Determinación de glucosa residual

La muestra se filtra en una membrana Millipore de 0.22 micras para eliminar las células bacterianas y se analiza, para la determinación de glucosa residual, en un analizador Yellow Spring Instruments (YSI), modelo 2700-S. 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.

6.2.5 Determinación de NH_4^+ residual

La cuantificación de amonio se basa 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-hidroxifeniliminobenzoquinona, el cual es cuantificado colorimétricamente a 635 nm.

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

- Se preparan 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 preparan 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 adiciona 1 ml de la solución A en un tubo con rosca y se colocan 25 μ l de la muestra problema (estándares o caldo de fermentación). Posteriormente se agita en un vortex, se adiciona 1 ml de la solución B y se agita nuevamente.
- El tiempo de la reacción de la mezcla es de 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se leen en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU 650). Para la solución blanco se utiliza agua desionizada como muestra problema.
- Una vez realizadas las lecturas de absorbancia de los estándares, éstas se grafican contra su respectiva concentración y se construye una curva de calibración mediante el ajuste de los puntos por el método de mínimos cuadrados. Posteriormente se obtiene la pendiente y la ordenada en el origen para calcular las concentraciones de amonio de las muestras problema. Para más detalles en la sección 13 se muestra una curva de calibración estándar.

6.2.6 Bioensayos de antagonismo *in vitro*

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* tomando como modelo de estudio al hongo fitopatógeno *Fusarium spp.* (**figura 6.6**). En estas pruebas se evaluó el efecto antagónico de los metabolitos producidos por *B. subtilis* 83 de la siguiente manera:

- El caldo de cultivo obtenido de la fermentación de *B. subtilis* 83 fue filtrado en membranas de 0.22 μ m de diámetro de poro, con el fin de separar el paquete celular de los metabolitos producidos.

- El sobrenadante libre de células fue sometido a un tratamiento térmico que consiste en un calentamiento con vapor a 121 °C durante 15 minutos (en autoclave).
- Se depositan 20 µl de la muestra (A) en dos orificios equidistantes, hechos en una placa de medio PDA y con ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro.
- En otros dos orificios equidistantes se depositan 20 µl de medio de cultivo o agua destilada estéril, como testigo (B).
- *Fusarium spp.* se inocula en el centro de la caja Petri en forma de explante de 5 mm de diámetro de medio PDA con micelio del hongo previamente crecido durante 6 días (C).
- Las cajas se incuban a 30 °C por 6 días y se compara el crecimiento micelial de *Fusarium spp.* en el área de la caja Petri, en presencia del tratamiento y el testigo para obtener un porcentaje de inhibición.

Inhibición (%) = 100 % - X %Ec. 12

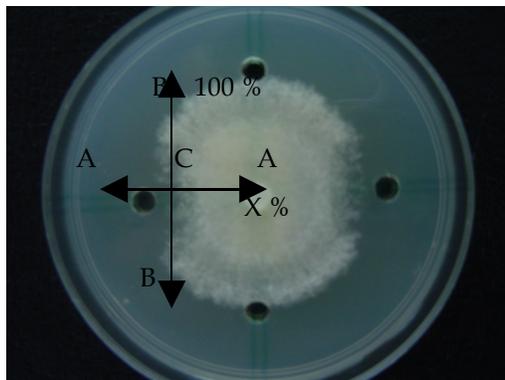


Fig. 6.7 Bioensayos

6.2.7 Técnica de eliminación de gas para la determinación del $k_L a$

La técnica de eliminación de gas es un método indirecto para la determinación del $k_L a$ 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).

La 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 aplica la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_g^* - C_L) - Q_{O_2} X \dots\dots\dots \text{Ec. 11}$$

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 ningun microorganismo está presente, por lo que se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_g^* - C_L) \dots\dots\dots \text{Ec. 12}$$

- Rearreglando la **ecuación 12** se obtiene la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{1 - C_L}{C_g^*} = -k_L a \dots\dots\dots \text{Ec. 13}$$

- Si se realiza un grafica con la **ecuación 13** 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 4 L las condiciones fueron las siguientes: 759.5 rpm para una P/V de 0.47 W/L, 1 vvm, 30 °C y 4 L de medio mineral, mientras que para el fermentador de 10 L las condiciones fueron: 230 rpm para una p/V de 0.47 W/L, 1 vvm, 30 °C y 10 L de medio mineral.

7. Resultados y discusión

7.1 Cinéticas de crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* 83 en el medio mineral

En la **figura 7.1** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83 en cultivo lote con el medio mineral. El experimento se realizó por triplicado y se grafica el promedio de las tres réplicas mostrando las desviaciones estándar de los parámetros medidos. Se observa que la máxima concentración de células vegetativas viables fue de 1.24×10^9 UFC/ml a las 12 h de cultivo, concentración ligeramente mayor a la obtenida por Rodríguez (2005) con la cepa *B. subtilis* CPA, ya que alcanzó aproximadamente 7×10^8 UFC/ml al mismo tiempo de cultivo. Por otra parte, hubo un incremento significativo en la concentración de esporas a las 16 h de cultivo, con respecto a las 12 h. Al final de la fermentación se obtienen 7.2×10^8 esporas viables/ml, concentración sensiblemente menor a la obtenida por Rodríguez (2005) (1×10^9 esporas viables/ml). Comparando los resultados de la cepa *B. subtilis* 83 con la cepa de *B. subtilis* estudiada por Rodríguez (2005) podemos decir que hay una gran similitud entre estas dos cepas, ya que los perfiles de crecimiento y esporulación bacteriana son muy parecidos, así como los perfiles de consumo de sustratos.

Para la determinación del k_{La} en el fermentador de 4 L las condiciones fueron las siguientes: 759.5 rpm para una P/V de 0.47 W/L, 1 vvm, 30 °C y 4 L de medio mineral, mientras que para el fermentador de 10 L las condiciones fueron: 230 rpm para una p/V de 0.47 W/L, 1 vvm, 30 °C y 10 L de medio mineral.

7. Resultados y discusión

7.1 Cinéticas de crecimiento y esporulación de *Bacillus subtilis* 83 en el medio mineral

En la **figura 7.1** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83 en cultivo lote con el medio mineral. El experimento se realizó por triplicado y se grafica el promedio de las tres réplicas mostrando las desviaciones estándar de los parámetros medidos. Se observa que la máxima concentración de células vegetativas viables fue de 1.24×10^9 UFC/ml a las 12 h de cultivo, concentración ligeramente mayor a la obtenida por Rodríguez (2005) con la cepa *B. subtilis* CPA, ya que alcanzó aproximadamente 7×10^8 UFC/ml al mismo tiempo de cultivo. Por otra parte, hubo un incremento significativo en la concentración de esporas a las 16 h de cultivo, con respecto a las 12 h. Al final de la fermentación se obtienen 7.2×10^8 esporas viables/ml, concentración sensiblemente menor a la obtenida por Rodríguez (2005) (1×10^9 esporas viables/ml). Comparando los resultados de la cepa *B. subtilis* 83 con la cepa de *B. subtilis* estudiada por Rodríguez (2005) podemos decir que hay una gran similitud entre estas dos cepas, ya que los perfiles de crecimiento y esporulación bacteriana son muy parecidos, así como los perfiles de consumo de sustratos.

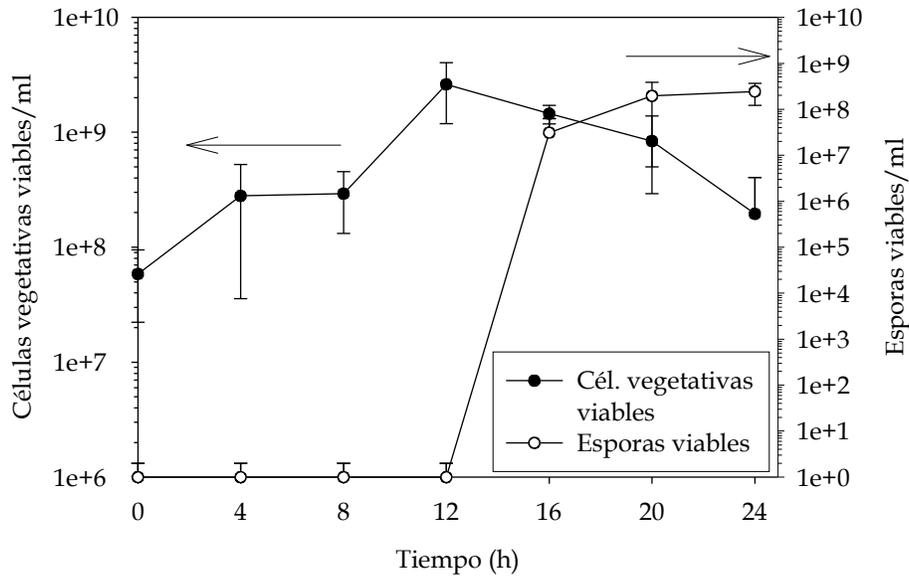


Fig. 7.1 Cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83 en cultivo lote con el medio mineral.

En la **figura 7.2** se muestra la cinética de crecimiento, la esporulación, concentraciones de sustratos en el cultivo y producción de compuestos antifúngicos de *B. subtilis* 83 a lo largo del cultivo en el medio mineral. El experimento se realizó por triplicado y se grafica el promedio de las tres réplicas. Las barras verticales indican las desviaciones estándar de los parámetros medidos. El incremento de la concentración de esporas viables a las 16 h de cultivo, con respecto al las 12 h (**figura 7.2a**), correspondió a 4 horas después de que se agotó completamente la fuente de carbono (glucosa) en el medio de cultivo (**figura 7.2b**). Esto coincide con lo reportado por Walker (2000), quien menciona que el proceso de esporulación en bacterias del género *Bacillus* se presenta en un tiempo aproximado de 6 h desde que el nutriente limitante se agota. La viabilidad de las esporas resultó en un 28.4 %. Por otra parte, la relación de las células vegetativas viables que se convierten en esporas viables fue del 10 %. En la **figura 7.2a** se puede observar la concentración de células vegetativas viables que se convierten a esporas viables, ya que estas concentraciones se muestran en la misma escala.

Por otro lado, el crecimiento de la bacteria no se vio limitado por la fuente de nitrógeno, ya que el amonio no se agotó durante el cultivo (**figura 7.2b**). En trabajos previos, Sahoo *et al.* (2004)

mencionan que cuando *B. subtilis* se encuentra en condiciones de anaerobiosis se inhibe el proceso de esporulación. En este caso, podemos notar que el oxígeno no fue un factor limitante en el crecimiento y esporulación de la bacteria, ya que aunque la tensión de oxígeno disuelto descendió hasta niveles menores a 10 % (en relación a la saturación con aire), y en algunos casos llegó hasta un valor de 0 % (**figura 7.2c**), *B. subtilis* 83 llevó a cabo el proceso de esporulación tiempo después de que se observaron estos niveles de oxígeno disuelto en el medio.

En la **figura 7.2c** se observa que el pH disminuyó significativamente en las primeras 12 horas de cultivo, lo que coincide con lo reportado por Nakata y Halvorson (1960). Ellos mencionan que cuando las bacterias del género *Bacillus* crecen en presencia de glucosa, el pH disminuye hasta 5-6 como resultado de la producción de ácidos orgánicos como el piruvato y el acetato. Además, Asante y Neal (1993) reportan que algunas sustancias con actividad antifúngica que produce *B. subtilis* son ácidos de bajo peso molecular como ácido acético, ácido isobutírico y ácido α -metilbutírico.

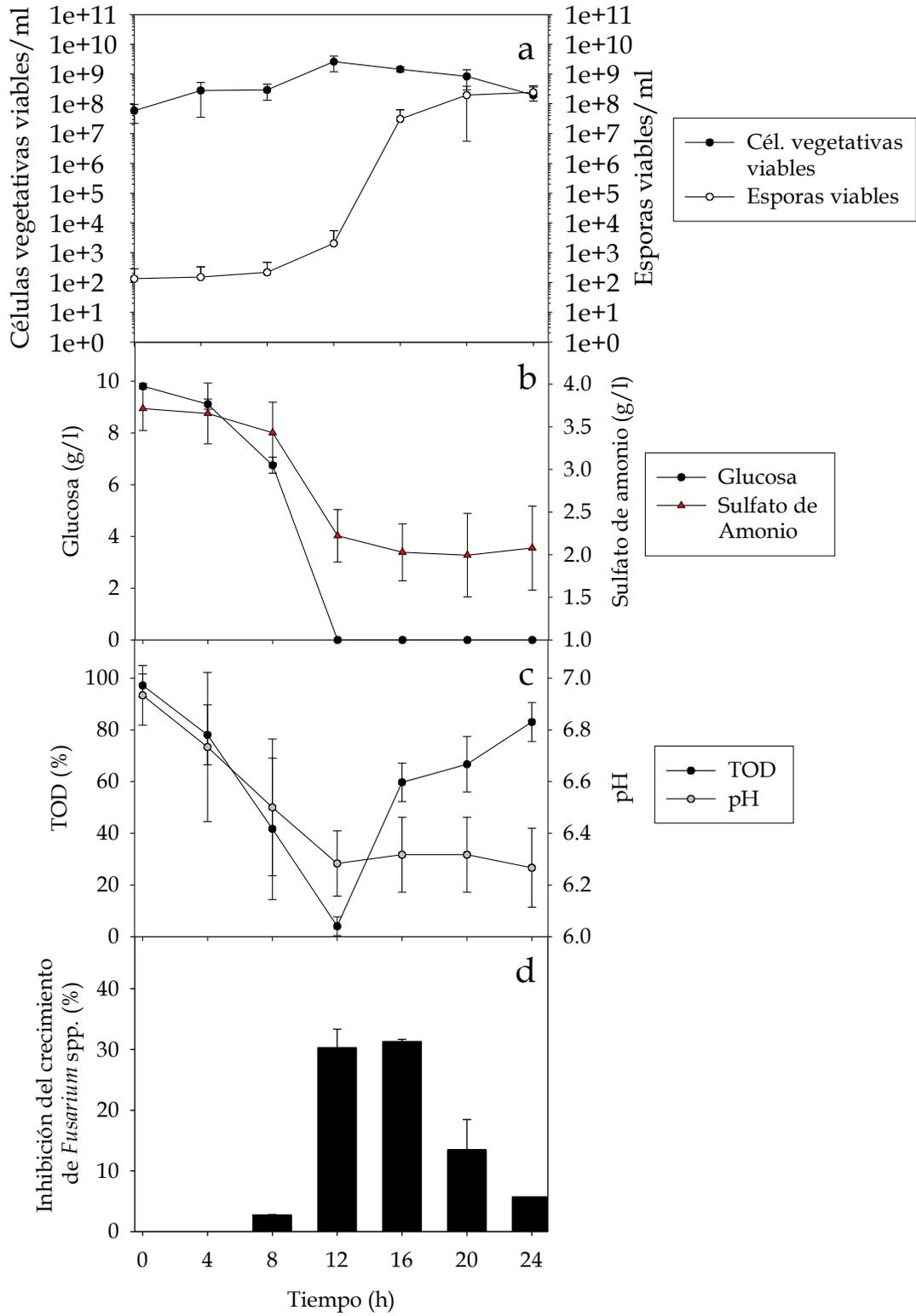


Fig. 7.2 Cinética de crecimiento y de esporulación de *B. subtilis* 83 (a) en medio mineral, concentración de sustratos (b), evolución de pH y de la tensión del oxígeno disuelto (TOD) (c), producción de compuestos antifúngicos (d).

Shuler y Kargi (1992) reportaron que si el amonio es la única fuente de nitrógeno, como es el caso de este medio de cultivo, los iones hidronio son liberados al medio como resultado de la utilización microbiana del amonio, resultando en una disminución del pH.

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* usando al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. Se determinó la actividad antagonista de los metabolitos, tanto crudos como resistentes al proceso de esterilización, producidos por *B. subtilis* 83. En la **Figura 7.2d**, se puede observar que existe actividad antimicrobiana ocasionada por los metabolitos de *B. subtilis* 83 al someterlos al proceso de esterilización. Este resultado se transforma en una ventaja, debido a que facilita la formulación de un producto comercial con esporas de *B. subtilis* 83 resistentes a las temperaturas de esterilización.

