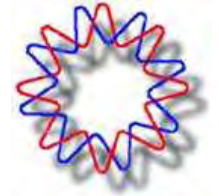




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**“Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado
para el crecimiento vegetativo y la producción de
esporas de *Bacillus subtilis* 83”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

I.Q. SERGIO ANDRÉS CRISTIANO FAJARDO

TUTOR DE TESIS: Dr. Enrique Galindo Fentanes

Cuernavaca, Morelos

Mayo 2012



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 el periodo de ejecución de este trabajo se contó con el apoyo económico del proyecto DGAPA IN222010 y de la beca de maestría de CONACyT

DEDICATORIA

A mis padres, Marco Tulio y María Eugenia, por ser mis mayores ejemplos de vida y el apoyo incondicional que me han brindado desde el momento en que llegué a este mundo.

A mis hermanos, Clara Eugenia y Oscar Felipe, por ser mis compañeros en esta gran familia.

A Lili, por su cariño inmenso, ser mi cómplice en todo y mi maravillosa compañía.

A esos grandiosos amigos: Oriana, Francisco, Gheorghe, Marel, Cristina, David, Poncho, Kike, Fabio, Sandra, Odín, Claus, Karina, Edna Lorena, Cristina T, Lilu, Raunel, Daniela, Ana Laura, Brenda, Alejandro TG, Luis Felipe, Carlos Caborca, Don Horacio y a todos los Fullerenos y Perros del mal. Gracias a la maestría por haberlos traído.

A los integrantes de los grupos EG y OTR

A mi familia y amigos en Colombia

AGRADECIMIENTOS

Dr. Enrique Galindo Fentanes, por la magnífica oportunidad de trabajar a su lado, por la confianza que depositó en mí, su paciencia, entusiasmo, dedicación y enseñanzas en este camino de aprendizaje.

Dr. Leobardo Serrano Carreón, por su acompañamiento constante como tutor y amigo.

Al Comité Tutorial, por sus efectivos consejos y direccionamiento en mi proyecto.

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dr. Mario Soberón Chávez

Miembros del Jurado

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, por el apoyo incondicional a lo largo de estos años de trabajo.

T.L.C. Mario Alberto Caro Bermúdez

Q.F.B Miriam Ortíz García

Ing. Verónica Albiter Hernández

M. en B. Raunel Tinoco Valencia

Sr. Arturo Escobar Juárez

Staff del grupo Galindo

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Dra. María Soledad Córdova Aguilar

M. en C. Celia Flores Ocampo

Sra. Lecitia Díaz Aldama

Sra. Juana Ferrer Fuentes

Sr. Antonio Dorantes López

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	13
1 ANTECEDENTES	14
1.1 Control biológico y participación de <i>Bacillus subtilis</i>	14
1.2 Antracnosis en el mango y la cepa <i>Bacillus subtilis</i> 83	16
1.3 Esporas de <i>Bacillus subtilis</i>	17
1.3.1 Etapas de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i>	17
1.3.2 Control de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i>	20
1.4 Producción de esporas de <i>Bacillus sp.</i>	23
1.4.1 Producción de esporas de <i>Bacillus</i> en cultivos en lote	23
1.4.2 Producción de esporas de <i>Bacillus</i> en cultivos en lote alimentado	25
1.4.3 Producción de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> 83	28
2 HIPÓTESIS	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
5 MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Materiales	34
5.1.1 Microorganismo	34
5.1.2 Composición de medios de cultivo	34
5.1.3 Preparación de inóculos	35
5.1.4 Cultivos en lote fermentador de 7 l	36
5.1.5 Cultivos en matraces de 500 ml	37

5.1.6	Cultivo aTOD controlada y en lote alimentado en fermentador de 30 l	37
5.2	Métodos analíticos	40
5.2.1	Glucosa residual	40
5.2.2	Amonio residual	40
5.2.3	Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Cuenta en Placa	41
5.2.4	Cuantificación de esporas. Choque térmico y siembra en placa	41
5.2.5	Conteo de células totales mediante conteo directo.	42
5.2.6	Determinación de ácidos orgánicos por HPLC	44
5.2.7	Análisis elemental de la célula vegetativa	44
5.2.8	Determinación preliminar de la tensión de oxígeno disuelto crítica (TOD _{crit})	44
5.2.9	Bioensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	45
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1	Cinética de crecimiento y esporulación de <i>B. subtilis</i> 83 en medio mineral estándar en cultivos por lote.	47
6.2	Análisis elemental de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> 83.	50
6.3	Mejoramiento del medio mineral	51
6.3.1	Diseño experimental	51
6.3.2	Cinéticas de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en medio mineral mejorado.	54
6.4	Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en medio mineral mejorado bajo condiciones de mínima tensión de oxígeno disuelto	57
6.4.1	Determinación de la tensión de oxígeno disuelto crítica	57
6.5	Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> 83 a tensión de oxígeno disuelto mínimo de 10 %	58
6.6	Crecimiento vegetativo y esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en lotes alimentados	61
6.6.1	Diseño de medio de cultivo inicial en lotes alimentados	61