En la **figura 7.2d** se presenta únicamente la cinética de producción de compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización por *B. subtilis* 83 a diferentes tiempos del cultivo. Esto se decidió debido a que, desde el punto de vista de la formulación, es conveniente estudiar a los compuestos antifúngicos que resistan altas temperaturas, como la de esterilización, ya que estos compuestos se mantendrán después de ser formulados. Se puede notar que esta bacteria empezó a sintetizar compuestos antifúngicos entre las 4 y 8 h de cultivo, ya que en los bioensayos realizados a partir de la muestra de las 8 h se observó inhibición de *Fusarium* spp. La máxima inhibición de *Fusarium* spp. se presentó a las 16 h (30 %) y posteriormente disminuyó hasta alcanzar un porcentaje de inhibición del 12 %.

La naturaleza de los compuestos antifúngicos termorresistentes pudiera ser que esté relacionada con los siguientes compuestos: subtilina, iturinas, maltazinas, micosubtilisina, bacilopeptinas, surfactina y 7-O-Malonil macrolactin A. Estos compuestos mantienen su actividad antimicrobiana a altas temperaturas (Banerjee y Norman, 1988; Bernal *et al.* 2002; Hagelin *et al.* 2004; Kajimura *et al.* 1995; Mannanov y Sattarova, 2001; Martín y Gottlieb, 1955; Stein y Entian, 2002; Tabarez *et al.* 2006).

Para estudiar el efecto de la adición de un medio de cultivo complejo al medio de cultivo mineral sobre las cuentas viables se consideró estudiar la suplementación del medio de cultivo mineral con otros nutrientes que pudieran incrementar la concentración de las células vegetativas

viabiles y de las esporas viabiles. Los nutrientes que han sido utilizados para maximizar la producción de biomasa (células viabiles) en especies del género *Bacillus* son: caldo nutritivo, peptona y extracto de levadura (Schaeffer, 1969; Kang *et al.*, 1992).

7.2 Cinéticas de crecimiento y producción de esporas de *B. subtilis* 83 en diferentes medios de cultivo

En la **figura 7.3** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83 en los medios suplementados con extracto de levadura (5 g/l), caldo nutritivo (5 g/l), peptona (5 g/l) y la combinación de todos los suplementos (extracto de levadura 1.66 g/l, caldo nutritivo 1.66 g/l y peptona 1.66 g/l). Los experimentos se realizaron por triplicado y se graficó el promedio de las tres réplicas. Las barras verticales en los puntos graficados indican las desviaciones estándar de los experimentos. En algunos casos, las desviaciones son de la misma magnitud del símbolo empleado.

En el medio suplementado con extracto de levadura se alcanzó sensiblemente la máxima concentración de células vegetativas viabiles de *B. subtilis* 83 (**figura 7.3a**), 1.6×10^9 UFC/ml a las 16 h de cultivo, concomitante con el agotamiento de la glucosa (**figura 7.4a**) y el inicio del proceso de esporulación. La concentración de esporas viabiles al final del cultivo fue de 9×10^7 esp/ml.

En el caso de los medios suplementados con caldo nutritivo y la combinación de todos los nutrientes (**figura 7.3b y d**), la máxima concentración de células vegetativas viabiles que se obtuvo fue de 8.5×10^8 UFC/ml y 1.2×10^9 UFC/ml, respectivamente, a las 8 h de cultivo, tiempo en el que la glucosa se agota (**figuras 7.4b y 7.5b**) e inicia el proceso de esporulación. Se llegó a una concentración de esporas viabiles de 4×10^8 esp/ml para el medio suplementado con caldo nutritivo y 1×10^7 esp/ml para el medio suplementado con todos los nutrientes.

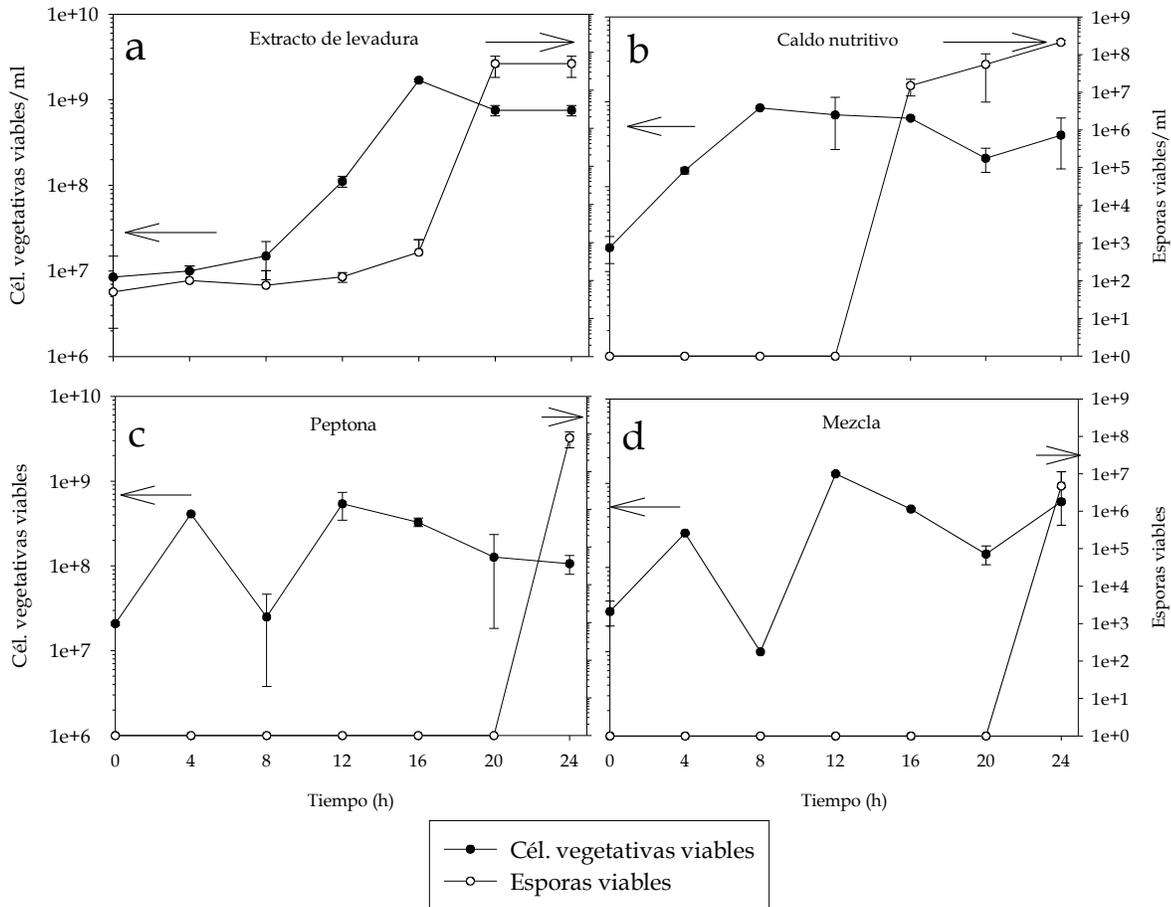


Fig. 7.3 Cinética de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83 en los medios suplementados con extracto de levadura (a), caldo nutritivo (b), peptona (c) y la combinación de todos los suplementos (d).

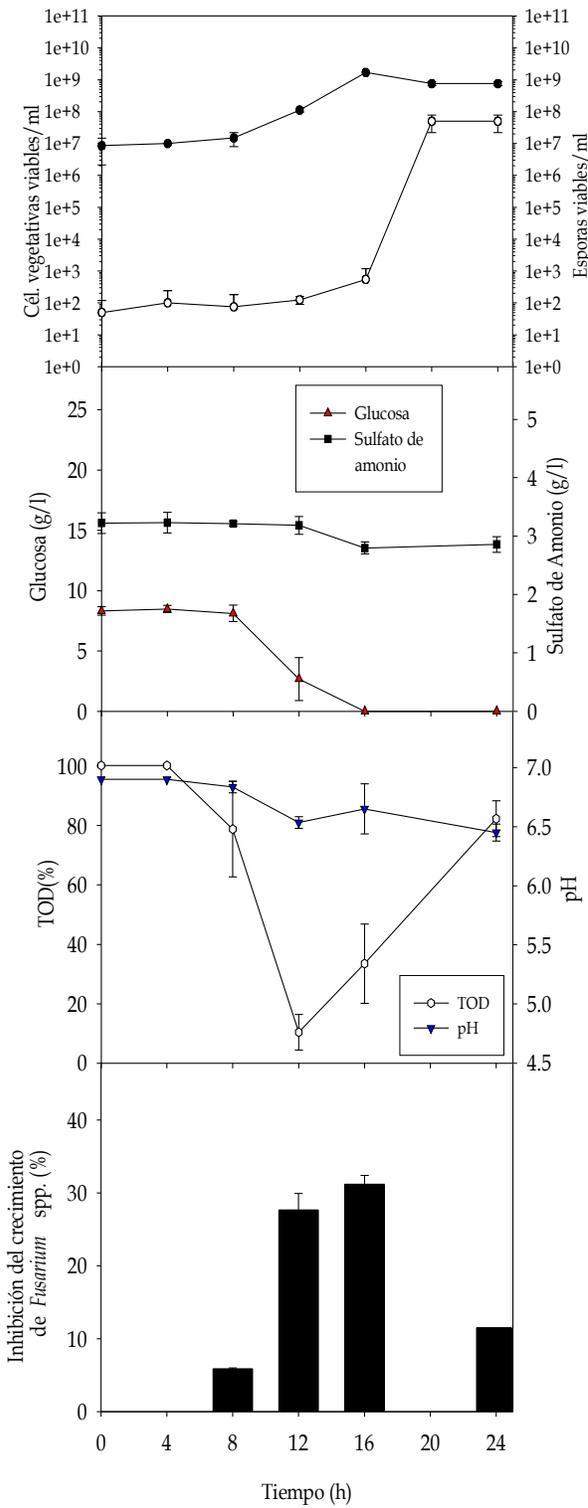
Para el medio suplementado con peptona, la máxima concentración de células vegetativas viables que se logró fue de 5.4×10^8 UFC/ml a las 12 h de cultivo, justamente cuando se agota la glucosa y aunque las esporas se detectan hasta las 24 horas, se obtiene una concentración de esporas viables de 1×10^8 esp/ml. Esta aparición tardía de las esporas viables se debe, posiblemente, a que

aunque en el medio de cultivo ya no había glucosa, la célula pudo haber utilizado otros nutrientes para mantenimiento y evitar, por un tiempo, el inicio de la esporulación. En estos experimentos, la concentración de esporas viables al inicio del cultivo, en algunos casos, fue diferente ya que no se había caracterizado la forma de inocular, por lo que al inicio de los cultivos ya existía concentración de esporas viables. Sin embargo, para los siguientes cultivos se inoculó sin esporas viables.

En la **figura 7.4** se muestran la cinética de crecimiento, la esporulación, concentración de sustratos en el medio y producción de compuestos antifúngicos de *B. subtilis* 83 en los medios suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo. La **figura 7.5** presenta lo anterior, pero en los medios suplementados con peptona y la combinación de todos los suplementos. Los experimentos se realizaron por triplicado y se graficó el promedio de las tres réplicas. Las barras verticales en los puntos graficados indican las desviaciones estándar de los experimentos. En algunos casos, las desviaciones son de la misma magnitud del símbolo empleado.

En los paneles superiores de las **figuras 7.4 y 7.5**, la concentración de células vegetativas viables y esporas viables están graficados en una misma escala para diferenciar la conversión de células vegetativas viables a esporas viables. Comparando con el medio mineral no suplementado, se esperaba lograr concentraciones mayores de células vegetativas, por ser éstos medios nutritivos en donde existen nutrientes que favorecen el crecimiento de la bacteria (Schaeffer, 1969; Kang *et al.*, 1992). Sin embargo, esto no sucede y, además, en algunos casos, la máxima concentración de células vegetativas se alcanza en un tiempo mayor (16 h) comparado con el medio mineral no suplementado (ver detalles en la sección 7.3). Este hecho puede estar relacionado con lo reportado por Luna *et al.* (2002) y por Jung *et al.* (2005), en donde reportan que bacterias del género *Bacillus* utilizan el extracto de levadura y la peptona como fuente de nitrógeno. Esto concuerda con el perfil del consumo de amonio, en donde se muestra que no hubo un cambio apreciable en la concentración de este componente en todos los medios suplementados. Es posible que en estos casos, la célula utilice estos suplementos como fuente de nitrógeno ya que como fuente de carbono, el aprovechamiento como tal sería ineficiente, además de que la célula gastaría más energía en metabolizarla. La tensión de oxígeno disuelto en los cultivos suplementados fue cercana al 10 % entre las 8 y las 12 h de cultivo y se incrementa a tiempos posteriores, cuando la bacteria comienza el proceso de esporulación, llegando a valores cercanos al 100 % al final del cultivo, cuando se alcanza la máxima concentración de esporas. Los valores de pH disminuyen a lo largo del cultivo, esto puede ser relacionado con la producción de los compuestos antifúngicos, ya que se ha reportado que algunos de ellos pueden ser ácidos de bajo peso molecular, como ácido acético, ácido isobutírico, ácido α -metilbutírico (Asante y Neal, 1993).

a Extracto de levadura



b Caldo nutritivo

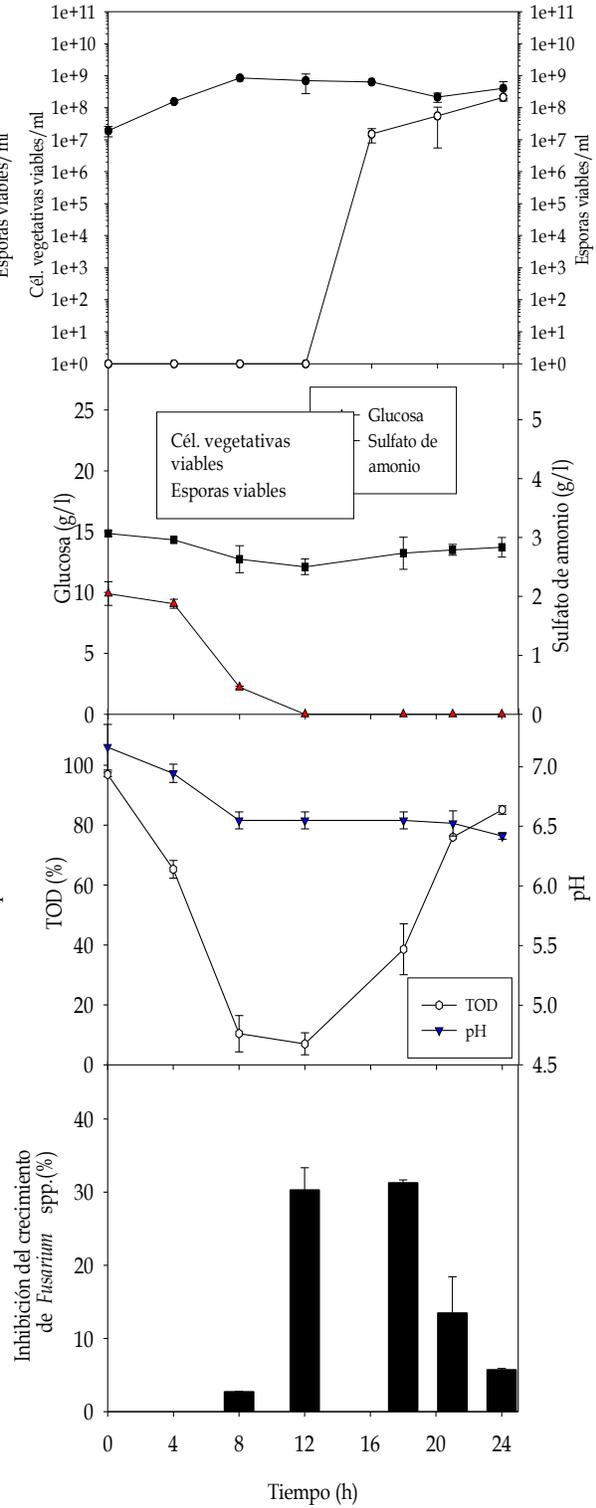


Fig. 7.4 Cinéticas de crecimiento y de esporulación de *B. subtilis* 83 en los medios suplementados con extracto de levadura (a) y caldo nutritivo (b). Consumo de sustratos, evolución de pH, evolución del oxígeno disuelto y producción de compuestos antifúngicos.