6.6.2	Evaluación de los perfiles de alimentación exponencial y a flujo constante, observaciones preliminares y diseño de lotes alimentados.	63
6.6.3	Comportamientos generales: cambios morfológicos y fisiológicos de los cultivos en lote alimentado	70
6.6.4	Parámetros generales del proceso bajo diferentes flujos y perfiles de alimentación	77
6.6.5	Producción de compuestos antifúngicos por <i>Bacillus subtilis</i> 83 en cultivos alimentados	82
7	CONCLUSIONES	84
7.1	Conclusión general	84
7.2	Conclusiones específicas	84
8	PERSPECTIVAS	86
	BIBLIOGRAFÍA	87
	ANEXOS	94
	ANEXO A Curva de calibración de concentración de sulfato de amonio	94
	ANEXO B Error experimental de técnica de cuenta en placa	95
	ANEXO C Curva de calibración de ácidos orgánicos y acetoína en HPLC	96
	ANEXO D Modelos experimentales. Concentración de células vegetativas y viabilidad	97
	ANEXO E Ejemplo de reproducibilidad de los experimentos	98
	ANEXO F Flujos de alimentación	101
	ANEXO G Cinéticas de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados	102
	ANEXO H Micrografías de caldos de cultivos alimentados	110
	ANEXO I Incremento de la viscosidad del caldo de cultivo y de la velocidad de agitación	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5-1 Composición del medio sólido YPG	34
Tabla 5-2 Composición del medio líquido YGP	35
Tabla 5-3 Composición del medio mineral estándar	35
Tabla 6-1 Parámetros de fermentación en cultivo en lote de <i>B. subtilis</i> en medio mineral	50
Tabla 6-2 Análisis elemental de células vegetativas de <i>Bacillus subtilis</i> 83.....	50
Tabla 6-3 Biomasa generada en el cultivo en lote.....	51
Tabla 6-4 Niveles de evaluación de los factores del diseño experimental.....	52
Tabla 6-5 Composición de medios de cultivo seleccionados para mejoramiento del lote.	55
Tabla 6-6 Parámetros de medios de cultivo en lote	56
Tabla 6-7 Parámetros de crecimiento vegetativo en cultivos en lote	60
Tabla 6-8 Composición elemental de la bacteria. Tomada de Buitrago (2004).....	62
Tabla 6-9 Concentración inicial de sales en el medio alimentado.	62
Tabla 6-10 Variables cinéticas del cultivo en lote de <i>Bacillus subtilis</i> 83.	63
Tabla 6-11 Características de los perfiles de alimentación exponencial.....	68
Tabla 6-12Características de los perfiles de alimentación a flujo constante.....	69
Tabla 6-13 Características del perfil de alimentación a flujo mixto	69
Tabla 6-14 Datos sobresalientes con respecto a células y metabolitos generados.....	77
Tabla 6-15 Rendimientos y productividades de los cultivos realizados con diferentes perfiles de alimentación.	78
Tabla A-1 Error experimental en técnica de cuenta en placa	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Ciclo de vida de <i>Bacillus subtilis</i> . Tomada de Errington (2003).	18
Figura 1-2 Estructura de la spora. Adaptada de Setlow (2006).	19
Figura 1-3 Red de diferentes caminos genéticos relacionados con la diferenciación celular y esporulación en <i>B. subtilis</i> . Adaptada de López <i>et al</i> (2009).	21
Figura 4-1 Estrategia experimental	32
Figura 5-1 <i>Bacillus subtilis</i> 83, vista al microscopio (100x).	34
Figura 5-2 Biorreactor de 14 l	36
Figura 5-3 Biorreactor de 30 l	38
Figura 5-4 Método de conteo en cámara de Neubauer	43
Figura 5-5 Esquema de bioensayo con <i>C. gloeosporioides</i>	46
Figura 6-1 Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> 83 en medio mineral durante cultivo en lote biorreactor de 7 l, las barras de error indican la desviación estándar de los parámetros medidos.	47
Figura 6-2 Esquema del Diseño experimental 2 ³	52
Figura 6-3 Resultados diseño experimental. A. Concentración de UFC máxima; B. Viabilidad: UFC/Cuenta Total. Se resaltan los puntos donde se obtuvieron los mejores resultados en ambos parámetros estudiados.	53
Figura 6-4 Cinéticas de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en medios mejorados en biorreactores de 7l. Izq). Medio A: Glucosa 5 g/l, Sulfato de Amonio 1 g/l, Sales 1.5X; Der). Medio B: Glucosa 10 g/l, Sulfato de Amonio 1.7 g/l, Sales 1X.	55
Figura 6-5 Determinación experimental de la tensión de oxígeno disuelto crítica (TOD _{crit}) bajo tres condiciones de concentración celular en el medio de cultivo.	58
Figura 6-6 Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en lote. Izq) Medio A a TOD de 10%, biorreactor 20L. Der) Medio A en “exceso de oxígeno”, biorreactor de 7L.	59
Figura 6-7 Cinéticas de crecimiento y esporulación en LAI.	64
Figura 6-8 Cinética de crecimiento LAIP. Las líneas punteadas muestran el comienzo y el final de la alimentación.	66
Figura 6-9 Esquema de alimentación a flujo constante	68
Figura 6-10 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAVIII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	71

Figura 6-11 Micrografías 40x de muestras del caldo del cultivo del lote LAVIII. A) Fase I, a 0h, 3h y 6h de fermentación, células vegetativas largas; B) Fase II, a 9h y 24h de fermentación, disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III, a 37h y 52h de fermentación, población heterogénea ; D) Fase IV. a 73 y 78 h de fermentación, población heterogénea.	72
Figura 6-12 Ejemplo de agregado de células formado en el medio de cultivo durante la Fase II.	74
Figura 6-13 Producción de compuestos antifúngicos por <i>B. subtilis</i> 83 en cultivos alimentados.	82
Figura A-1 Curva de calibración absorbancia vs. sulfato de amonio	94
Figura A-2 Curvas de calibración de ácidos orgánicos. Izq) Ultravioleta; Der) Índice de refracción.	96
Figura A-3 Cinéticas de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83. Cultivo A. Dos experimentos por separado.	98
Figura A-4 Cinéticas de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83. Cultivo B. Dos experimentos por separado.	99
Figura A-5 Cinéticas de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 83 en cultivo en lote controlando la TOD a 10%. Tres experimentos por separado.	100
Figura A-6 Flujos de alimentación en cultivos alimentados	101
Figura A-7 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAI. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	102
Figura A-8 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	103
Figura A-9 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAIII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	104
Figura A-10 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAIV. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	105

Figura A-11 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAV. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.....	106
Figura A-12 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAVI. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	107
Figura A-13 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAVII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	108
Figura A-14 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAXI. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.	109
Figura A-15 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAI. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.	110
Figura A-16 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAII. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.	111
Figura A-17 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAIII. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.	112
Figura A-18 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAIV. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.	113
Figura A-19 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAV. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.	114
Figura A-20 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAVI. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.	115

Figura A-21 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAVII. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea. 116

Figura A-22 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAIX. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea. 117

Figura A-23 Incremento de la viscosidad y la velocidad de agitación en cultivos alimentados 118