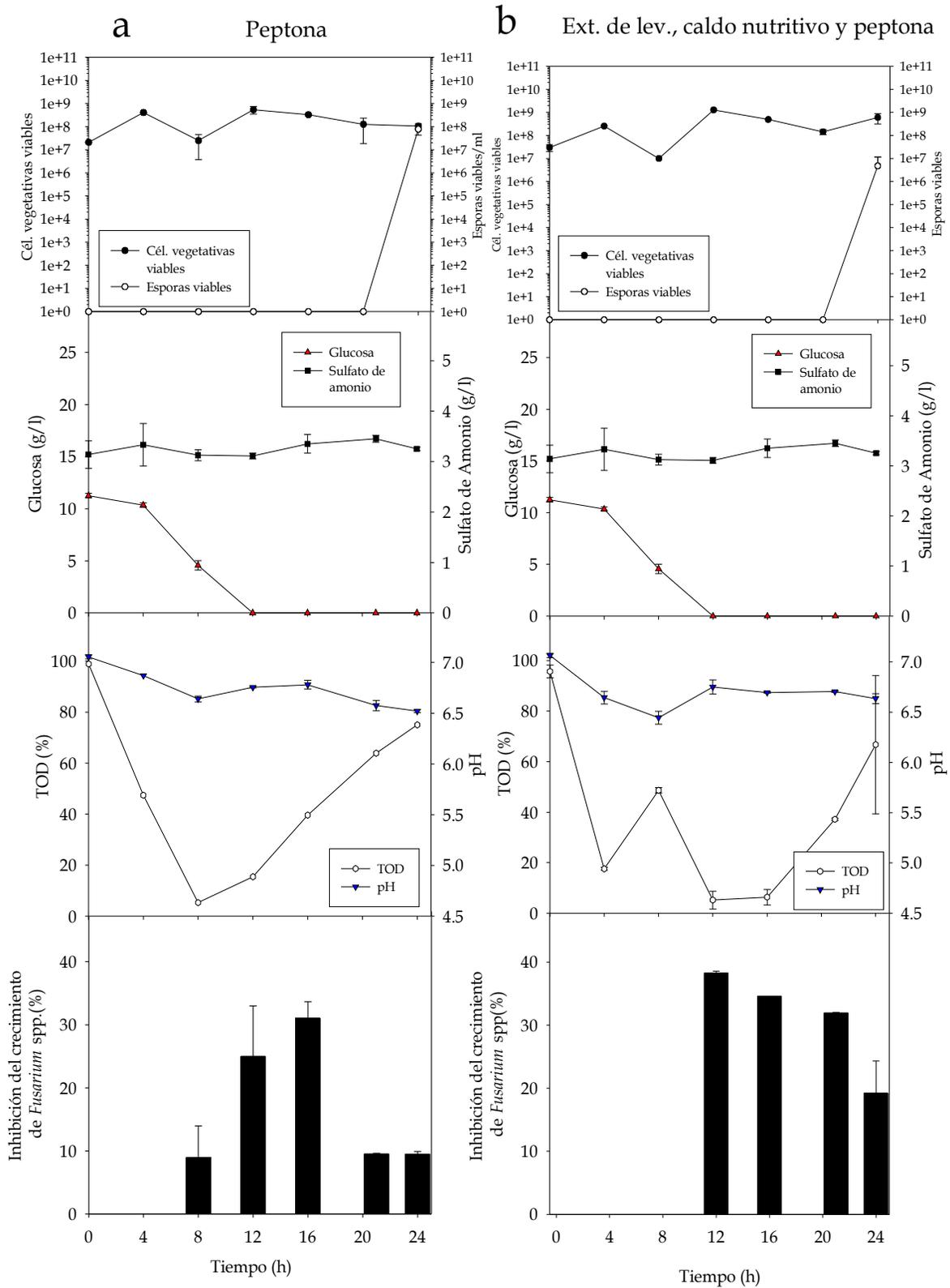


Fig. 7.5 Cinéticas de crecimiento y de esporulación de *B. subtilis* 83 en los medios suplementados con peptona (a) y la combinación de los nutrientes (b). Consumo de sustratos, evolución de pH, evolución del oxígeno disuelto y producción de compuestos antifúngicos.

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* usando al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. para ver si la bacteria sintetizaba compuestos antifúngicos en los medios de cultivo probados. *B. subtilis* 83 logró sintetizar compuestos antifúngicos en los medios complejos y, además, éstos fueron resistentes al proceso de esterilización (**figuras 7.4 y 7.5** paneles inferiores). El porcentaje de inhibición de los compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización producidos por la bacteria en los diferentes medios de cultivo se encuentra alrededor del 30 %. Se esperaba que en el medio suplementado con peptona hubiera un mayor porcentaje de inhibición ya que Yoshida *et al.* (2001) sugieren que la peptona es el principal componente para la producción de compuestos antifúngicos por esta bacteria. En la **figura 7.4**, en los paneles inferiores, a la hora 20 de cultivo para el extracto de levadura y 16 para el caldo nutritivo, los porcentajes de inhibición sobre *Fusarium* spp. no se muestran debido a problemas técnicos.

7.3 Selección del medio de cultivo

El **cuadro 7.1** muestra las concentraciones de las células vegetativas viables de *B. subtilis* 83 y normalizadas con respecto a la concentración inicial de células vegetativas viables a las 12 h de cultivo. También se muestra la concentración de las esporas viables y normalizadas con respecto a la concentración inicial de esporas viables de la bacteria obtenidas al final de la fermentación, en los diferentes medios de cultivo formulados. Se muestra también el valor de la desviación estándar de los datos empleados. Los medios de cultivo se analizaron en cuanto a la máxima concentración alcanzada de células vegetativas y esporas viables de *B. subtilis* 83, comparadas con el medio mineral no suplementado utilizado convencionalmente para el crecimiento y esporulación de la bacteria.

Aunque los valores de células vegetativas viables se encuentran en aproximadamente el mismo orden de magnitud, claramente el medio de cultivo mineral no suplementado supera a los otros medios de cultivo. Además, al normalizar la concentración de células vegetativas con respecto a la concentración inicial, en el medio de cultivo mineral no suplementado se obtiene una mayor concentración de células vegetativas viables, seguido muy de cerca del medio suplementado con la combinación de todos los suplementos.

Cuadro 7.1 Concentraciones de las células vegetativas de *B. subtilis* 83 a las 12 h de cultivo y de las esporas viables de la bacteria al final del cultivo (24 h), en los diferentes medios de cultivo formulados. También se muestra la

concentración de células vegetativas viables y esporas viables a las 12 y 24 h de cultivo, respectivamente, normalizadas con respecto a la concentración inicial de células.

Medio	Cél. vegetativas viables (UFC x 10 ⁸ /ml)	X/X ₀ (cél. vegetativas viables)	Esporas viables/ml (Esp x 10 ⁸ /ml)	X/X ₀ x 10 ⁸ (esporas viables)	Esporas viables/cél veg. viables
Mineral	26 (± 1.4)	44.6 (± 7.3)	2.4 (± 1.2)	2.4 (± 1.2)	0.1 (±0.02)
Extracto de levadura	1 (± 0.16)	13.1 (± 3.57)	0.5 (± 0.28)	0.5 (± 0.28)	0.3 (±0.09)
Caldo nutritivo	7 (± 4.2)	36.7 (± 5.4)	2.1 (± 0.26)	2.1 (± 0.26)	0.4 (±0.1)
Peptona	5 (± 2)	25.9 (± 6.8)	0.78(± 0.35)	0.78 (± 0.35)	0.1 (0.04)
Mezcla	9 (± 0.4)	43 (± 8.4)	0.05 (± 0.007)	0.05 (± 0.007)	0.003 (± 2 x 10 ⁶)

La **figura 7.6** muestra las máximas concentraciones de células vegetativas que se obtuvieron para cada medio de cultivo. Podemos notar que la máxima concentración obtenida fue en el medio suplementado con extracto de levadura, ya que se obtuvo una concentración de 1.6×10^9 UFC/ml a las 16 horas de cultivo. Sin embargo, comparado con el medio mineral no suplementado, este alcanzó una concentración cercana (1.24×10^9 UFC/ml) 4 horas antes. Aunque se esperaba que los nutrientes suplementados al medio mineral incrementaran la concentración de células viables, esto no ocurrió. Existen evidencias que explican el motivo por el cual, al cultivar a *B. subtilis* en medios de cultivo complejos que contienen, adicionalmente, glucosa (como es el caso de los medios suplementados utilizados en este trabajo), no resultan concentraciones favorables de células vegetativas viables. Hanson y Cox (1967) mencionan que cuando *B. subtilis* es cultivado en medios complejos que contienen glucosa, existe una reducción en los niveles de las enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, dando lugar a una ineficiente producción de energía (en forma de ATP) y de intermediarios que son necesarios para la síntesis de sustancias que son requeridas para el crecimiento de la bacteria. Estos investigadores indican que algunas de las enzimas que son reprimidas bajo estas condiciones y que participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos son la aconitasa, la cual da lugar a la síntesis del *cis*-aconitato y el isocitrato, y el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, el cual da lugar a la síntesis del succinil-CoA. La formación de estos intermediarios es de suma importancia, ya que a partir del succinil-CoA se forman las porfirinas y a partir del α -cetoglutarato se forman varios aminoácidos. Otra manera de explicar el hecho de que no se hayan obtenido altas concentraciones celulares es mediante lo reportado por Yüksekdag *et al.* (2003), quienes mencionan que cuando *B. subtilis* es cultivada en medios ricos con glucosa como fuente de carbono se producen altas concentraciones de poli- β -hidroxibutirato (PHB). Esto ocurre en la fase estacionaria, cuando las células

comienzan a ser limitadas por un nutriente esencial (especialmente la fuente de nitrógeno) y existe glucosa en el medio, la cual se metaboliza ineficientemente. Otra factible explicación de que no se hayan obtenido los resultados esperados con estos medios complejos es que existen reportes en los que se mencionan que *B. subtilis* utiliza los componentes de los medios de cultivo complejos que tienen alto contenido en aminoácidos (como podría ser el caso de los medios de cultivo complejos utilizados en este estudio) como fuente de nitrógeno (Luna *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2005) por lo que en estos experimentos *B. subtilis* 83 sigue utilizando a la glucosa (al igual que en el medio mineral) como su única fuente de carbono, de tal manera que las células viables no aumenten.

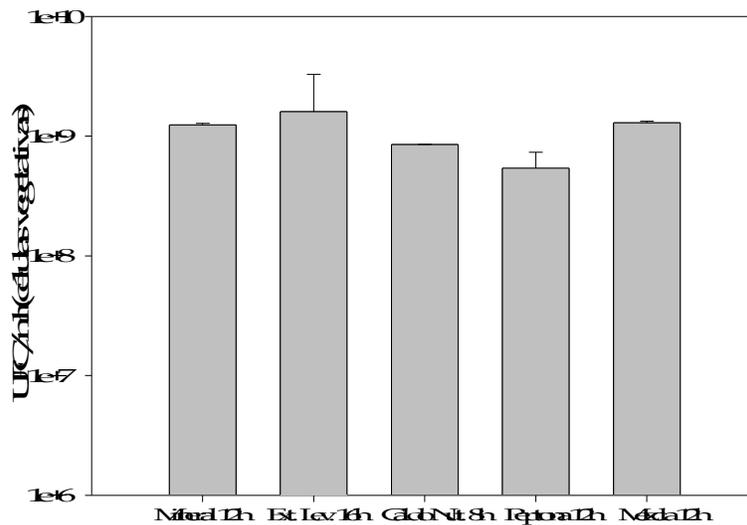


Fig. 7.6 Concentración de células vegetativas de *B. subtilis* 83 en los diferentes medios de cultivo evaluados.

Con respecto a las esporas viables, en el **cuadro 7.1** se observa que el medio mineral no suplementado obtuvo la mayor concentración de esporas viables (normalizadas con respecto a la concentración inicial de esporas viables), seguido del medio suplementado con caldo nutritivo. Esto podría estar relacionado con lo mencionado por Foster *et al.* (1950), quienes reportan que los medios de cultivo complejos (como los que contienen extracto de levadura, caldo nutritivo y peptona) son ineficientes para el crecimiento de *B. subtilis* debido a que se producen sustancias inhibitorias. Además, la esporulación también se ve afectada por dichas sustancias y por factores que denominaron “factores antiesporulación”. Por otra parte, Martínez (1997) menciona que cuando *B. subtilis* es cultivado en medios con caldo nutritivo, el factor σ^H se encuentra en una concentración muy baja durante el crecimiento exponencial y se incrementa de manera sustancial durante la primera hora después de que se detiene el crecimiento. Por el contrario, en medio mínimo con glucosa σ^H se encuentra en un nivel elevado, tanto durante el crecimiento exponencial, como durante la fase estacionaria. Este factor sigma es muy importante durante el crecimiento vegetativo y, especialmente,

en la etapa de esporulación. El factor σ^H es el producto del gene *spoOH* que es necesario para la transcripción de muchos genes que son expresados durante el estadio de transición a la esporulación. Además este factor contribuye a la expresión del gene que codifica para σ^A , principal factor sigma de la fase de crecimiento vegetativo.

Por otra parte, la eficiencia de conversión de células vegetativas viables a esporas viables (eficiencia de esporulación) en el medio de cultivo mineral no suplementado fue sensiblemente menor, comparado con los medios suplementados con extracto de levadura y caldo nutritivo. Esto concuerda con Schaeffer (1969) quien reporta que los medios que contienen caldo nutritivo aumentan la eficiencia de esporulación en bacterias del género *Bacillus*.

En base a estos resultados, se seleccionó el medio de cultivo mineral no suplementado para ser utilizado en el subsiguiente cultivo alimentado, ya que se obtienen concentraciones similares de células vegetativas viables, comparado con los medios complejos, y en algunos casos en menor tiempo (medio suplementado con extracto de levadura), además de que resulta económicamente más conveniente.

7.4 Cultivos alimentados

Los cultivos alimentados se realizaron en biorreactores de 5 y 10 L. Estos consistieron de tres etapas. La primera, una etapa de cultivo lote de 10 h, en la cual, las células empezaron a crecer en su fase exponencial con una concentración inicial de glucosa de 10 g/l. Después de 10 h, o de que la glucosa remanente llegara a una concentración aproximada de 3 g/l, se inició la etapa de alimentación de acuerdo al perfil establecido. Para prevenir la limitación por otro nutriente diferente a la glucosa, todas las sales del medio de cultivo se adicionaron junto con la glucosa en la solución alimentada. La tercera etapa fue de nuevo una etapa lote. Esta etapa se presentó después de que culminó la etapa de alimentación y hasta que la glucosa fuera consumida totalmente por la bacteria, para que posteriormente *B. subtilis* 83 iniciara su proceso de esporulación.

Primeramente se realizó un cultivo alimentado mediante pulsos de glucosa, en donde el objetivo era alimentar el cultivo de manera gradual, manteniendo el cultivo provisto de glucosa y evitando llegar a concentraciones cercanas a 0 g/l de glucosa, con el fin de evitar que la bacteria iniciara el proceso de esporulación. Este cultivo se llevó a cabo en fermentadores de 10 L y la alimentación se realizó manualmente cada vez que el nivel de glucosa llegaba entre 3 y 0 g/l, medida

ex situ (a este cultivo llamaremos cultivo alimentado A). Con los resultados de este cultivo y la experiencia de Monteiro *et al.* (2005), la cual se publicó cuando este proyecto ya estaba en curso, se decidió realizar un cultivo alimentado que fuera aumentando la concentración de glucosa de manera exponencial. A este cultivo se le denominó cultivo alimentado B. La característica sobresaliente de este cultivo fue que la concentración de las sales en la alimentación era dos veces superior (2x) en relación a la utilizada en el cultivo lote convencional. Además, el pH fue controlado a un valor cercano a 7. Este cultivo se realizó en biorreactores de 5 L, ya que en este equipo es posible controlar la alimentación mediante un programa de computadora que está acoplado al sistema de biorreactores. Analizando los resultados del cultivo alimentado B, se resolvió experimentar con un cultivo alimentado con el mismo perfil que en el B, pero en este caso, la concentración de sales en la alimentación fue la misma empleada normalmente para un cultivo en lote (1x) y no hubo control de pH. A este cultivo le nombraremos cultivo alimentado C y se llevó a cabo en el biorreactor de 5 L.

7.4.1 Cultivo alimentado A

Para este cultivo se utilizó un biorreactor de 10 L de volumen operacional (New Brunswick Scientific, modelos Labroferm y Microferm). El criterio con el que se llevó a cabo este cultivo fue mantener un nivel de glucosa en el medio tal, que evitara la esporulación, de acuerdo a lo que mencionan Monteiro *et al.* (2005), quienes reportaron que si la concentración de glucosa en el medio de fermentación se encuentra por debajo de 3 g/l, es posible que se inicie la esporulación.