RESUMEN

Bacillus subtilis 83 es una bacteria generadora de esporas, que presenta actividad antagonista comprobada contra hongos patógenos en cultivos de mango. El desarrollo de un agente de control biológico a base de esporas generadas por este microorganismo es una alternativa promisoría en biotecnología, para reemplazar a los fungicidas químicos tradicionales. La obtención de un proceso de producción competitivo y económicamente rentable es indispensable para dar introducción en el mercado de este producto. La producción de esporas de *Bacillus subtilis* se lleva a cabo actualmente en cultivos en lote y lote alimentado, estos últimos son preferidos debido a que se pueden alcanzar mayores densidades celulares. En este trabajo se estudiaron los requerimientos nutricionales y el comportamiento fisiológico de la bacteria durante el crecimiento vegetativo y esporulación en un medio mineral suplementado con glucosa. La estrategia a seguir fue seleccionar las variables de proceso en cultivos en lote (concentración inicial de fuente de carbono, tensión de oxígeno disuelto) que permitieran alcanzar las mayores concentraciones de células vegetativas y utilizar este escenario como punto de partida del lote alimentado, donde se estudiaría la influencia de los perfiles y flujos de alimentación en el crecimiento de la cepa y posterior esporulación. Siguiendo esta metodología fue posible desarrollar un proceso de alta densidad celular donde se alcanzaron concentraciones de células vegetativas y esporas viables de 5.4×10^{10} UFC/ml y 3.13×10^{10} Spo/ml, respectivamente. Estos resultados son mayores a los valores máximos reportados en la literatura para la concentración de esporas producidas por diferentes cepas de *B. subtilis*. Adicionalmente, se identificó la generación de subproductos de metabolismo en altas concentraciones, como acetoína y 2,3-butanodiol, por parte de la cepa de trabajo, lo que abre la puerta al desarrollo de nuevos procesos de producción, combinando cultivos de alta densidad celular con la generación de compuestos de alta demanda industrial. El conocimiento generado por este proyecto permitió entender a fondo el comportamiento de esta cepa bajo distintas condiciones de proceso y mejorar el proceso de producción actual en términos de rendimiento y productividad, generando un escenario favorable para su posterior escalamiento y comercialización.

1 ANTECEDENTES

1.1 Control biológico y participación de *Bacillus subtilis*

Control biológico se define como el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) enemigos naturales de una plaga o un patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano-Carreón and Galindo, 2007). En este sentido el control biológico de frutos y plantas por microorganismos es una alternativa prometedora frente al uso extensivo de pesticidas, los cuales son generalmente muy costosos y tienden a acumular compuestos químicos no deseados en plantas o frutos (Nagórska *et al.*, 2007).

En 1980, Kloepper denomina como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), a aquellos organismos no patogénicos que viven en la rizosfera de las plantas y que le confieren al hospedero beneficios en su crecimiento asociados con la actividad biológica que desarrollan en las mismas (Nagórska *et al.*, 2007). Los PGRP presentan varias características que les permiten actuar como agentes de control biológico; entre las cuales se encuentran: la eliminación de enfermedades causadas por fitopatógenos, debido a la producción de un amplio rango de compuestos antimicrobianos (Ongena *et al.*, 2005b); competencia en la colonización del nicho y de los nutrientes con especies que no estimulan el crecimiento o incluso patógenas (Bais *et al.*, 2004) y la activación de sistemas de defensa inducidos por resistencia sistémica (Ongena *et al.*, 2005a).

Dentro de estas rizobacterias, recientemente han llamado la atención las bacterias gram positivas, formadoras de esporas del género *Bacillus*. Entre estas, *B. subtilis* es reconocido como una poderosa herramienta de biocontrol. Entre sus principales características se encuentran: su capacidad de producir diferentes antibióticos con amplio espectro de actividad (Stein, 2005), la formación de biopolímeros y biopelículas (Marvasi *et al.*, 2010) que le facilitan la motilidad y colonización de nichos, y particularmente su capacidad de formar esporas; células latentes capaces de germinar en diversos ambientes (Errington, 2003). Se ha demostrado que este microorganismo produce más de dos docenas de compuestos antimicrobianos, entre los cuales se destacan las familias de lipopéptidos cíclicos surfactinas, iturinas y fengicinas (Stein, 2005); que por su naturaleza anfipática pueden asociarse fácilmente y anclarse entre

capas lipídicas y así interferir en la directamente en la integridad de las membranas biológicas de los organismos patógenos aumentando la probabilidad de lisis y muerte de los mismos (Ongena and Jacques, 2008). Estas capacidades hacen de *Bacillus subtilis* un microorganismo idóneo para la elaboración de agentes de control biológico, que puedan ser utilizados en cultivos agrícolas para el control de enfermedades y patógenos de plantas y frutos.

Pusey y Wilson (1984) evaluaron a *B. subtilis* frente a *Monilina fructicola*, asperjando una suspensión de la bacteria sobre diferentes frutos que posteriormente fueron inoculados con el patógeno, encontrando que se controlaba la pudrición café en todos los frutos (nectarines, duraznos y ciruelos) en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, el caldo nutritivo en el que fue cultivado *B. subtilis* también demostró actividad antifúngica, por lo cual el mecanismo propuesto por ellos fue la antibiosis.

En cultivos de papa, Aranda (1997) llevó a cabo un estudio *in vitro* con *B. subtilis* y describió una inhibición de crecimiento de cinco hongos patógenos. Adicionalmente, en condiciones de invernadero cuando se aplicó *B. subtilis* a la papa, la cantidad de tubérculos y el peso de los mismos se incrementaron para las variedades *Alpha* y *Atlantic*.

En otro estudio, se reportó que *B. subtilis* igualmente inhibe el crecimiento de *Eutypa lata*, causante de la muerte regresiva de la vid. Se observó un 94 % de inhibición en la germinación de ascosporas junto con la malformación de hifas (Ferreira *et al.*, 1991) .

Cavaglieri *et al.* (2005) estudiaron la inoculación de semillas de maíz con *B. subtilis*, logrando disminuir la colonización de *Fusarium verticillioides* y la producción de fumosina B₁ (metabolito secundario producido por el hongo que afecta la salud humana y de los animales) en las raíces de las plantas de maíz en las plantas 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* es más efectivo para el control de la enfermedad, comparado con el testigo químico comercial "metalaxil".

En cultivos de aguacate, Demoz y Kortsen (2006) realizaron pruebas antagónicas frente a los hongos responsables de la pudrición en el pedúnculo de aguacate, inoculando las plantas en etapa de floración con el producto comercial “Avogreen” basado en *B. subtilis*. El resultado muestra que las bacterias fueron capaces de anclarse, colonizar y sobrevivir en las flores y frutos. De igual manera lograron colonizar a conidios e hifas de los patógenos causándole a estos su degradación celular.

Yang *et al.* (2006) estudiaron la capacidad antagónica de *B. subtilis* frente a varios hongos fitopatógenos de melón (*Alternaria alternata*, *Fusarium semitecum*, *Rhizopus stolonifer* y *Thichothecium roseum*). En el trabajo se adicionó caldo de fermentación sin filtrar a frutos inoculados con los hongos, observándose una inhibición en el área de incidencia y lesión de la enfermedad.

1.2 Antracnosis en el mango y la cepa *Bacillus subtilis* 83

El mango es una de las frutas tropicales más apreciadas y populares, además de ser una de las más importantes 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 (Mora *et al.*, 2002).

Una de las enfermedades postcosecha más importantes que afectan al mango es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotricum gloeosporioides*, el cual daña la calidad de los frutos y disminuye significativamente la vida de anaquel del producto.

Dentro del marco de un proyecto conjunto realizado entre el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos y el Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo, A.C., de Culiacán, Sinaloa, se aisló a *Bacillus subtilis* 83 del follaje de mango. En ensayos *in vitro* esta cepa demostró actividad antagonista contra el hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. En ese trabajo se observaron halos de inhibición que denotaron la producción de sustancias fungicidas, sugiriendo como mecanismo antagónico de la bacteria la antibiosis, es decir, la producción de sustancias antifúngicas (Galindo *et al.*, 2005).

Morales (2007) demostró la producción de compuestos antifúngicos termorresistentes por *B. subtilis* 83. Se realizaron ensayos *in vitro* utilizando caldo de cultivo libre de células y sometido a un proceso de esterilización en autoclave (121°C, 15psi y 20min). Las pruebas mostraron halos de inhibición frente al hongo patógeno *Fusarium* spp.

1.3 Esporas de *Bacillus subtilis*

Las esporas constituyen un estadio fisiológico que permite a las células sobrevivir fácilmente en condiciones donde normalmente una célula vegetativa moriría, por ejemplo: ambientes con altas temperaturas, exposición a radiación ionizante y la presencia de solventes químicos, detergentes y/o enzimas hidrolíticas, por enumerar algunos. Las esporas del género *Bacillus* son formadas en un proceso que generalmente es inducido por limitaciones nutricionales en el ambiente (Errington, 2003). Una spora tiene la capacidad de sobrevivir por extensos periodos viéndose sometida a una carencia o inexistencia de nutrientes, y es capaz de reversar a su estado vegetativo si estos nutrientes resultan disponibles nuevamente. Las esporas presentan un metabolismo latente, contiene poco o nada de compuestos energéticos como ATP y NADH, exhiben un metabolismo no detectable de componentes exógenos o endógenos y presentan una muy baja actividad en su núcleo (Setlow, 2006). Las esporas pueden sobrevivir por años, a veces cientos, e incluso hay reportes que sugieren que estas pueden permanecer en estado latente hasta por millones de años (Cano and Borucki, 1995). Estas propiedades de resistencia y durabilidad confieren a las esporas de *Bacillus subtilis* características primordiales para la elaboración de productos de control biológico, formulados en base seca o en base húmeda que puedan mantenerse activos durante un largo periodo de almacenamiento y comercialización.

1.3.1 Etapas de esporulación en *Bacillus subtilis*

El proceso de esporulación se ha dividido en siete estadios, basados en los principales cambios fisiológicos que ocurren durante la formación de la spora (Errington, 2003). La Figura 1-1, presenta esquemáticamente el ciclo de esporulación de la célula, ocurriendo en primer lugar, la división asimétrica de la célula, seguido del engullimiento de la célula pequeña o pre-espora, posteriormente la formación de la corteza y la cubierta y, finalmente, la maduración y lisis de la célula madre (Errington, 2003).

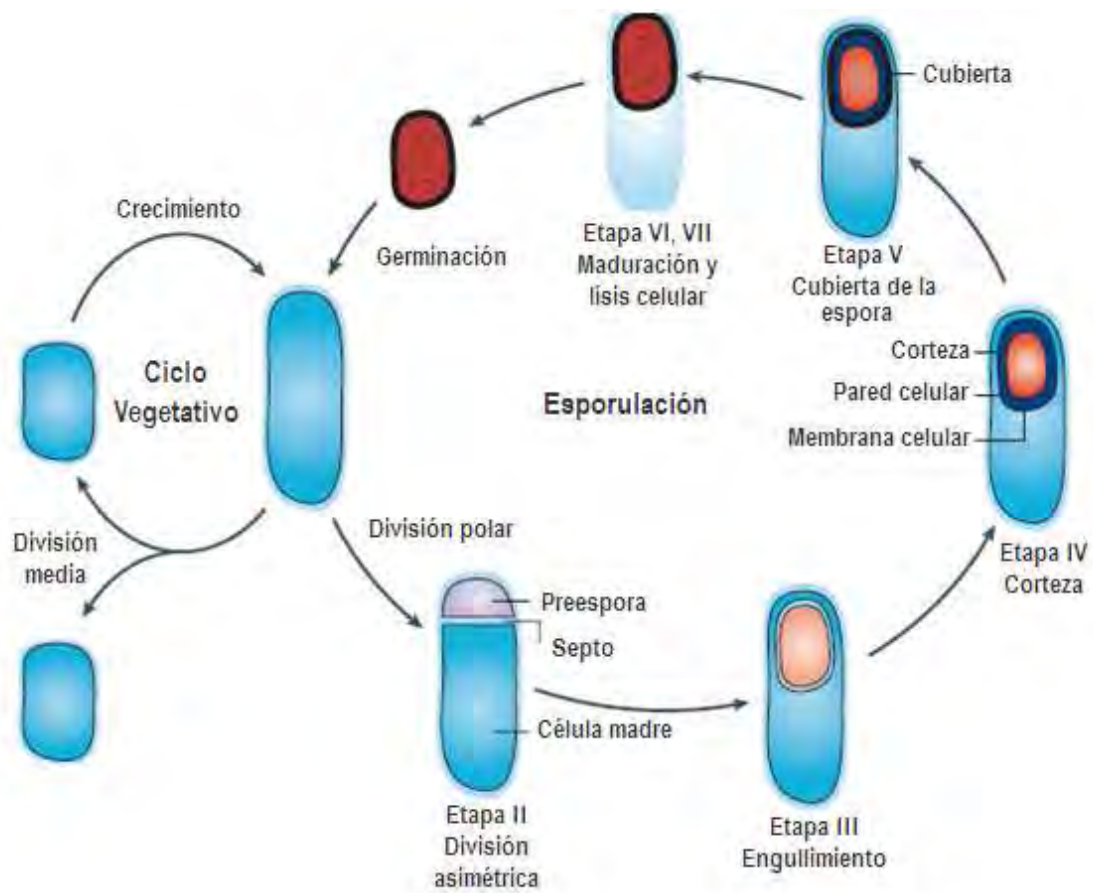


Figura 1-1 Ciclo de vida de *Bacillus subtilis*. Tomada de Errington (2003).