Se realizaron pulsos de alimentación de aproximadamente 200 ml de una solución de glucosa (conteniendo 300 g/l) y sales minerales (en una concentración dos veces mayor a la empleada en un cultivo lote convencional, 2x) a una velocidad de alimentación de 56.8 ml/min, por medio de una bomba peristáltica. Esta solución se adicionaba cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo llegaba a niveles de entre 1 y 3 g/l. La concentración de glucosa fue medida fuera del reactor en un analizador enzimático (YSI, modelo 2700-S) a cada hora durante la alimentación. Con esto se evitó el agotamiento de este nutriente, lo que conduciría al inicio del proceso de esporulación de la bacteria. Esto se llevó a cabo con el fin de que la bacteria utilizara eficientemente la fuente de carbono alimentada y aumentara la concentración de células vegetativas obtenidas en el cultivo lote. El experimento se realizó por triplicado y se graficó el promedio de las tres réplicas mostrando las barras de desviación que indican los valores máximos y mínimos obtenidos entre réplicas. En algunos casos, las desviaciones son de la misma magnitud del símbolo empleado. Las líneas punteadas verticales indican el tiempo de inicio y final de la etapa de alimentación.

En la **figura 7.7** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83, así como el perfil de alimentación y las concentraciones de glucosa y de amonio en el medio. Se presenta también la evolución del pH y de la TOD durante el cultivo. En la **figura 7.7d** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de la bacteria en diferentes escalas para observar con más detalle los cambios en la concentración celular. Tal como se esperaba, durante la primera fase en lote, el cultivo se comportó de manera similar al cultivo en lote mostrado en la **figura 7.2**. Dentro de las primeras cuatro horas de la fase de alimentación (**figura 7.7b**), la concentración de células vegetativas viables aumentó de 3.8×10^7 UFC/ml a 1.7×10^9 UFC/ml (**figura 7.7d**). Durante las siguientes 29 horas de la alimentación la concentración de células vegetativas viables ya no aumenta significativamente (**figuras 7.7a y 7.7d**). La velocidad específica de crecimiento en la etapa de alimentación fue de 0.06 h^{-1} y la velocidad específica de consumo de glucosa fue de $0.22 \text{ g glucosa/g biomasa} \cdot \text{h}$. Estos parámetros fueron calculados mediante las **ecuaciones 2 y 3**, respectivamente. Por otra parte, a consecuencia del incremento de la población bacteriana viable, el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio permaneció en niveles cercanos a 0 % durante la fase de alimentación (**figura 7.7c**). A partir de que la alimentación cesó, esto es a las 34 h de cultivo (se adicionó 1 l de solución), y, aunque la concentración de glucosa estaba en el máximo nivel (**figura 7.7b**), la TOD en el medio comenzó a aumentar. La evidencia de que las células vegetativas ya no aumentan al final de la alimentación, nos da la pauta para discernir que, probablemente, a ese nivel de glucosa ($\sim 20 \text{ g/l}$) exista una represión parcial en la síntesis de las enzimas de ciclo de los ácidos tricarboxílicos, debido a que la glucosa es un sustrato que se metaboliza fácilmente, de acuerdo a lo mencionado por Hanson y Cox (1967). Además, estos investigadores reportan que bajo condiciones de altas concentraciones de sustrato una producción significativa de acetato, lactato, formato y acetoína reduce sustancialmente la eficiencia de la utilización de carbono para la biosíntesis celular.

Con respecto a la viabilidad de las esporas, en esta forma de cultivo se aumentó a 69.2 % con respecto a la obtenida en el cultivo lote (28.4 %). Se especula que bajo las condiciones evaluadas (esto es en un medio de cultivo únicamente con glucosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente), las células de *B. subtilis* 83 detectan un ambiente nutricional desfavorable para su crecimiento. En consecuencia, es posible que se expresen genes que no son esenciales durante el crecimiento exponencial, tales como el gene *spoOH* (involucrado en el proceso de esporulación) en un intento por obtener fuentes alternas de nutrientes, tal como lo reporta Martínez (1997) y por lo tanto, favorecer la esporulación. 7 horas después de que la glucosa fue consumida totalmente se

observó un incremento significativo en la concentración de esporas viables de *B. subtilis* 83 (figuras 7.7a y 7.7d), llegando a una concentración de esporas viables de 4.8×10^9 esp/ml, un orden de magnitud por encima del obtenido en cultivo en lote (figura 7.2a).

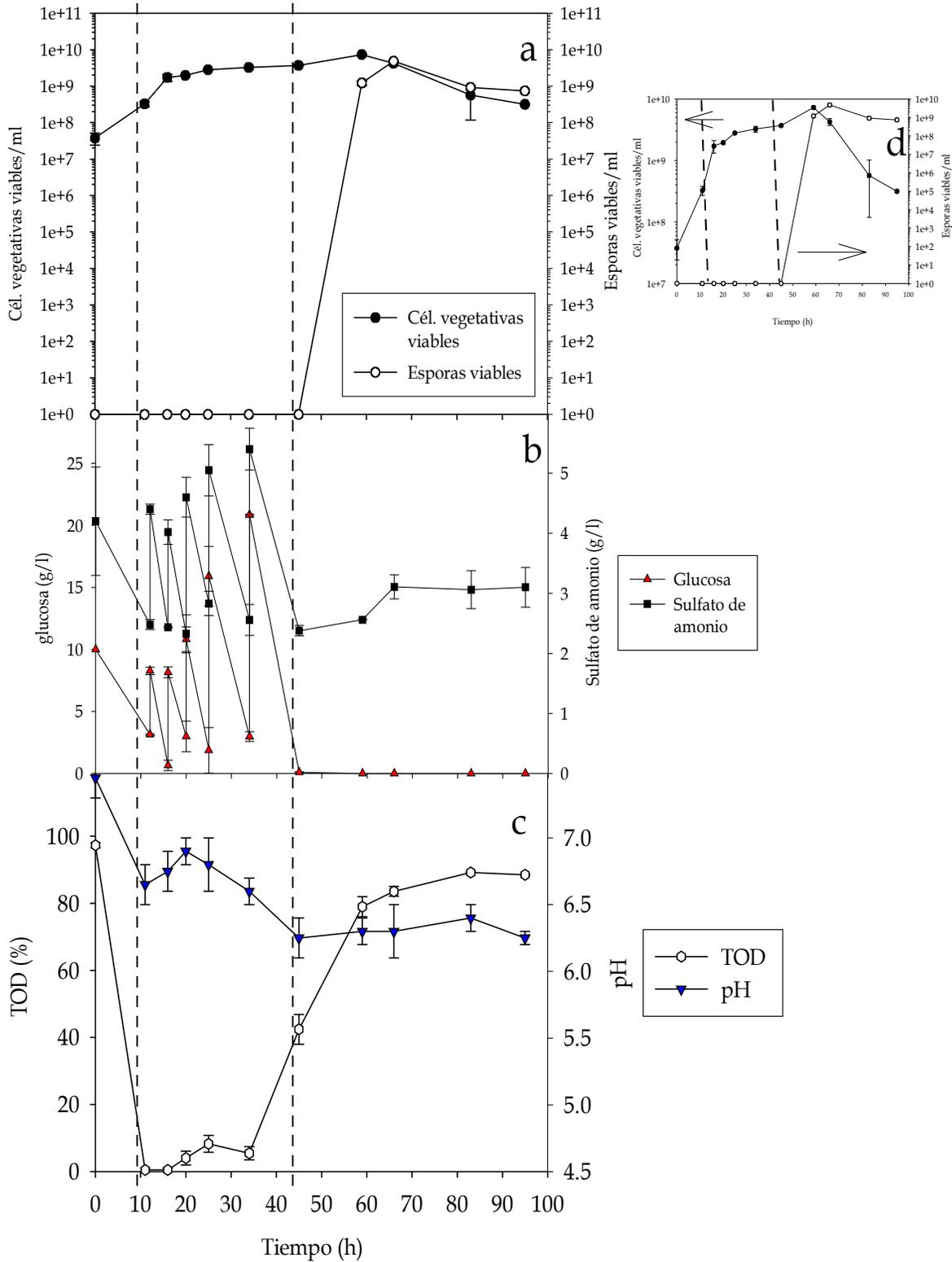


Fig. 7.7 Cinética de crecimiento, esporulación, consumo de sustratos y evolución de pH de *B. subtilis* 83 en cultivo alimentado A. Las líneas punteadas verticales indican el inicio y final de la alimentación.

Después de alcanzar el valor máximo de concentración de esporas viables, lo cual se dio a las 66 h de cultivo, ésta disminuye, por lo que sería conveniente que la fermentación se finalizara en ese tiempo, de lo contrario, se perdería la ganancia de esporas viables obtenidas mediante este modo de cultivo, ya que al final de la fermentación (95 h) se obtiene la misma concentración que se logró en el cultivo lote ($\sim 1 \times 10^8$ esporas viables/ml). La cantidad total de glucosa alimentada al medio de fermentación fue de 400 g. Con esto se determinó el rendimiento de esporas viables por gramo de glucosa ($Y_{\text{esp/glucosa}}$), resultando en 0.132×10^{12} esporas viables/gramo de glucosa. Al final de la fermentación se obtuvieron 9.66 g de biomasa en base seca, con lo cual se obtuvo el rendimiento de biomasa por unidad de glucosa ($Y_{\text{x/glucosa}}$), el cual fue de 0.27 g de biomasa/gramo de glucosa (los datos de los rendimientos obtenidos durante el cultivo alimentado A se comparan en la sección 7.4.5 con los otros tipos de cultivo).

En la **figura 7.7c** se muestra la evolución del pH durante el cultivo alimentado A. De igual manera que en el cultivo lote, el pH no fue controlado, iniciando con un pH de aproximadamente 7, el cual, durante la fermentación desciende hasta valores cercanos a 6.25. Esto probablemente se deba, como ya se había mencionado anteriormente, a la producción de ácidos orgánicos. De la **figura 7.7b** se puede observar que *B. subtilis* 83 no estuvo limitada por la fuente de nitrógeno a lo largo del cultivo, ya que, si bien al inicio de él, la concentración de sulfato de amonio era de aproximadamente 4 g/l, ésta concentración no desciende a valores por debajo de 2.27 g/l.

Con la experiencia de este esquema de cultivo, se decidió realizar un cultivo alimentado que fuera adicionando la glucosa de manera continua, para evitar llegar a concentraciones cercanas a 0 g/l de glucosa en el medio y de esta manera, evitar que el crecimiento de las células vegetativas se viera limitado por este tipo de estrés nutricional. Se decidió llevar a cabo el perfil de alimentación usado por Monteiro *et al.* (2005) con el objetivo de alcanzar una mayor concentración de células vegetativas, tratando de mantener la viabilidad de las esporas lograda en el cultivo alimentado A.

7.4.2 Cultivo Alimentado B

Para llevar a cabo el cultivo alimentado B se utilizó un biorreactor de 5 L de volumen operacional (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo® 110/software: Biocomand®) ya que en este equipo se puede controlar automáticamente la alimentación de glucosa mediante un programa de computación acoplado al sistema.

7.4.2.1 Traslado del proceso de producción de esporas viables al biorreactor de 4 l

Para trasladar el proceso de producción de biorreactor de 10 L al de 4 L se utilizó como criterio de escalamiento descendiente a la potencia volumétrica constante (P/V), ya que se contaba con la información de un trabajo realizado por Rodríguez (2005), en donde se determinó la potencia volumétrica en matraz (calculada en base a la relación publicada por Büchs *et al.*, 2000) y en biorreactor de 10 L. Para llevar a cabo el proceso de producción en el fermentador de 4 L, se determinó una agitación de 759.5 r.p.m. en el fermentador de 4 L, para trabajar a una potencia volumétrica (P/V) de 0.47 W/l (ver detalles de cálculo en el sección 6.1.5.2.2).

En la **figura 7.8** se comparan la cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83. Se presentan también los perfiles de consumo de sustratos a lo largo de los cultivos en los biorreactores de 4 y 10 L. Estos experimentos se realizaron por triplicado graficándose el promedio de las tres réplicas de cada biorreactor. Además, se muestran las barras de desviación que indican los valores máximos y mínimos obtenidos entre réplicas. En la **figura 7.8b** se observa que la concentración de esporas viables obtenida a las 24 h de cultivo fue mayor en el biorreactor de 4 L (7.2×10^8 esp/ml) comparado con el biorreactor de 10 L (1×10^8 esp/ml). Sin embargo, la concentración de células vegetativas viables fue mayor en el biorreactor de 10 L, comparada con el de 4 L (**figura 7.8b**), siendo ésto evidente a las 12 h de cultivo, cuando la diferencia en la concentración de células vegetativas entre los dos biorreactores fue mayor en casi un orden de magnitud.

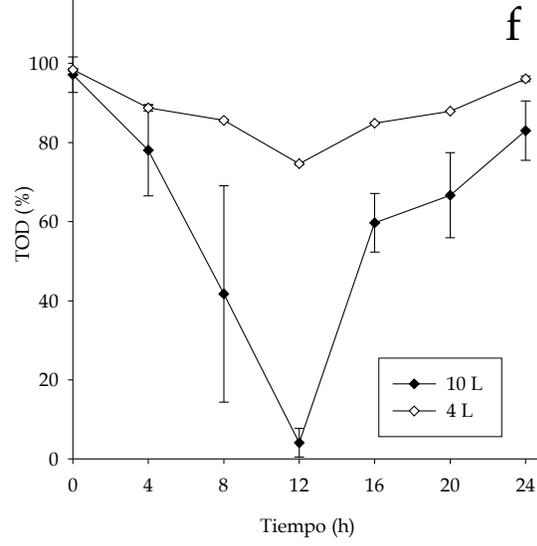
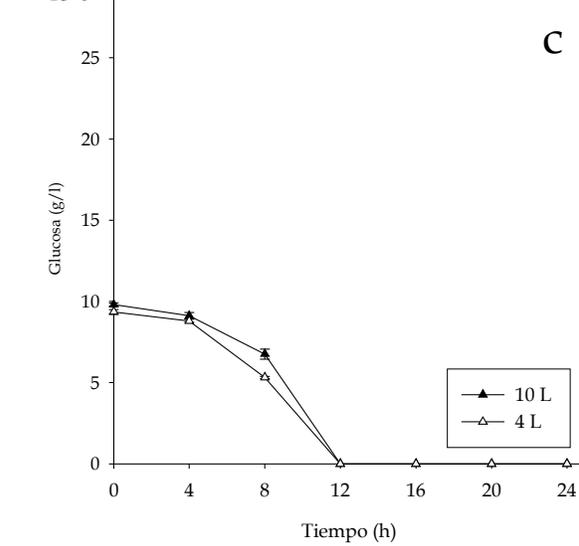
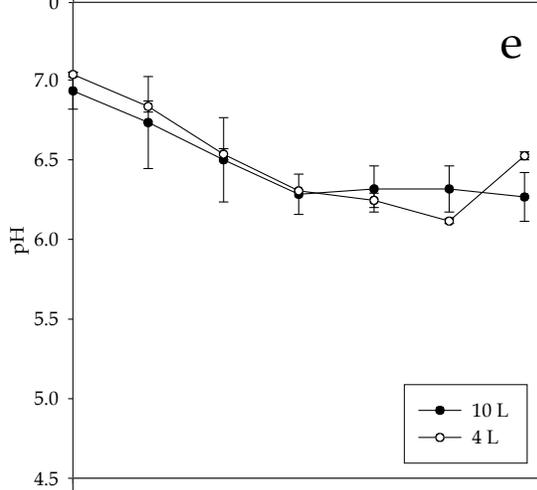
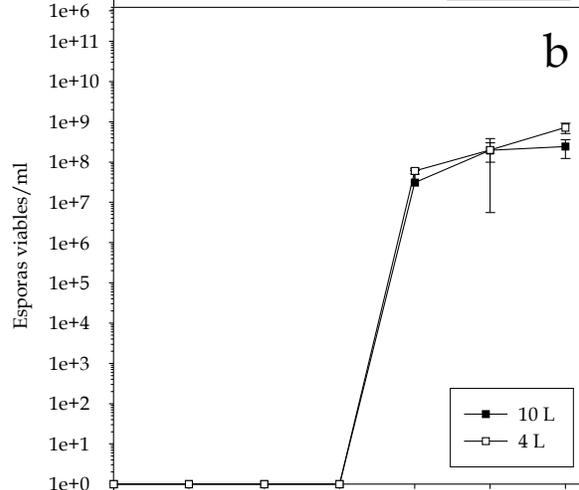
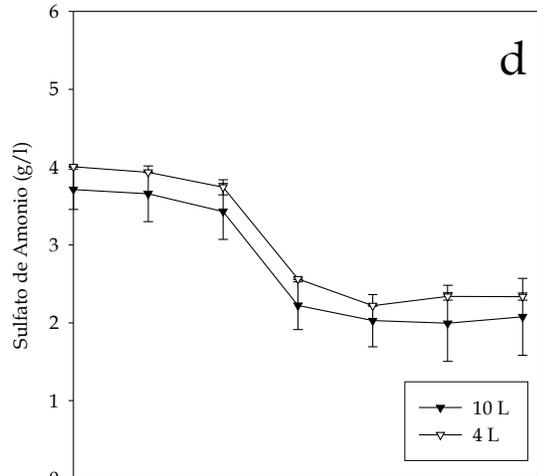
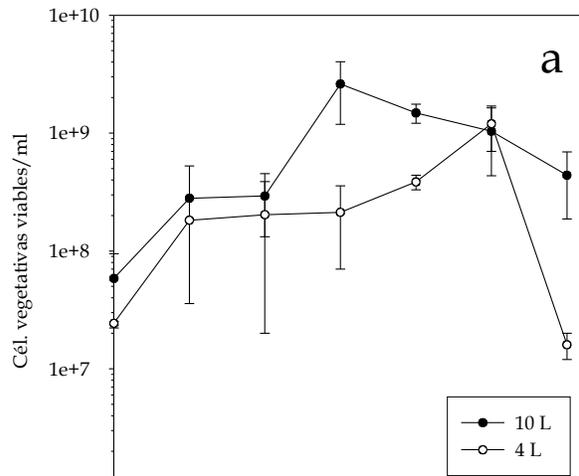


Fig. 7.8 Cinética de crecimiento, esporulación, concentración de sustratos y evolución del pH de *B. subtilis* 83 en cultivo en lote en biorreactor de 4 y 10 L.