Las esporas bacterianas tienen una apariencia muy diferente a las células vegetativas, ya que están rodeadas de varias capas gruesas cuya acción conjunta le confieren resistencia a condiciones ambientales adversas (ver Figura 1-2).

El citoplasma de la bacteria en forma de espora es llamado núcleo de la espora, contiene sólo una copia del cromosoma bacteriano, carece de RNA mensajero y tiene poco RNA de transferencia, debido a la baja actividad enzimática en el núcleo de la espora. Los aminoácidos se almacenan como proteínas citoplasmáticas de bajo peso molecular y son llamadas, pequeñas proteínas solubles en ácido (SAPS, small acid-soluble proteins). Algunas SASP contribuyen a la capacidad de la espora para resistir la luz ultravioleta ya que crean un efecto protector al unirse al DNA (Setlow, 1992). No existe actividad metabólica alguna y la energía se almacena en forma de 3-fosfoglicerato, debido a su mayor estabilidad que el ATP.

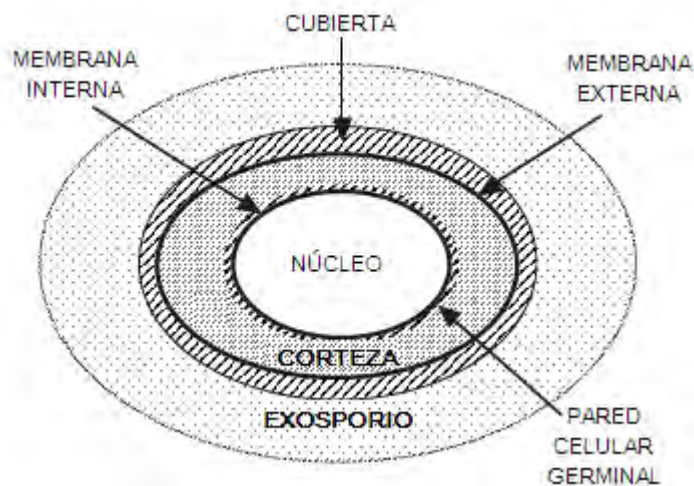


Figura 1-2 Estructura de la espora. Adaptada de Setlow (2006).

El núcleo de la espora está rodeado primero, por una membrana lipídica interna, y luego, por una pared celular compuesta de peptidoglucano con una estructura muy parecida al de la célula vegetativa. La membrana lipídica interna es una barrera permeable cuyo principal objetivo es proteger a la espora de ataques químicos que puedan afectar al DNA (Nicholson *et al.* 2000, Cortezzo y Setlow 2005). Por otro lado la pared celular germinal no juega un papel importante en la resistencia de la espora, sin embargo se utilizará para desarrollar la pared celular de la nueva célula vegetativa.

Sobre la membrana interna y la pared celular germinal se encuentra una capa concéntrica gruesa, llamada corteza. La corteza está constituida por un peptidoglucano que contiene enlaces cruzados pocos comunes, como anillos de lactama murámica (Gilmore *et al.*, 2003). La corteza igualmente contiene ácido diplicónico (DPA) o ácido piridín 2-6 dicarboxílico. El DPA, que también se encuentra en el núcleo es un agente quelante de calcio y corresponde a alrededor del 15 % del peso de la espora (Gerhart and Marquis, 1989). Cuando el DPA, depositado en la corteza, forma compuestos quelados con calcio, pone a éste elemento en contacto con el peptidoglucano polianiónico de la corteza. Los enlaces iónicos que se forman ocasionan que el péptidoglucano se contraiga y expulse agua en un proceso semejante al de “exprimir agua en una toalla”. La espora es tan seca que, mientras el agua comprende entre 75 y 80 % del peso húmedo de una célula vegetativa, en la espora, este contenido de agua se reduce hasta un rango entre el 27 y 55 % (Gerhart and Marquis, 1989). Se cree que la resequedad imparte a la espora la resistencia al calor, inclusive hasta permitirle sobrevivir varias horas a temperatura de ebullición (Walker, 2000).

Envolviendo a la corteza se encuentra una nueva membrana externa, cuya función es importante principalmente en la estructura cuando la espora se encuentra en formación (Piggot and Hilbert, 2004). Junto a la membrana externa se encuentra la cubierta de la espora, la cual se compone de varias capas de proteínas que en su mayoría son productos específicos de genes de esporulación (Driks, 1999). La cubierta de la espora es importante en la resistencia de la espora hacia compuestos químicos y enzimas líticas exógenas que pueden llegar a degradar la corteza de la espora, pero la cubierta casi no tiene efecto en la protección hacia el calor o radiación (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2000). Finalmente, la capa más externa es denominada exosporio y es considerada como una expansión de la cubierta de la espora. Está compuesta de glicoproteínas y su función se asocia más con el reconocimiento externo (Lai *et al.*, 2003).

1.3.2 Control de esporulación en *Bacillus subtilis*

El mayor estímulo para dar inicio a la esporulación es la limitación de nutrientes. Sin embargo, esta escasez nutricional no actúa como un desencadenante inmediato de la esporulación; este proceso se desarrolla como consecuencia de una serie de decisiones celulares con respecto a cómo hacer frente al estrés nutricional de la mejor manera (Schultz *et al.*, 2009).

En la Figura 1-3 se ilustra la red genética de toma de decisiones de *Bacillus subtilis* mediante la cual se regula y monitorea un amplio intervalo de señales tanto internas como externas. Estos elaborados sistemas de transducción determinarán el destino de las células, analizando y procesando información acerca del estrés nutricional (Lopez *et al.*, 2009), la densidad de la colonia y el estatus de las células vecinas (péptidos tipo feromonas y de *quórum sensing*) (Grossman and Losick, 1988). Esta información es procesada por acción combinada de una compleja red reguladora de interacción entre genes y proteínas, que incluye la activación e inactivación de genes y la fosforilación y defosforilación de las proteínas. El principal componente de esta red es el regulador transcripcional Spo0A que se activa por fosforilación (Spo0A-P) comienza a acumularse al inicio de la limitación (Piggot and Hilbert, 2004).

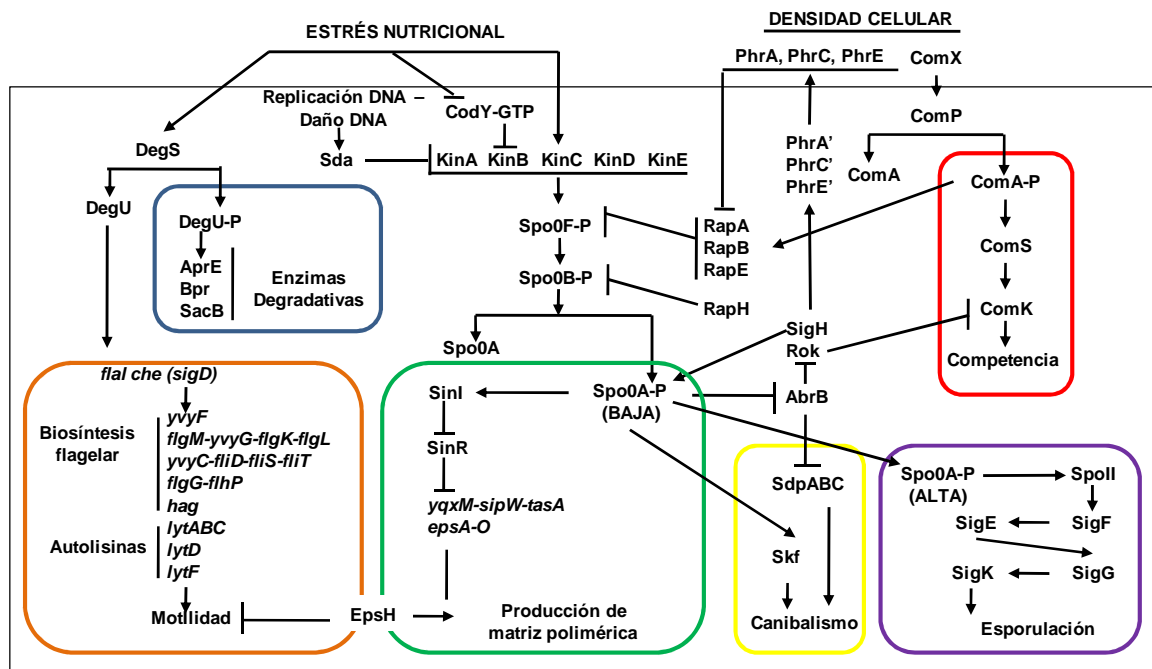


Figura 1-3 Red de diferentes caminos genéticos relacionados con la diferenciación celular y esporulación en *B. subtilis*. Adaptada de López *et al* (2009).

El primer análisis de la expresión genética durante la esporulación enfocado en las etapas tempranas y medias del desarrollo de este proceso, permitió la identificación de más de 500 genes, cuya expresión dependía de Spo0A-P en *B. subtilis*. Sin embargo un análisis más detallado encontró un total de 121 genes, organizados en 54 unidades transcripcionales, que son objetivos directos de Spo0A-P (Molle *et al.*, 2003). Estos objetivos directos se dividen en dos clases: Spo0A dependientes de la acumulación de este regulador a un nivel bajo y Spo0A dependientes de la acumulación a un nivel alto (Fujita *et al.*, 2005). Extraordinariamente, genes esenciales para la esporulación son mas prevalentes en la categoría de umbral alto, mientras que genes de vías auxiliares como la formación de biopolímeros y canibalismo pertenecen al grupo dependiente de umbral bajo (Eichenberger, 2007).

Con base en lo anterior, el progreso de la esporulación se puede asociar con el incremento de la concentración de Spo0A-P en la célula. Durante las primeras horas de un estado de estrés nutricional (nivel bajo de Spo0A-P) la célula activará diferentes vías genéticas alternativas con funciones específicas para intentar contrarrestar el escenario adverso en el que se encuentra (ver Figura 1-3). Entre éstas están incluidas la activación de la motilidad flagelar para la búsqueda de nuevas fuentes de nutrientes por quimiotaxis; la generación de matrices poliméricas para la colonización y dominio de

espacios; la secreción de enzimas degradativas cuyos objetivos son proteínas y polímeros extracelulares; la síntesis de antibióticos y otras armas químicas para eliminar a otros organismos que compiten por el mismo nicho y la generación de factores de aniquilamiento o canibalismo donde la célula ataca a su misma especie. Si transcurrido un tiempo, la limitación de nutrientes no es superada, la concentración de Spo0A-P alcanzará un nivel tal que activa definitivamente la maquinaria genética de esporulación y lo convierte en un proceso irreversible (Schultz *et al.*, 2009).

Además del regulador Spo0AP, existen varias proteínas reguladas por éste que son muy importantes en el proceso de esporulación. Algunas de estas proteínas inhibitoras son AbrB y SinR, encargadas de reprimir directa o indirectamente genes encargados de la producción de enzimas degradativas, utilización de nitrógeno, metabolismo de aminoácidos, motilidad, síntesis de antibióticos y su resistencia, desarrollo de competencia factores de canibalismo y producción de exopolisacáridos (Phillips and Strauch, 2002) . De igual manera existen por lo menos 6 factores sigma (σ^A , σ^H , σ^F , σ^H , σ^E , σ^K) que regulan la maquinaria genética en la esporulación actuando entre la célula madre y la espora en formación (Eichenberger, 2007).

Adicionalmente la célula puede desarrollar un estado de competencia (alternativo a la esporulación), el cual la célula competente de *B. subtilis* puede tomar DNA exógeno que puede utilizar para reparar daños en el DNA o que pueden proveer a la célula una resistencia frente a la adversidad que está enfrentando, se conoce que por lo menos un 10% de un cultivo celular puede alcanzar a desarrollar este estadio (Schultz *et al.*, 2007).

Antes de iniciar la esporulación la célula verifica intracelularmente la integridad del cromosoma y el estado de su replicación, a través de la proteína Sda (Veening *et al.*, 2009), esto presumiblemente para asegurar que una vez iniciada la esporulación, ésta pueda llevarse a cabo completamente (Errington, 2009). La esporulación como destino final elegido para sobrellevar la limitación nutricional, se lleva a cabo en un lapso aproximado de 10 horas (Schaeffer *et al.*, 1965).

1.4 Producción de esporas de *Bacillus sp.*

En el desarrollo de tecnología de producción de esporas, el objetivo principal del proceso es lograr una alta concentración de esporas utilizando la menor cantidad de materias primas y de operaciones, en el menor tiempo posible y a un bajo costo (Chen *et al.*, 2009) . Para llevar a cabo este objetivo se deben conocer y analizar objetivamente las etapas que componen este proceso: primero el crecimiento vegetativo y segundo la esporulación.