Los resultados muestran que al cultivar *B. subtilis* 83 en el biorreactor de 4 L se mejoró la viabilidad de las esporas en un 7.9 %, ya que ésta en el biorreactor de 10 L fue de 28.4 %, mientras que en el biorreactor de 4 L fue de 36.3 %.

En la **figura 7.8c** se observa que la glucosa en el biorreactor de 4 L se agotó a las 12 h de cultivo, de igual manera que en el biorreactor de 10 L. Esto concuerda, en ambos casos, con el incremento en la concentración de esporas 4 horas después de que la fuente de carbono se agota, ya que a las 16 h de cultivo se observa un incremento significativo en la concentración de esporas viables. Esto concuerda con lo dicho por Walker (2000), quien menciona que las bacterias del género *Bacillus* inician el proceso de esporulación en aproximadamente 6 horas después de que es agotado el nutriente limitante. Por otro lado, en ambos biorreactores, la fuente de nitrógeno no fue causa de limitación para el crecimiento de la bacteria, ya que este no se agotó a lo largo de todo el cultivo (**figura 7.8d**). El perfil de oxígeno disuelto durante la fermentación (**figura 7.8f**) indica que éste tampoco fue un factor limitante para el crecimiento de *B. subtilis* 83 en ambos biorreactores. La discusión de este parámetro en el biorreactor de 10 L se detalla en la sección 7.1. Por otro lado, en el biorreactor de 4 L es evidente, ya que el porcentaje de oxígeno disuelto nunca descendió a valores por debajo del 70 %. Los valores máximos de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en los biorreactores de 10 y 4 L fueron de 22.1 y 5.8 mmol O₂/Lh, respectivamente, y aunque se reporta que el valor máximo de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) para una cepa de *B. subtilis* es de 72 mmol O₂/Lh (Martínez, 1997), los perfiles de la VTO en los biorreactores de 10 y 4 L utilizados para este trabajo muestran perfiles típicos de limitación por un nutriente (generalmente glucosa) diferente al oxígeno de acuerdo a lo reportado por Maier y Büchs (2001) (ver **anexo E**).

El **cuadro 7.2** muestra el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}), determinado en ambos biorreactores. Este coeficiente fue obtenido mediante la técnica indirecta de eliminación de gas descrita en la sección 6.2.7. El k_{La} en el biorreactor de 4 L fue mayor que en el de 10 L, con lo que podemos establecer que seguramente hay una mejor transferencia de oxígeno en el fermentador de menor escala debido posiblemente a la alta velocidad de agitación, por lo que la tensión de oxígeno disuelto en el fermentador de 4 L se mantiene en altos porcentajes durante el cultivo.

Por otra parte, el perfil de la evolución del pH en ambos biorreactores fue similar (**figura 7.8e**). Esto da a entender que el descenso de los valores del pH en ambos biorreactores se debió probablemente también a lo mencionado por Nakata y Halvorson (1960), Asante y Neal (1993) y Shuler y Kargi (1992), de lo cual se habló más detalladamente en la sección 7.1.

Cuadro 7.2 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en los biorreactores de 4 y 10 l.

Biorreactor	$k_L a$ (h^{-1})
4 L	158.4
10 L	92.5

Comparando estos resultados con los obtenidos en el biorreactor de 10 L, se puede notar que la variación de los resultados en cuanto a la concentración de esporas viables se encuentra en el mismo orden de magnitud. Sin embargo, es importante destacar que, en el biorreactor de 4 L, la concentración de esporas viables fue ligeramente mayor. Por último, estos resultados fueron muy reproducibles, indicando la adaptación de la bacteria a las condiciones de cultivo de este fermentador. En nuestro laboratorio, el criterio de escalamiento de la potencia volumétrica constante (P/V) ha brindado resultados interesantes para una cepa de *Bacillus subtilis* (CPA) (Rodríguez, 2005; Morales, 2005).

7.4.2.2 Cinéticas de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83 en el cultivo B

Este cultivo tuvo un perfil exponencial. La alimentación se inició cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo llegó a 3 g/l aproximadamente y ésta se fue acumulando en el medio de cultivo hasta llegar a una concentración de 27.2 g/l. Este cultivo se llevó a cabo en un biorreactor de 5 L de volumen operacional (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo® 110/software: Biocomand®), con un volumen inicial de cultivo de 3.5 L para la primera fase de cultivo en lote. Es importante señalar que este perfil de alimentación no fue prediseñado, ya que como prueba se utilizó una rutina de control que maneja la velocidad de alimentación en un perfil exponencial, diseñado para otra bacteria (Caspeta, 2007). En esta rutina de alimentación se sustituyeron los parámetros cinéticos de *B. subtilis* 83 obtenidos del cultivo lote. Como resultado, la glucosa se acumuló en el medio causando resultados muy interesantes, por lo que se pretendió realizar la réplica de este experimento, no contando con que la concentración de sales en la alimentación, accidentalmente, se adicionaron en una concentración similar a la de un cultivo lote convencional. Sin embargo, estas nuevas condiciones dieron lugar al cultivo alimentado C (que resultó aún más interesante) del que se

habla mas adelante. Por esta razón este cultivo no fue reproducido y los datos graficados son el resultado de ese único experimento.

Con el objetivo de que la esporulación de la bacteria fuera dependiente exclusivamente de glucosa, se adicionó 1 L de solución alimentadora con 300 g/l de glucosa y el doble de concentración de sales minerales que en el cultivo en lote convencional. De esta manera, el componente limitante de la solución sería solamente glucosa. Para evitar la acidificación del medio de cultivo ($\text{pH} > 5,5$), debido a la adición de altas concentraciones de sulfato de amonio (2x con respecto al cultivo lote), el pH durante la alimentación fue automáticamente controlado (5.5 - 6) mediante la adición de NaOH 2N. La adición de las sales al doble de concentración con respecto al cultivo en lote y el control de pH se realizaron tomando en cuenta las evidencias que mostraron Monteiro *et al.*, (2005), quienes mencionaron que al duplicar la concentración de los componentes del medio de cultivo, la eficiencia de esporulación aumenta significativamente. Además, indican que manteniendo el pH entre valores de 6 y 9, la eficiencia de esporulación no se modifica, mientras que si desciende a valores menores a 5, esta eficiencia se reduce hasta el 6 % con respecto al 20 % obtenido bajo condiciones de pH entre 6 y 9. Por esta razón, en este cultivo, se trató de mantener los niveles de pH por encima de 5.5 durante la alimentación.

En la **figura 7.9** se presenta la cinética de crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* 83, el perfil de alimentación y las concentraciones de glucosa y de amonio, además de la evolución del pH y de la TOD durante el cultivo. En la **figura 7.9d** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de la bacteria en diferentes escalas para observar con más detalle los cambios en la concentración celular. De igual manera que en el cultivo alimentado A, en la primera fase en lote, como era de esperarse, el cultivo se comportó de manera similar al cultivo en lote convencional.

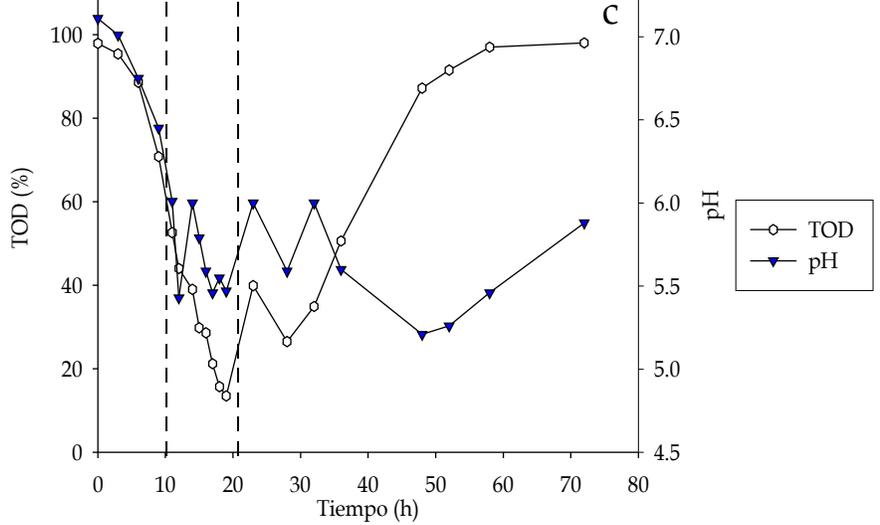
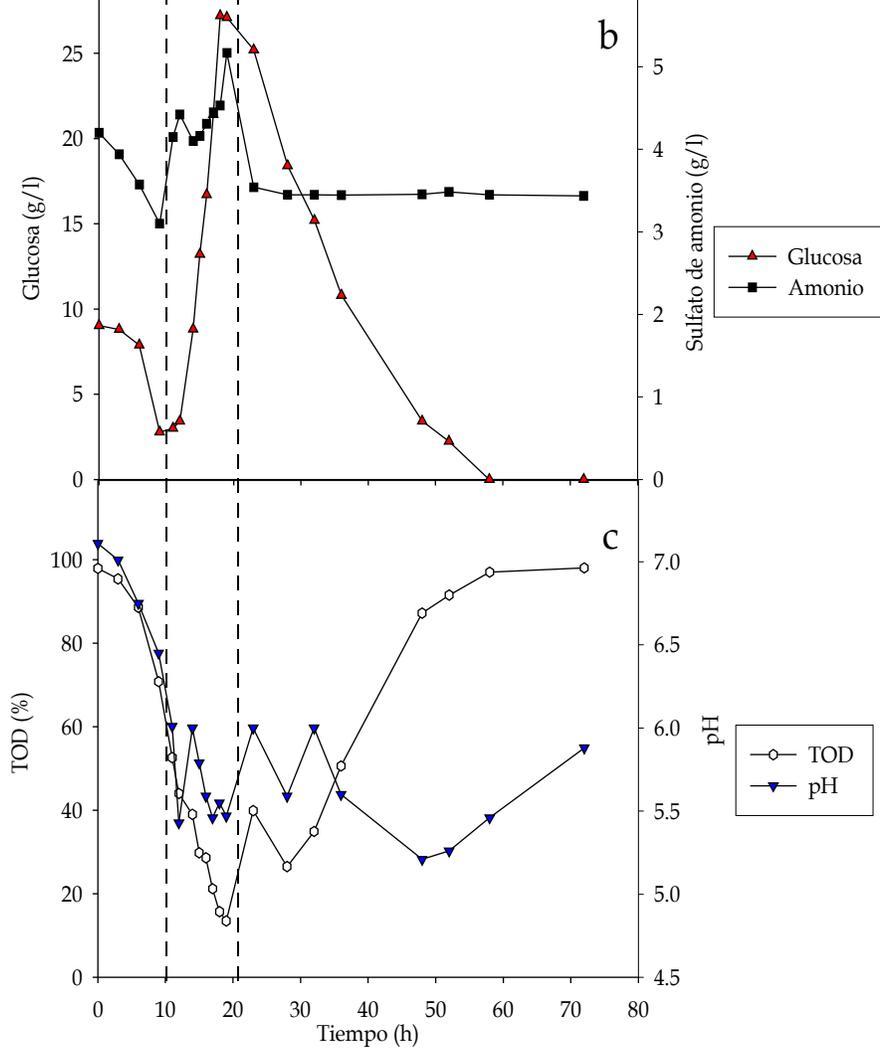
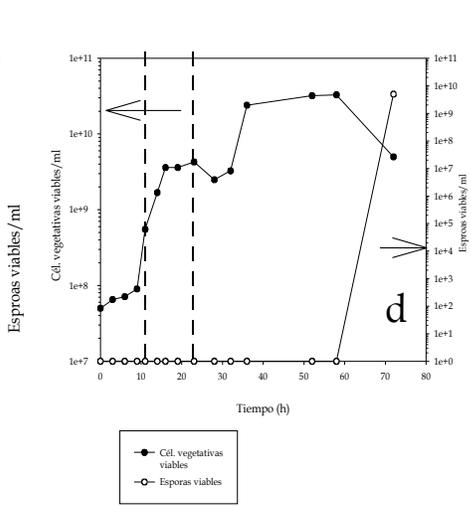
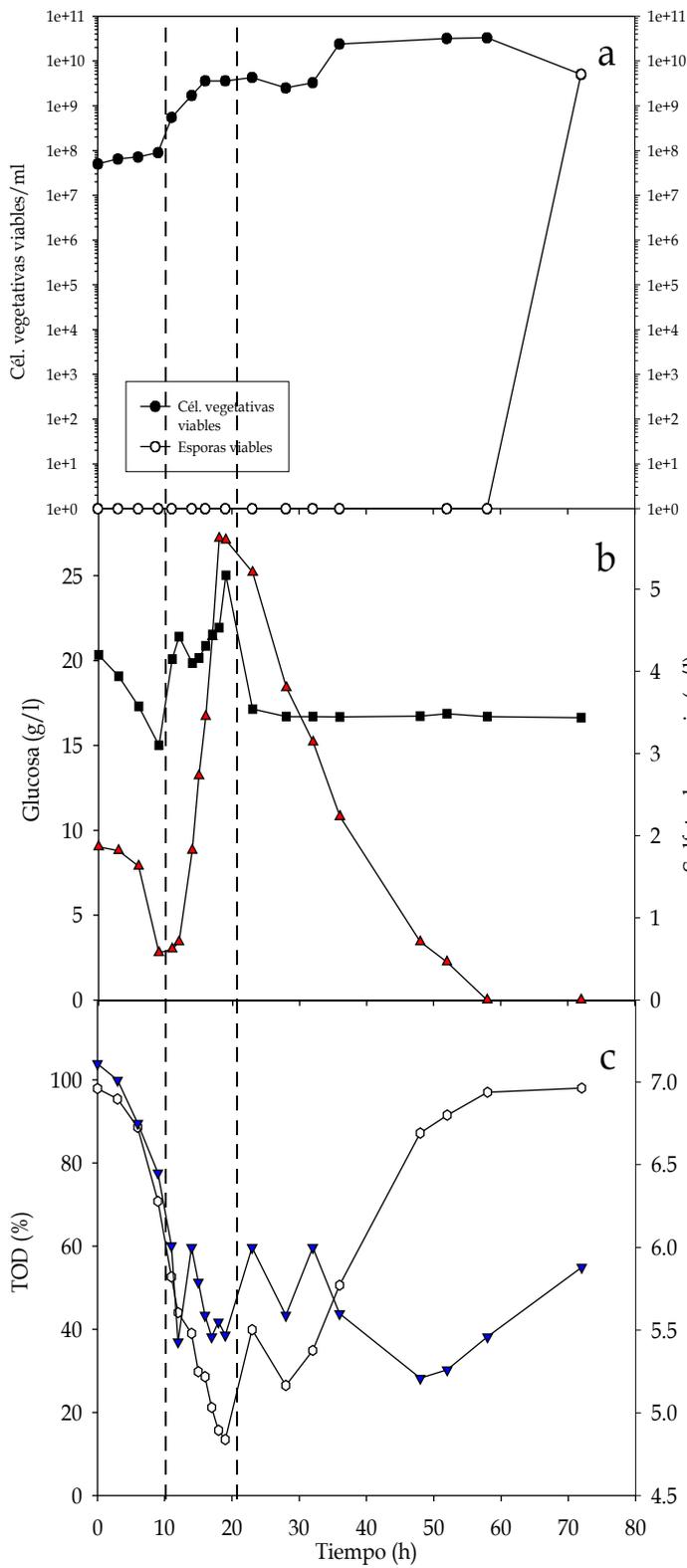


Fig. 7.9 Cinética de crecimiento, esporulación, concentración de sustratos y evolución de pH de *B. subtilis* 83 en el cultivo alimentado B. Las líneas punteadas verticales indican el inicio y final de la alimentación.