En la primera etapa se promueve el crecimiento de la bacteria con el fin de alcanzar altas densidades celulares. Aquí es importante tener en cuenta varios factores que permitan llevar a cabo este crecimiento, entre estos, el medio de cultivo utilizado bien sea en medios complejos, medios definidos y las concentraciones iniciales de los sustratos en los mismos (Liu *et al.*, 1994; Laloo *et al.*, 2009; Matar *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009) y las condiciones de operación del reactor como: temperatura, pH, agitación, suministro de oxígeno, entre otros (Monteiro *et al.*, 2005).

En la segunda etapa comienza la esporulación, principalmente por la limitación de un sustrato esencial. El objetivo en esta etapa es lograr que cada célula vegetativa pueda generar una spora en su interior con capacidad germinativa (spora viable). Sin embargo, la transición entre estas etapas está gobernada por el tipo de limitación nutrimental y las condiciones de proceso, que marcarán completamente el complejo proceso de diferenciación celular de la bacteria.

1.4.1 Producción de esporas de *Bacillus* en cultivos en lote

En el cultivo en lote, todos los nutrientes se adicionan desde un inicio y la bacteria se inocula en un medio de cultivo promotor del crecimiento. Las concentraciones máximas de células vegetativas y esporas viables alcanzadas por esta estrategia se encuentran en los órdenes de 1×10^9 y 1×10^{10} cel/ml (Luna *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1994; Laloo *et al.*, 2009; Shi y Zhu, 2007; Zhu *et al.*, 2009).

Los medios de cultivo empleados principalmente tienen suplementos de fuentes complejas, tales como extracto de levadura, harina de soya, peptona, triptona, melazas, jarabe líquido de maíz, entre otros (Shi y Zhu, 2007; Luna *et al.*, 2002; Prabakaran *et al.*,

2007; López-y-López y de la Torre, 2005). Estos medios tienen componentes orgánicos muy ricos en carbohidratos, proteínas, aminoácidos libres, vitaminas y factores de crecimiento, que facilitan abiertamente el crecimiento vegetativo de la bacteria. A pesar de su gran valor nutricional, el costo de algunas de estas materias primas es elevado, por lo que suplementar estos procesos con estas fuentes complejas incrementan de manera dramática los costos de las materias primas del proceso; aunque cabe resaltar, que su uso se favorece como parte del tratamiento o reutilización de residuos agroindustriales (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012). Otro inconveniente de las fuentes complejas se relaciona con el control y seguimiento de los cultivos, ya que la gran mayoría de estas fuentes nutricionales, son de origen biológico, por lo cual, el perfil metabólico y genético del microorganismo durante el crecimiento y la esporulación puede variar con el tipo y composición de cada fuente y hasta cada lote de producción por separado (Pierce and Robertson, 1992).

Fisher y Sonenshein (1991) reportan que, para *B. subtilis*, la fuente de carbono preferida es la glucosa. No obstante, la presencia de glucosa en el medio, además de promover el crecimiento vegetativo de esta bacteria, promueve la generación de otros metabolitos tales como ácido acético, ácido láctico o acetoína, que disminuyen los rendimientos del sustrato en biomasa y adicionalmente pueden ocasionar fenómenos de acidificación e inhibición de crecimiento en altas concentraciones.

Kwon *et al.* (2011) detallaron que el mayor crecimiento vegetativo de *Bacillus subtilis* se da en un intervalo de concentraciones iniciales de glucosa menores a los 10 g/l, y que a concentraciones mayores de 20 g/l el crecimiento se ve disminuido y se promueve la generación de ácidos orgánicos y otros subproductos. Este hecho fue también observado previamente por Park *et al.* (1992) quienes reportaron que a concentraciones de glucosa en el medio de 10 g/l, *Bacillus subtilis* genera ácido láctico, acético y propiónico, que se acumulan en el medio, disminuyendo la viabilidad del cultivo e inhibiendo el crecimiento de la bacteria.

Existen reportes en los cuales *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, en exceso de glucosa activan otra vía fermentativa, produciendo 2,3 butanodiol y acetoína (Alam *et al.*, 1989; Dettwiler *et al.*, 1992; Bourne *et al.*, 1992). Concentraciones de acetoína en el medio mayores a 20 g/l han demostrado que reducen la velocidad específica de crecimiento a la mitad en cultivos por lote (Dettwiler *et al.*, 1992).

El proceso de esporulación también puede verse afectado por altas concentraciones de glucosa. Monteiro *et al.* (2005) encontraron que la eficiencia de esporulación se ve afectada cuando los valores de glucosa en el medio inicial se incrementaban a más de 3.5 g/l. Este comportamiento soporta la represión catabólica de la esporulación postulada por Schaeffer *et al.* (1965).

En cultivos por lote, la mayor concentración alcanzada en cepas de *Bacillus subtilis* es de 1.56×10^{10} esporas por mililitro (spo/ml) y fue reportada por Chen *et al.* (2009), luego de un extenso estudio de optimización de un medio de cultivo el cual estaba principalmente suplementado por jarabe de maíz, harina de soya y extracto de levadura.

1.4.2 Producción de esporas de *Bacillus* en cultivos en lote alimentado

El cultivo en lote alimentado se emplea como alternativa para evitar altas concentraciones de sustrato en el inicio de la fermentación y los problemas inhibitorios o de producción que estos acarrear. En el lote alimentado se comienza en un cultivo en lote con una concentración baja de sustratos (carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, etc.) y se prolonga a través de una adición continua de nutrientes, de tal manera que se cumpla con la demanda del microorganismo, pero en la que la concentración de nutrientes en el medio pueda mantenerse en valores bajos, no inhibitorios.

Uno de los objetivos del lote alimentado es extender la fase de crecimiento del microorganismo, utilizando diferentes perfiles de adición y concentraciones de sustrato en la alimentación. Los perfiles de alimentación pueden ser prediseñados, darse en pulsos, a una tasa de adición a flujo constante, en escalón o incrementándolo exponencialmente. En especial, esta última estrategia de alimentación exponencial se emplea para controlar la velocidad específica de crecimiento de la bacteria en la etapa de alimentación (con el flujo de sustrato que se adiciona), en un proceso que se podría asemejar al del control de la velocidad específica de crecimiento de microorganismos en un quimiostato (Ramírez *et al.*, 1994).

Los perfiles de alimentación pueden ser retroalimentados, relacionando el flujo de alimentación con variables que pueden ser monitoreadas durante el proceso, como el pH (Takahiro *et al.*, 1990), el oxígeno disuelto (Akesson *et al.*, 1999), el coeficiente de

respiración del microorganismo (Jong *et al.*, 1995), o la concentración de glucosa en el medio (Park *et al.*, 1992).