Durante la alimentación de la glucosa la concentración de las células vegetativas viables aumentaron considerablemente, de 9×10^7 a 5×10^9 UFC/ml aproximadamente (**figura 7.9a**). La acumulación de glucosa y de sulfato de amonio se llevó a cabo en un tiempo aproximado de 10 horas (**figura 7.9b**), llegando a valores de 27.2 y 5 g/l, respectivamente.

Es interesante notar que cuando se llega a las máximas concentraciones de glucosa y sulfato de amonio, cesa el crecimiento celular durante las siguientes 10 horas de cultivo. Posteriormente, la glucosa se siguió consumiendo hasta que se agotó completamente. La velocidad específica de consumo de glucosa fue mayor (1.72 g de glucosa/g de biomasa*h) comparada con el cultivo alimentado A. Por otra parte, el sulfato de amonio fue consumido durante las siguientes 4 h de cultivo (hasta llegar a una concentración de 3.5 g/l) y a continuación, cesó este consumo. Estos resultados permiten discernir que es posible que para ese tiempo de cultivo exista inhibición del crecimiento por acumulación de sulfato de amonio o sales minerales, ya que la concentración de células vegetativas se mantuvo constante y, aunque la glucosa se consumió, la fuente de nitrógeno no lo hace. Esto podría estar relacionado con lo mencionado por Martínez (1997), en el sentido de que debido a la presencia de cationes monovalentes (que están presentes en las sales del medio de cultivo mineral) cuando hay agotamiento de la fuente de carbono, las células de *Bacillus subtilis* tienden a lisarse. El hecho de que no aumentó la concentración celular viable puede estar asociado, también, con una posible inhibición por sustrato, ya que cuando se alcanzó la máxima concentración de glucosa (27.2 g/l), la concentración celular viable se mantuvo constante y aunque se siguió consumiendo la fuente de carbono, no se observó un aumento en la concentración celular viable, hasta que la concentración de glucosa descendió a valores cercanos a 12 g/l, llegando a una concentración de 3.3×10^{10} células vegetativas/ml a las 58 h de cultivo. La velocidad específica de crecimiento durante la etapa de alimentación fue considerablemente mayor (0.5 h^{-1}) comparado con el cultivo alimentado A (0.06 h^{-1}). Este incremento en la velocidad específica de crecimiento indica que, si bien las células siguen creciendo, es posible que también estén produciendo sustancias como ácidos orgánicos, como resultado del catabolismo celular. En consecuencia, estas sustancias pudieran ser tóxicas para la formación de células viables, tal como lo indican Snay *et al.* (1989) quienes reportaron que si *B. subtilis* es desarrollado a velocidades de crecimiento por encima de 0.36 h^{-1} , la concentración celular viable se mantienen constante debido a que se alcanzan niveles tóxicos de formato (producido por la bacteria).

Las **figuras 7.9a** y **7.9d** muestran la producción de esporas viables de *B. subtilis* 83. Se puede notar que desde el inicio del cultivo ya existía una alta concentración de esporas (1×10^9 esporas/ml), lo cual no afectó el cultivo puesto que esa concentración de esporas no era viable. Esto se debió a que el preinóculo en caja con medio YPG se dejaba crecer hasta que la bacteria esporulaba, de manera que al inocular el reactor, el inóculo llevaba esporas, las cuales no eran viables. Se observó, 14 horas después de que se agotara la glucosa, un incremento sustancial en la concentración de esporas viables de *Bacillus subtilis* 83. Al final del cultivo se obtuvo una concentración de esporas viables de 5×10^9 esp/ml. Este comportamiento es diferente a lo que se observó en el cultivo en lote y en el cultivo alimentado A, ya que en estos cultivos, la concentración de esporas viables se incrementó en aproximadamente 7 h a partir del agotamiento de la glucosa. Una de las partes más interesantes de este experimento fue la viabilidad obtenida: 83.9 %, la cual representa un 14.7 % mayor que la obtenida en el cultivo alimentado A. Aunque se debe recordar que este experimento no tuvo réplicas, por lo que es conveniente tomar estos resultados con el debido cuidado. La explicación que pudiera resultar es que al estar el cultivo alimentado B bajo condiciones de altas concentraciones de sales, iones como Ca^{++} y Mn^{++} pudieran estar favoreciendo la esporulación de la bacteria, ya que de acuerdo a lo mencionado por Donnellan *et al.* (1964), estos iones son requeridos para una efectiva esporulación en *B. subtilis*. Además, posiblemente, la alta viabilidad también está asociada a un exceso en la fuente de fósforo (que también estaba contenida en la alimentación 2x), ya que Veening *et al.* (2006) aseguran que la formación de esporas es controlada por multicomponentes fosforilados que pueden activar reguladores de la esporulación, como es el caso del regulador Spo0A, el cual afecta la expresión de más del 10 % de todos los genes en el genoma de *B. subtilis* y puede, eventualmente, permitir la formación de esporas altamente resistentes a la temperatura. Sin embargo, la eficiencia de esporulación en este cultivo resultó significativamente menor (15.2 %) comparada con el cultivo alimentado A (68.6).

Los valores de pH durante el cultivo fueron controlados entre valores aproximados de 5.5 y 6 (**figura 7.9c**), ya que, en algunas ocasiones, éste parámetro descendió a valores cercanos a 5. Este descenso en el pH se debió, probablemente a la asimilación de fosfatos como nutrientes, lo cual no permitió amortiguar el pH en el medio de cultivo como lo indican Doi y McGloughlin (1992). Es posible que el descenso del pH se deba también a la producción de ácidos orgánicos, como se mencionó anteriormente.

En la **figura 7.9c** se muestra el perfil de oxígeno disuelto. Durante la alimentación, *B. subtilis* 83 consumió el oxígeno de manera constante, hasta que la concentración de glucosa llegó a su máximo nivel. La disminución de la concentración celular viable, concomitante con el aumento de la concentración de glucosa, también se ve reflejado en el perfil de oxígeno disuelto, en donde se observa que la TOD aumenta a consecuencia de la disminución de la demanda del oxígeno.

La cantidad total de glucosa adicionada al medio de fermentación fue de 335 g, con lo cual fue determinado el rendimiento de esporas por gramo de glucosa ($Y_{\text{esp/g glucosa}} = 0.067$ esporas viables/g de glucosa). Al final de la fermentación se obtuvieron 21.4 g de biomasa en base seca, con lo cual se obtuvo el rendimiento de biomasa por gramo de glucosa ($Y_{\text{x/g glucosa}} = 0.29$ g de biomasa/g de glucosa). Los datos de rendimiento se comparan en la sección 7.4.4 con los otros tipos de cultivo

7.4.4 Cultivo alimentado C

Este cultivo se deriva del cultivo anterior. En un principio la intención era realizar la réplica del cultivo alimentado B. Sin embargo, a consecuencia de un descuido, las sales minerales en la alimentación se adicionaron en una concentración igual a la de un cultivo lote convencional (1x) y el pH no fue controlado. De este experimento se obtuvieron resultados muy interesantes y una conveniente serendipia, por lo que se decidió realizar la réplica para comprobar los resultados, encontrando que fueron marcadamente reproducibles. Este cultivo se llevó a cabo en un biorreactor de 5 L de volumen operacional (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo® 110/software: Biocomand®), iniciando con un volumen de 3.5 L para la primera fase de cultivo en lote. Se adicionó 1 L de la solución alimentadora, la cual se componía de 300 g/l de glucosa, y las sales minerales que componen el medio de cultivo mineral, en una concentración igual a la de un cultivo lote convencional (1x). En este cultivo el pH no fue controlado.

Los resultados se presentan en la **figura 7.10**. El experimento se realizó por triplicado y se graficó el promedio de las réplicas. En estas graficas se muestran las barras de desviación estándar que indican los valores máximos y mínimos obtenidos entre réplicas. En algunos casos, las desviaciones son de la misma magnitud del símbolo empleado. Las líneas punteadas verticales indican el tiempo de inicio y final de la etapa de alimentación. En el **anexo D** se exponen las gráficas de las tres réplicas para demostrar la reproducibilidad de los datos. En la **figura 7.10d** se muestra la cinética de crecimiento y la esporulación de la bacteria en diferentes escalas para observar con más detalle los

cambios en la concentración celular. Podemos observar que este cultivo fue muy reproducible ya que la variación en la desviación estándar de los datos graficados en la **figura 7.10** fue muy pequeña. Durante la etapa de cultivo lote (antes de iniciar la alimentación), se observó un posible efecto asociado a una concentración mayor de glucosa al inicio del cultivo (13.6 g/l), comparado con los otros cultivos ensayados (10 g/l). Si bien, estas concentraciones son aparentemente similares, Dauner *et al.* (2001) estableció que *B. subtilis* puede detectar cambios de concentración de glucosa de hasta 0.3 g/l y verse reflejado en el crecimiento celular. En este cultivo el cambio en la concentración de glucosa inicial con respecto al cultivo en lote (sección 7.1) se ve reflejado en un incremento exponencial de la concentración de biomasa y en una disminución del porcentaje de oxígeno disuelto a consecuencia de la demanda de oxígeno por parte de las células, además de una disminución progresiva del pH durante esta etapa. Esto concuerda con lo reportado por Monteiro *et al.* (2005), quienes determinaron que la concentración de células vegetativas se incrementa con el aumento de la concentración de glucosa al inicio del cultivo (de 5 hasta 20 g/l), durante la fase en lote. Sin embargo, al iniciar con tal concentración de glucosa (que por arriba de 5 g/l, ellos consideran como “alta”), la eficiencia de esporulación se ve afectada de manera negativa. Monteiro *et al.* (2005) reportaron que las concentraciones de glucosa menores a 3 g/l iniciaban el proceso de esporulación en *B. subtilis*. Por esto, ellos mantenían un nivel de glucosa cercano a 3 g/l durante la alimentación. Sin embargo, se sabe que el proceso de esporulación se inicia cuando hay limitación de algún nutriente, en este caso, se esperaba que la esporulación se iniciara cuando la concentración de glucosa llegara a 0 g/l, y no a 3 g/l. Además, esta inducción se lleva a cabo 6 horas después de que se agota el nutriente limitante, de acuerdo a lo reportado por Walker (2000). En el caso del cultivo alimentado C la concentración de glucosa fue cercana a 0 g/l cinco minutos antes de iniciar la alimentación (ver **figura 7.10b**) y no se detectaron esporas viables en ese tiempo, reafirmando el reporte de Walker (2000).

Una vez que se comenzó a adicionar glucosa al medio de cultivo, la concentración de las células vegetativas viables se mantuvo constante durante 10 h (**figura 7.10a** y **7.10b**). Esto se ve reflejado en un aumento en la tensión de oxígeno disuelto en el medio, tal como se observa en la **figura 7.10c** (ver la parte de las líneas punteadas que indican el tiempo de inicio y final de la etapa de alimentación). Pasado este tiempo, y con la glucosa acumulada en el medio, comenzó entonces un crecimiento exponencial de las células vegetativas viables, reflejándose en una brusca caída de la concentración de glucosa cuando cesó la alimentación. En esta forma de cultivo, la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de consumo de glucosa en la fase de alimentación fueron de 0.21 h^{-1} y $0.68 \text{ g glucosa/g de biomasa} \cdot \text{h}$, respectivamente. A las 39 horas de cultivo se observa un

aumento significativo de la producción de esporas viables, llegando a una concentración de 7.2×10^{10} esporas viables/ml. Esto pudo deberse a que existió una limitación de la fuente de nitrógeno, ya que no se detectó concentración alguna de sulfato de amonio en el medio de cultivo. Sin embargo, en el medio aún había 3 g/l de glucosa. Esto puede indicar que la limitación de fuente de nitrógeno es la causante de la mayor producción de esporas viables comparada con los otros cultivos ensayados.

Un fenómeno similar se repitió en el trabajo de Avignone-Rossa y Mignone (1993). Al realizar cultivos alimentados, limitando el crecimiento de *B. thuringiensis* con nitrógeno, lograron maximizar la concentración de esporas. Este comportamiento podría ser explicado de acuerdo a lo postulado por Harwood y Cutting (1990), quienes indican que la esporulación en bacterias del género *Bacillus* es inducida, principalmente, por la limitación de la fuente de carbono y/o de la fuente de nitrógeno. La eficiencia de esporulación (esto es células vegetativas viables que se convierten en esporas viables) en este cultivo fue de 85.7 %, ampliamente superior a los otros cultivos estudiados.

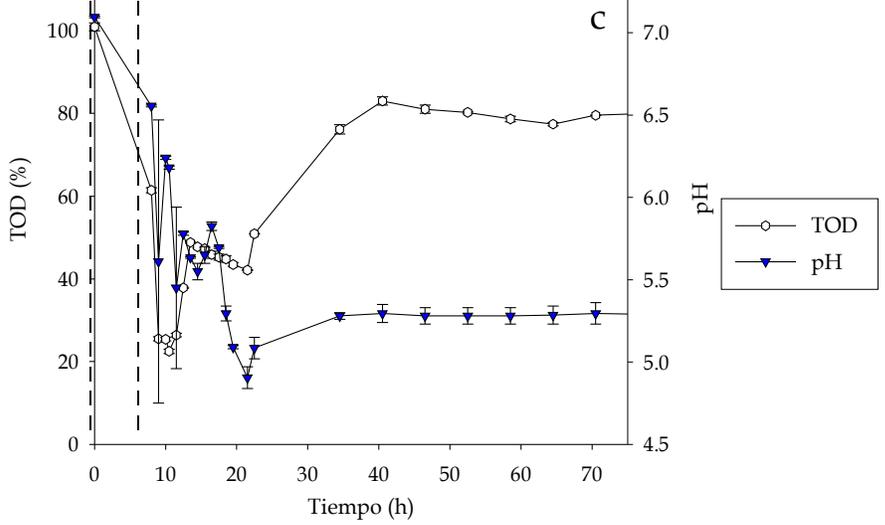
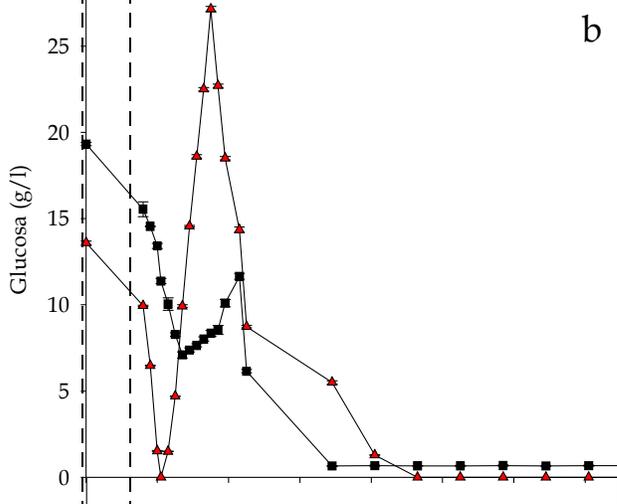
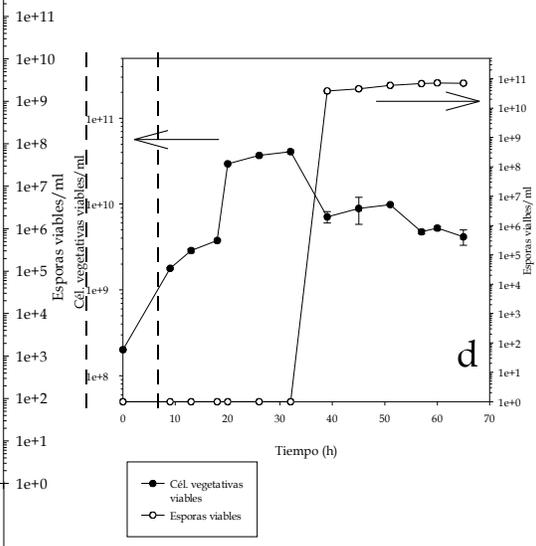
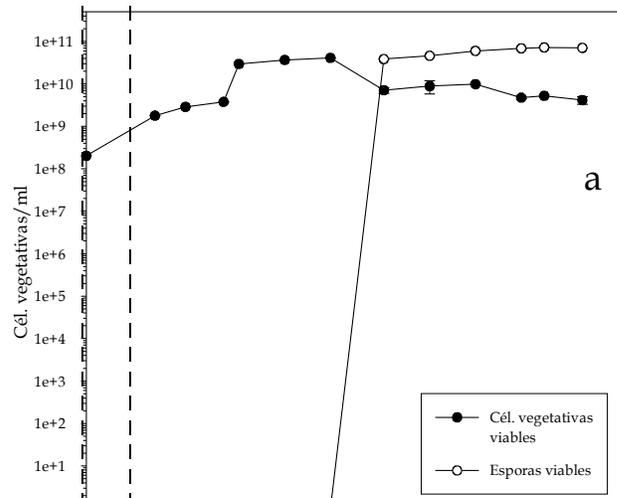


Fig. 7.10 Cinética de crecimiento, esporulación, consumo de sustratos y evolución de pH de *B. subtilis* 83 en el cultivo alimentado C. Las líneas punteadas verticales indican el inicio y final de la alimentación.

Harder y Dijkhuizen (1983) indicaron que cuando existen condiciones no limitantes de la fuente de carbono, pero sí de la fuente de nitrógeno, el flujo de la fuente de carbono no es conducido totalmente a la formación de biomasa, lo que podría permitir una acumulación significativa de material de reserva intracelular. Esto nos permite suponer que este material de reserva podría ser utilizado para la posterior esporulación de la bacteria, logrando una mejor calidad de esporas.

Jarmer *et al.* (2002) aseguran que la limitación por nitrógeno es una de varias señales que estimulan la competencia (supervivencia) en *B. subtilis*. Por otro lado, se sabe que diferentes fuentes de nitrógeno afectan de manera diferente el crecimiento y producción de esporas de *B. subtilis*. Martínez (1997) observó que en cultivos alimentados, limitados por la fuente de nitrógeno y alimentado con glucosa, se evitaba lisis celular.

Lo anterior podría ser explicado con base en lo reportado por Dauner *et al.* (2001) quienes indican que la limitación por nitrógeno tiene efectos moderados en la fisiología celular (lo que significa mantener viva a la célula mediante la esporulación, evitando lisis celular), comparado con otro tipo de limitación, como es el caso de la limitación por fósforo, en donde se induce un fuerte desacople de los procesos de anabolismo y catabolismo que conducen a bajos rendimientos de biomasa.

Cabe destacar que en este cultivo se produjo una mayor concentración de esporas viables comparado con los otros tipos de cultivos ensayados en este trabajo y con los reportados en la bibliografía. La viabilidad se mantiene por encima del 70 %. Sin embargo, esta viabilidad es menor a la obtenida en el cultivo alimentado B (83.9 %, un solo experimento). Esto podría deberse a que probablemente, la síntesis de las enzimas que son requeridas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y que llevan a la formación de aminoácidos (que son requeridos para una efectiva esporulación de la bacteria), se sintetizan en menor escala, ya que Dauner *et al.* (2001) y Hanson y Cox (1967) mencionan que la inhibición en la síntesis de glutamato y/o glutamina es causada por una limitación en la fuente de nitrógeno. Por lo que al haber menor cantidad de aminoácidos, las esporas sean menos resistentes al calor, ya que de acuerdo a lo mencionado por Walker (2000), los aminoácidos se almacenan en el citoplasma de la bacteria (espora) como proteínas citoplasmáticas de peso molecular bajo y se llaman proteínas pequeñas solubles en ácido (SASP). Algunas SASP contribuyen a la capacidad de la espora para resistir la radiación ultravioleta y el calor, ya que los tipos α/β de estas proteínas protegen el

DNA contra una gran variedad de daños, incluyendo la depurinización y la desaminación de la citosina (Setlow, 2006). Además, la unión de las SASP al DNA estabiliza la actividad negativa de la superhélice del DNA (Walker, 2000). Además, Warriner y Waites (1999) indican que las condiciones de cultivo están relacionadas con las propiedades de la espora, especialmente con la resistencia térmica, por lo que seguramente la limitación por nitrógeno, o por algún otro mineral (especialmente calcio), esta directamente relacionada con la disminución de la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* 83 en este cultivo ya que las esporas con altos niveles de calcio son más resistentes al calor (Setlow, 2006).

Por otra parte, comparando estos resultados con los obtenidos por Monteiro *et al.* (2005), se ve claramente que para el caso de *B. subtilis* 83, la limitación del crecimiento celular por la fuente de nitrógeno o sales minerales y valores de pH por debajo de 5.5 durante la alimentación y la fase estacionaria, aumentan considerablemente la eficiencia de esporulación (comparado con el cultivo alimentado B, donde las condiciones son inversas a estas), la cual está definida por la proporción de células vegetativas viables que se convierten en esporas viables. Esto es contrario al comportamiento de la cepa de *B. subtilis* utilizada por Monteiro *et al.* (2005), la cual, al crecer en una concentración del medio de cultivo (medio de esporulación Difco: glucosa, caldo nutritivo, KCl, MgSO₄, Ca(NO₃)₂, MnCl₂ y FeSO₄) doblemente mayor a la empleada en un cultivo en lote y en un rango de pH entre 6 y 9, la eficiencia de esporulación se ve desfavorecida (20.6 %) con respecto al cultivo alimentado C (85.7 %).

La cantidad total de glucosa adicionada al medio de fermentación fue de 335 g, con lo cual fue determinado el rendimiento de esporas por gramo de glucosa ($Y_{\text{esp}/\text{glucosa}} = 0.967$ esporas viables/g de glucosa). Al final de la fermentación se obtuvieron 23.1 g de biomasa en base seca, con lo cual se obtuvo el rendimiento de biomasa por gramo de glucosa ($Y_{\text{x}/\text{glucosa}} = 0.31$ g biomasa/g de glucosa). Los datos de rendimiento se comparan en la sección 7.4.5 con los otros tipos de cultivo.

7.4.5 Comparación de los cultivos de acuerdo al modo de alimentación del nutriente limitante que inicia la esporulación

Los cuadros 7.3 y 7.4 muestran los datos sobresalientes de los cultivos realizados en este trabajo. Los detalles de cálculo se encuentran en el Anexo A de este escrito. En el cultivo alimentado C se obtuvieron los mejores resultados, incluso comparado con los únicos trabajos publicados para la

producción de esporas de *B. subtilis* (Paik *et al.* 2000; Monteiro *et al.* 2005). Se observa que el cultivo alimentado C superó por un orden de magnitud la concentración de esporas viables obtenidas en los cultivos alimentados A y B y por dos órdenes de magnitud al cultivo en lote convencional. Además, en este cultivo se obtuvo una alta viabilidad de las esporas (73.4 %), la cual supera dos veces a la obtenida en el cultivo en lote convencional (36.4 %) (**cuadro 7.3**).

Por otra parte, el rendimiento de esporas viables por gramo de glucosa es más de 5 veces superior en el cultivo alimentado C, comparado con los otros tipos de cultivo ensayados en esta investigación (**cuadro 7.4**). Esto significa que en el cultivo alimentado C, la célula aprovechó mejor la fuente de carbono, la cual es conducida hacia la formación de esporas con alta viabilidad. Esto podría corroborarse con el alto porcentaje de eficiencia de esporulación obtenido en el cultivo alimentado C, en donde el 85.7 % de las células vegetativas viables (concentración máxima) obtenidas durante la alimentación se transformaron en esporas viables en la fase estacionaria (**cuadro 7.3**). Por su parte, en el **cuadro 7.4** se observa que la producción de biomasa total con respecto a la glucosa alimentada fue similar en todos los cultivos; sin embargo, sólo en el cultivo alimentado C la mayor parte de la glucosa fue aprovechada para la formación de esporas viables de *B. subtilis* 83 ($Y_{spo/gluc} = 0.967$ esporas viables/g de glucosa, lo cual, presumiblemente tiene que ver con la limitación por nitrógeno) ya que en los cultivos alimentados A y B, y en el proceso descrito por Monteiro *et al.*, (2005), los rendimientos de esporas viables por gramo de glucosa alimentada son bajos ($Y_{spo/gluc} < 0.58$ esporas viables/g de glucosa). Por otra parte, el **cuadro 7.3** muestra que la eficiencia de esporulación fue mayor en el cultivo alimentado C (85.7 %) con respecto a los cultivos ensayados en esta investigación y el de Monteiro *et al.* (2005) (<21 %).

Cuadro 7.3 Datos sobresalientes, con respecto a las células, de los cultivos realizados con diferentes modos de alimentación.

	Lote	Fedbatch A	Fedbatch B	Fedbatch C	Monteiro <i>et al.</i> , (2005)
Características principales	10 g/l de glucosa inicial	Pulsos de glucosa	Limitación con glucosa, sales 2x, pH ~7	Limitación de amonio, sales 1x, pH 7→5	Limitación con glucosa, medio de cultivo 2x
Esporas viables (Spo x 10¹⁰/ml)	0.072	0.48	0.5	7.2	0.74
Células vegetativas (UFC x 10¹⁰/ml)	0.124	0.7	3.3	7.7	3.6
Viabilidad de las esporas (%)	36.4	69.2	83.9	73.4	No reportado
Eficiencia de esporulación viable (%)	58.1	68.6	15.2	85.7	20.6

Cuadro 7.4 Rendimientos de los cultivos realizados con diferentes modos de alimentación.

	Lote	Fedbatch A	Fedbatch B	Fedbatch C	Monteiro <i>et al</i> , (2005)
Características principales	10 g/l de glucosa inicial	Pulsos de glucosa	Limitación con glucosa, sales 2x, pH ~7	Limitación de amonio, sales 1x, pH 7→5	Limitación con glucosa, medio de cultivo 2x
Y_{Spo/gluc} (esp x 10¹²/g glucosa)	0.072	0.132	0.067	0.967	0.58
Y_{biomasa/gluc} (g biomasa/g gluc)	0.27	0.27	0.29	0.31	No reportado
Productividad de esporas (Spo viables x 10¹⁰/L*h)	3	7.3	6.9	184	16
Glucosa total adicionada (g)	40	400	335	335	20.5
Biomasa total (g)	10.8	106.26	96.3	104	No reportado

Los datos del **cuadro 7.4** indican que la productividad de las esporas viables del cultivo alimentado C es 14 veces superior a los demás cultivos estudiados en esta investigación. Este punto es muy importante, desde el punto de vista de economía del proceso, ya que con este tipo de cultivo alimentado es posible minimizar los volúmenes de fermentación y en número de corridas para la producción de esporas de *B. subtilis*. Las memorias de cálculo utilizadas para la elaboración de los **cuadros 7.3 y 7.4** se encuentran en el **Anexo A**. Los datos de las células viables fueron tomados cuando las concentraciones de éstas se encontraban en el máximo nivel. Cabe aclarar que los datos del cultivo alimentado B son producto de un solo experimento, por lo que habrá que tomarlos con el debido cuidado.

7.4.6 Producción de compuestos antifúngicos termorresistentes por *Bacillus subtilis* 83 en los cultivos alimentados A, B y C

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* utilizando el caldo de cultivo libre de células y sometido a un proceso de esterilización en autoclave (121 °C y 15 psi), producto de la fermentación de *B. subtilis* 83 en los cultivos alimentados A, B y C. El experimento se realizó por triplicado y se muestran las barras de error de las tres réplicas.

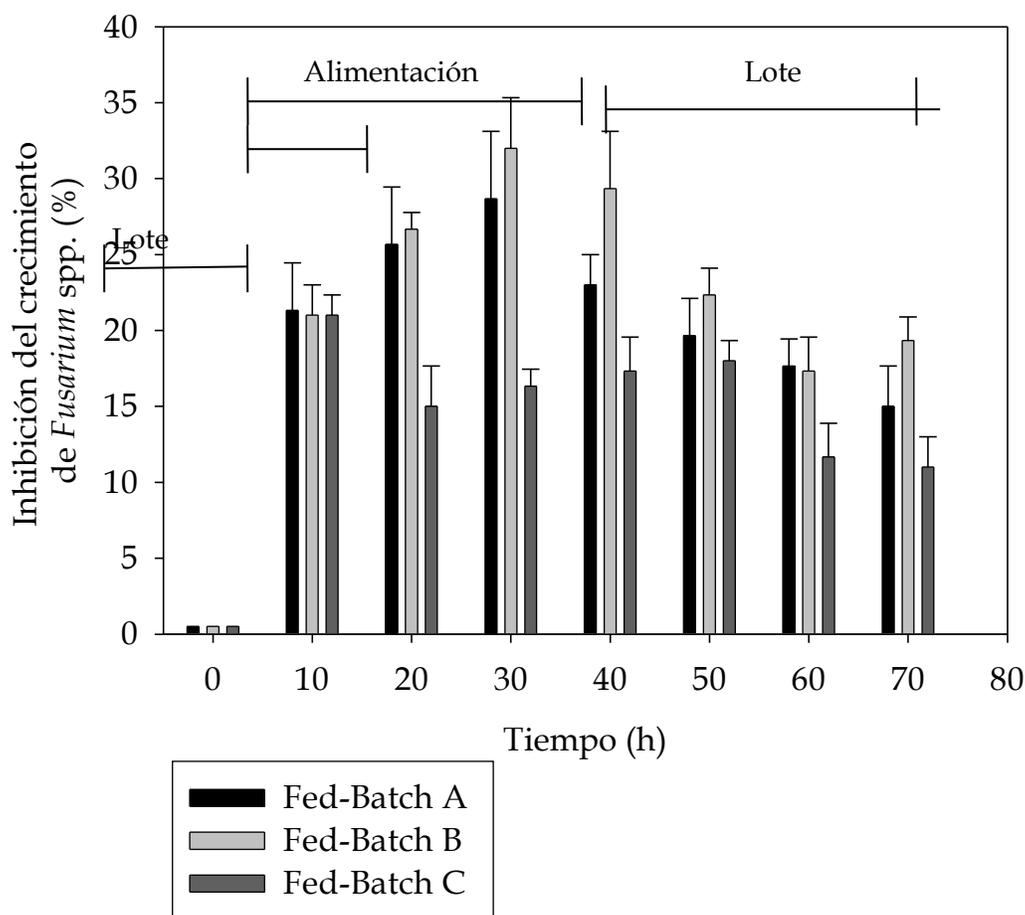


Fig. 7.11 Producción de compuestos antifúngicos termorresistentes por *B. subtilis* 83 en los cultivos alimentados A, B y C.

En la **figura 7.11** se muestran los porcentajes de inhibición causado por los metabolitos termorresistentes producidos por la bacteria. *B. subtilis* 83 empezó a sintetizar compuestos antifúngicos termorresistentes entre las 0 y 10 horas de cultivo, ya que a partir de las 10 h se presentó inhibición considerable sobre *Fusarium* spp. usando los sobrenadantes de los tres tipos de cultivo. Durante la etapa de cultivo lote (de las 0 h a las 10 h de cultivo) en los tres cultivos alimentados, los porcentajes de inhibición fueron prácticamente iguales. Sin embargo, después de la alimentación (el periodo se muestra en la **figura 7.11**), únicamente los cultivos A y B presentaron porcentajes de inhibición similares, diferenciándose a la hora 40 de cultivo, en donde el sobrenadante del cultivo B presentó una mayor inhibición del crecimiento sobre *Fusarium* spp. (~ 10 % mayor). Asimismo, en los cultivos A y B, el máximo porcentaje de inhibición se alcanzó a las 30 h de cultivo (30 %). Por otro lado, los porcentajes de inhibición en el cultivo C fueron significativamente menores, comparados con los cultivos A y B. Esto podría estar relacionado a lo descrito por Schmiedeknecht *et al.* (2001), quienes indican que el amonio y/o el nitrato utilizados como fuentes de nitrógeno para el crecimiento de *B. subtilis* aumentan la actividad antagonista de las sustancias producidas por ésta bacteria, por lo que, el

cultivo C, al estar limitado por amonio, el efecto en la actividad antagonista de los compuestos antifúngicos producidos por *B. subtilis* 83 es menor comparado con los cultivos en donde el amonio no fue limitante.

Si bien en el cultivo alimentado C se obtuvieron los mejores rendimientos en cuanto a células vegetativas y esporas viables con respecto a la fuente de carbono, así como la mayor productividad y eficiencia de esporulación, la producción de compuestos antifúngicos termorresistentes fue la más baja, comparada con los cultivos alimentados A y B. Desde el punto de vista de la formulación de un producto a base de esporas de *B. subtilis* 83 y sus compuestos antifúngicos, los resultados con el cultivo alimentado C representan una desventaja, ya que los compuestos antifúngicos, al ser procesados en condiciones de altas temperaturas (como las que imperan en un secador por aspersión), perderían sensiblemente su actividad antagonista.

8. Conclusiones

8.1 Conclusión general

Realizando cultivos alimentados con glucosa, permitiendo la acumulación de ésta en el medio, limitando el crecimiento de las células vegetativas con la fuente de nitrógeno, manteniendo el cultivo en condiciones no limitantes de oxígeno y utilizando un medio de cultivo mineral, es posible maximizar la producción de esporas viables, la viabilidad, el rendimiento de esporas viables con respecto a la glucosa adicionada y la productividad de las esporas viables, comparado con cultivos lote y alimentados y limitados por glucosa.

8.2 Conclusiones particulares

- ✓ Se caracterizó la producción de células vegetativas viables y esporas viables de *Bacillus subtilis* 83 en biorreactor de 10 L con un medio mineral.
- ✓ *Bacillus subtilis* 83 es capaz de sintetizar compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización a partir de las 12 h de cultivo.
- ✓ La viabilidad de *B. subtilis* 83 cultivada en lote en el medio mineral fue de 36.4 %.
- ✓ La suplementación del medio de cultivo mineral con extracto de levadura, caldo nutritivo, peptona y la combinación de ellos no aumentó la concentración de células vegetativas viables y esporas viables con respecto al medio mineral.
- ✓ En los medios de cultivo suplementados, *B. subtilis* 83 sintetizó también compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización.
- ✓ En consecuencia, el medio de cultivo seleccionado para el cultivo en lote alimentado fue el mineral, con la ventaja de ser químicamente definido y de bajo costo.

- ✓ Realizando cultivos alimentados exponencialmente con glucosa, es posible aumentar la concentración de esporas viables hasta en dos órdenes de magnitud, y la viabilidad de las esporas en 2 veces, con respecto al cultivo en lote.
- ✓ Los cultivos alimentados exponencialmente con glucosa permitieron incrementar el rendimiento de esporas viables con respecto a la glucosa alimentada hasta en 13 veces y la productividad en aproximadamente 60 veces, con respecto al cultivo en lote.
- ✓ Realizando cultivos exponencialmente alimentados con glucosa y limitando el crecimiento de las células vegetativas con la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) se maximiza la producción de esporas viables, comparado con la limitación por glucosa.
- ✓ En un cultivo exponencialmente alimentado, cuando la concentración de las sales del medio mineral en la alimentación es mayor (2 veces) con respecto a un cultivo en lote convencional y el pH se mantiene por encima de 5 durante el cultivo, la eficiencia de esporulación se reduce importantemente con respecto a un cultivo con condiciones adversas.
- ✓ En el cultivo alimentado B se obtuvo la mayor efectividad de los compuestos antifúngicos resistentes al proceso de esterilización, comparado con los cultivos alimentados A y C, y en este último se obtuvo la menor efectividad de éstos compuestos.

9. Perspectiva

- Identificar y cuantificar los metabolitos antifúngicos producidos por *B. subtilis* 83.

10. Referencias bibliográficas

- Allende, R., Juárez, C., García, E.R., Carrillo, F.A., Patiño, M. y Galindo, E. (2001). *Rhodotorula minuta* agente de control biológico potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. *Fitopatología Brasileira* 26 (supp.) p.461
- Aranda, O. (1997). Evaluación de *Bacillus subtilis* como agente de control de enfermedades fungosas del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) y su efecto en el rendimiento bajo condiciones de invernadero. *Tesis de Maestría en Ciencias, especialista en Fitopatología*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México
- Arcas, J. A., Yantorno, O. M., Arrarás, E. A. and Ertola, R. J. (1984). A new medium for growth and δ -endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnology Letters* 6:495-500
- Arcas, J., Yantorno, O. and Ertola, R. (1987). Effect of high concentración of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology Letters* 9(2):105-110
- Asante, G.S. and Neal A.L. (1993). Characterization of fungistatic substances produced by a *Bacillus* antagonistic to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology* 54:819-822
- Avignone-Rossa, C. and Mignone, C. (1993). δ -endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* 15(3):295-300
- Balderas, K. (2004). Control biológico de antracnosis en mango: aspectos de formulación y de evaluación precisa de la enfermedad. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos
- 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
- Bernal, G., Illanes, A. and Ciampi, L. (2002). Isolation and partial purification of metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5(1):12-20
- Besson, F. and Michel, G. (1987). Isolation and characterization of new iturins: Iturin-D and Iturin-E. *Journal Antibiotics* 40:437-442
- Besson, F., Peypou, F. and Michel, G. (1979). Interaction between bacterial membranes and peptidolipids: Lysis of *Micrococcus lauteus* protoplast by derivatives of peptidolipids antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry and Biophysics* 558:552-558
- Broadbent, P.K., Baker, K.F., Franks, N. and Holland, I. (1977). I. 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 measurement in unbaffled flask at low viscosity. *Biotechnology and bioengineering* 68:589-593

- Carrillo-Fasio, A., Allende-Molar, R., García-Estrada, R., Carrillo-Hurtado, R., Patiño-Vera, M. y Galindo-Fentanes, E. (2005). Control biológico de antracnosis del mango ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1): 24-32
- Caspeta, L. (2007). Escalamiento descendente del proceso de producción de proteína recombinante por *Escherichia coli* termoinducida: estudio de la respuesta transcripcional. *Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas* (en proceso). Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M.I., Chulze, S. and Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156:748-754
- Cayuela, C., Kai, K., Park, Y.S., Iijima, S. and Kobayashi, T. (1993). Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75(5):383-386
- Cercos, F. (1957). Los antibióticos y su aplicación agropecuaria. Salvat editores. S.A. 1ª edición, p. 475
- Chambliss, G.H. (1993). Carbon source-mediated catabolite repression. In: *Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Sonenshein L.A., Hoch A. J. and Losick R. (eds). ASM, Washington D.C., págs. 213-219
- 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
- Cook, R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31:53-80
- Cook, R.J. and Baker, K.F. (1983). Developmental history of biological control of plant pathogens. In: *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. APS Press, St. Paul MN. p. 359
- Dauner, M., Storni, T. and Sauer, U. (2001). *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *Journal of Bacteriology* 183(24):7308-7317
- Dawes, I.W. and Mandelstam, J. (1970). Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. *Journal of Bacteriology* 103(3):529-535
- Dawes, I.W. and Thornley, J.H.M. (1970). Sporulation in *Bacillus subtilis*. Theoretical and experimental studies in continuous culture systems. *Journal of General Microbiology* 62:49-66
- 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
- Donnellan Jr., J. E., Nags, E. H. and Levinson, H. S. (1964). Chemically defined media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 87(2):332-336

- Driks, A. (2002). Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:389-391
- Dunleavy, J. (1955). Control of *damping-off* of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 45:252-258
- Eckert, W.J. and Ogawa, J.M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Phytopathology* 23:421-454
- Ellard, D. J. and Lundgren, D. G. (1966). Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* in chemically defined medium. *Journal of Bacteriology* 23:421-454
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1:117-126
- 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
- Fisher, S.H. and Sonenshein, A.L. (1991). Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology* 45:107-135
- Foster, J.H. and Woodroff H.B. (1946). Bacillin, a new antibiotic from soil isolate of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 51:363-369
- Foster, J. W., Hardwick, W. A. and Guirard, B. (1950). Antisporulation factors in complex organic media I. *Journal of Bacteriology* 59(4):463-470
- Fucikovsky, L. (1999). La tristeza y la muerte del agave tequilaza 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
- Gueldner, 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
- Hagelin, G., Oulie, I., Raknes, A., Undheim, K. and Clausen, G. O. (2004). Preparative high-performance liquid chromatographic separation and analysis of the Maltacine complex –a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Journal of Chromatography B* 811:243-251
- Hanson, R.S. and Cox, D.P. (1967). Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid enzymes. *Journal of Bacteriology* 93: 1777-1787
- Harder, W. and Dijkhuizen, L. (1983). Physiological responses to nutrient limitation. *Annual Review of Microbiology* 37:1-23
- Harwood, C.R. (1989). Sporulation and germination. In: *Bacillus*. Plenum Press, New York, pp. 169-205

- Harwood, C.R. and Archibald, A.R. (1990). Growth, Maintenance and General Techniques. In: *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, New York, pp. 1-15
- 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
- Huang, C.C., Liao, Z.M., Hirai, M., Ano, T. and Shoda, M. (1998). *Ipa-14*, a gene involved in the production of lipopeptide antibiotics, regulates the production of a siderophore, 2,3 dihydroxibenzoylglycine, in *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86(6):605-607
- Janisiewicz, J.W. and Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases fruits. *Phytopathology* 40:411-441
- Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S. and Saxild, H. H. (2002). Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters* 206:197-200
- Jayaraj, J., Radhakrishnan, N.V., Kannan, R., Sakthivel, K., Suganya, D., Venkatesan, S. and Velazhahan, R. (2005). Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 15(1):55-65
- Jiang, Y. M., Zhu, X. R. and Li, Y.B. (2001). Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Food Science and Technology* 34:430-436
- Juárez, R.C. (2001). Microorganismos antagonistas para el control de antracnosis en mango cultivado en Sinaloa. *Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción Agrícola*. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México, p. 78
- Jung, D.Y., Jung, S., Yun, J.S., Kim, J.N., Wee, Y.J., Jang, H.G. and Ryu, H.W. (2005). Influences of cultural medium component on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus* sp. RKY3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10:289-295
- Kajimura, Y., Sugiyama, M. and Kaneda, M. (1995). Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *The Journal of Antibiotics* 48:1100-1102
- Kang, B.C., Lee S.Y. and Chang H.N. (1992). Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnology Letters* 14(8):721-726
- 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
- Laskin, A. I. and Lechevalier, H. A. (1984). Effect of nutrition on cellular differentiation in prokaryotic microorganism and fungi. In: *CRC Handbook of Microbiology*. CRC, Boca Raton, pp. 17-121
- Lee, S.Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 14:98-105

- Liu, W-M., Bajpai, R. and Bihari, V. (1994). High-density cultivation of sporeformers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 731:310-325
- Losick, R. and Stragier, P. (1992). Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature* 355:601-604
- Luna, C.L., Mariano, R.L.R. and Souto-Maior, A.M. (2002). Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 9(2):133-140
- Maier, U. and Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7:99-106
- Mannanov, R.N. and Sattarova, R.K. (2001). Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chemistry of Natural Compounds* 37(2):117-123
- Marks, C.L. and Freese, E. (1987). Aspects of carbohydrate metabolism related to sporulation and germination. In: *Sugar transport and metabolism in Gram-positive bacteria*. Reizer, J. and Peterkofsky, A. (eds.). Ellis Harwood Limited, Chichester, England. pp. 295-332
- Martin, M. and Gottlieb, D. (1955). The production and role of antibiotic in soil antibacterial activity of five antibiotics in the presence of soil. *Phytopathology* 45:407
- Martínez, A. (1997). Estrategias de fermentación para la producción de β -galactosidasa de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis*. *Tesis de Doctorado en Biotecnología*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos
- Martínez, A., Ramírez, O.T. and Valle, F. (1997). Improvement of culture conditions to over produce 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
- Modak, J.M., Lim, H.C. and Tayeb, Y.J. (1986). General characteristics of optimal feed rate profiles for various fed-batch fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering* 28:1396-1407
- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J. and Cunha, A.E. (2005). A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* 21:1026-1031
- Morales, D. (2005). Selección de un medio de cultivo y escalamiento de la producción de *Bacillus subtilis* CPA y sus metabolitos antifúngicos como agente de control biológico. *Tesis de Licenciatura en Ingeniería bioquímica*. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
- Nakata, H.M. and Halvorson, H.O. (1960). Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 80:801-810
- O'Connor, G.M., Sanchez-Riera, F. and Cooney, C.L. (1992). Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 39:293-304

- Park, Y.S., Kai, K., Iijima, S. and Kobayashi, T. (1992). Enhanced β -galactosidase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering* 40:686-696
- Patiño, V.M., Allende, R., Ortíz, M., Jiménez, B., Albiter, V., Carrillo, J.A., García, R.S., Carrillo, R., Márquez, I. y Galindo, E. (2004). Biological control of mango anthracnose at semi-comercial level. *Proceedings, International Workshop: Development of Biocontrol Agents of Diseases for Commercial Applications in Food Production Systems*. 24-27 March 2004, Sevilla, España. p. 133
- 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
- Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. (1994). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 16:895-903
- Rodríguez, L. (2005). Producción y formulación de esporas de *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos
- Romero, M. (2005). Compatibilidad de fungicidas y bactericidas con microorganismos antagonistas del suelo y su efecto sobre hongos fitopatógenos radiculares de tomate. *Tesis de maestría en Ciencias y Tecnología para Productos Agrícolas de Zonas Tropicales y Subtropicales*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Culiacán, Sinaloa.
- Sahoo, S., Krishnamurthy, R., Suresh, A.K. and Suraishkumar, G.K. (2004). Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress. *Biotechnology and Bioengineering* 87(1):81-89
- San-Lang, W., Shih, 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
- Serrano-Carreón, L. y Galindo, E. (2006). Control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia* (en prensa)
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101:514-525
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. and Jackson, M.A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94(11):1267
- Schaeffer, P. (1969). Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and endotoxins. *Bacteriological Review* 33(1):48-71
- Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J-P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 54:704-711

- 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
- 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
- Snay, J., Jeong, J.W. and Attai, M.M. (1989). Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotechnology Progress* 5(2):63-69
- Sonenshein, A. L. (1989). Metabolic regulation of sporulation and other stationary-phase phenomena. In: *Regulation of prokaryotic development. Structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination*. Smith I., Slepecky R. A. and Setlow P. (eds.). ASM, Washington, D.C. pp. 109-130
- 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
- Szczecz, M. and Shoda, M. (2004). Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 152:549-556
- Tabarez, M., Jansen, R., Sylla, M., Lunsdorf, H., Haußler, S., Santosa, D., Timmis, K. and Molinari, G. (2006). 7-O-Macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant Enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *American Society for Microbiology* 50:1701-1703
- Thomas, M.B. and Willis, A.J. (1998). Biocontrol-risky but necessary?. *Public Health Perspectives* 13(8):325-329
- Thonart, Ph., Heuzé, V. Destain, J., Meurisse, E., Jacques, Ph., Hbid, C., Lepoivre, Ph., Razafindralambo, H. and Paquot, M. (1994). *Bacillus subtilis* as a biopesticide : biochemical and technological aspects. *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology*, Florence, Italy. 13-17 June 1993, pp. 1075-1079
- Utkhede, R.S. (1984). Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. *Canadian Journal of Botany* 62:1032-1035
- Veening, J. W., Smits, W. K., Hamoen, L. W. and Kuipers, O. P. (2006). Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. *Journal of Applied Microbiology* 101:531-541
- Vierheller, C., Goel, A., Peterson, M., Domach, M.M. and Atai, M.M. (1995). Sustained and constitutive high levels of protein production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 47:520-524
- Walker, S.T. (2000). Clasificación, estructura y funcionamiento de las bacterias. En: *Microbiología*. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. pp. 33-36

- 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
- Wehinhold, A.R. and Bowman, T. (1968). Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. *Soil Science* 28:12-23
- Wienczek, K.M., Kaples, N.A. and Foegeding, P.M. (1990). Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9):2600-2605
- Yamane, T. and Shimizu, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 30:145-194
- Yee, L. and Blanch, H.W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio/technology* 10:1550-1556
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from Mulberry leaves. *Phytopathology* 91:181-187
- Yüksekdağ, Z. N., Ashm, B., Beyath, Y. and Mercan, N. (2004). Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) sintesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology* 3(1):63-66