Un ejemplo de las ventajas del cultivo en lote alimentado se encuentra reportada por Martínez (1996). Este autor, usando cultivos alimentados exponencialmente, logró un incremento de 6 a 10 veces en la concentración de la biomasa de *B. subtilis* con respecto a la biomasa lograda en cultivo por lote.

En cultivos por lote alimentado de *Bacillus thuringiensis*, Liu *et al.* (1994), utilizando una alimentación escalonada de una solución de glucosa, extracto de levadura, jarabe de maíz y cloruro de calcio, llegaron a altas concentraciones de biomasa total (células vegetativas, esporas, etc.) cercana a 53.7 g/l, y un total de 1.45×10^{10} esporas totales por mililitro. Adicionalmente, en un ensayo en el cual disminuyeron la concentración de glucosa en la solución de alimentación y manteniendo la concentración de los otros nutrientes constante, la cantidad total de biomasa generada fue de 36.4 g/l (dos tercios con respecto al cultivo anterior). Sin embargo, la eficiencia de esporulación de este cultivo fue mayor, alcanzando el doble en la concentración de esporas totales en el medio, 3.9×10^{10} spo/ml (Liu *et al.*, 1994).

Otro caso de alimentación exponencial de glucosa fue utilizado por Monteiro *et al.* (2005). En este escenario, la solución alimentada fue suplementada con caldo nutritivo y glucosa, y les permitió a los autores alcanzar una concentración de células vegetativas de 3.5×10^{10} cel/ml y un número de esporas viables cercanas a 7.4×10^9 spo/ml.

La mayor concentración de células vegetativas reportadas para *Bacillus subtilis* se encuentra en el trabajo de Park *et al.* (1992), en el cual se llevó a cabo un estudio en lote alimentado, con una estrategia de alimentación que le permitía controlar la concentración de glucosa en el medio a valores de 10, 1.0 y 0.2 g/l. Con el experimento desarrollado con 1.0 g/l de glucosa en el medio, se obtuvo una alta concentración de biomasa, cercana a 184 g/L (3.4×10^{11} cel/ml). Sin embargo, la cepa de *B. subtilis* utilizada tenía una mutación en el regulador global de esporulación Spo0A, la cual le impedía generar esporas.

La selección del sustrato limitante es un factor relevante a considerar, ya que este es el motor principal para dar inicio al proceso de esporulación. Generalmente se trabaja con una limitación de la fuente de carbono, aunque de igual manera se puede operar con

limitación por fuente de nitrógeno, fósforo o azufre (Sonenshein, 2000). Cada opción supone un camino distinto por parte del microorganismo para dar comienzo a la esporulación. Se ha reportado que, cuando *B. subtilis* se limita en la fuente de carbono y se mantiene en el medio cloruro de amonio y glutamina, la esporulación se ve reprimida (Bhaduri *et al.*, 1989). De igual manera, bajo condiciones de limitación por carbono la bacteria presenta un comportamiento de lisis celular de hasta un 30 % del total de su población (Martínez, 1996), lo que ocasiona una baja significativa en el rendimiento de células vegetativas totales en esporas, pues se disminuyen las bacterias viables en condiciones de llevar a cabo dicho proceso. Sin embargo, en este mismo trabajo (Martínez 1996) se logró evitar dicho suceso, al adicionar cantidades de carbono que soportaban la demanda de mantenimiento de la bacteria, manteniendo la viabilidad por más tiempo.

La transferencia de oxígeno es otro factor relevante en cultivos de alta densidad celular. Se sabe que conforme se incrementa la densidad celular en un cultivo, las células en crecimiento demandarán una mayor cantidad de oxígeno. En reactores agitados, las condiciones de aireación y agitación del cultivo definirán la capacidad del sistema para cumplir con esta demanda. En cultivos sumergidos se trabaja principalmente en concentraciones de oxígeno superiores a la denominada “tensión de oxígeno disuelto crítica” (TOD_{crit}), la cual representa el valor mínimo necesario de oxígeno disuelto en el medio para que la bacteria no se vea limitada por este sustrato. En cultivos de alta densidad celular desarrollados para bacterias del género *Bacillus* se ha trabajado controlando la tensión de oxígeno disuelto por encima del 10 % de saturación para evitar esta situación (Liu *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1997, Monteiro *et al.*, 2005; Lalloo *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009).

Un estudio de la influencia de la concentración de oxígeno en el medio respecto a la eficiencia de esporulación fue elaborado por Monteiro *et al.* (2005), en el cual se evaluó la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el medio en valores de 10, 30 y 50 % de saturación, encontrando una mejoría en la eficiencia de esporulación a 30 %. Sin embargo, hace falta estudiar la relación de este sustrato con el crecimiento de esta bacteria (concentraciones de oxígeno críticas en crecimiento vegetativo), así como la capacidad del sistema (velocidad de agitación, potencia suministrada y flujo de aire) para proveer la TOD requerida por la bacteria en condiciones de alta densidad celular en los reactores de nivel de banco y piloto.

1.4.3 Producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83

El grupo de investigación del Dr. Enrique Galindo ha trabajado con un medio mineral químicamente definido y de bajo costo, desarrollado originalmente por Martínez *et al.* (1997) y ha sido utilizado en los trabajos de Rodríguez (2005) y Morales (2007) para la producción de esporas de cepas silvestres de *Bacillus subtilis*. Este medio se suplementa con glucosa como sustrato limitante; además contiene sulfato de amonio y sales minerales que promueven la esporulación del medio según Schaeffer *et al.* (1965).

En los trabajos de Rodríguez (2005) y de Morales (2007), el medio fue diseñado con una relación carbono:nitrógeno de 5.5, resultando el sulfato de amonio en exceso. Sin embargo, luego de la esporulación de *B. subtilis* CPA y *B. subtilis* 83 en cultivos por lote, existe un residual de más de un 50 % de este sustrato en el medio de cultivo, que genera además de un mayor gasto de materias primas en el proceso, una posible condición adversa en la esporulación de la bacteria, debido a la concentración remanente de iones amonio, según lo que proponen otros autores (Bhaduri *et al.*, 1989). Es necesario realizar un rediseño del mismo, con base en las demandas nutricionales y cinéticas específicas para la cepa *B. subtilis* 83, que se espera mejore los rendimientos de sustrato en biomasa, controlar la tasa de crecimiento bacteriano y promover una alta eficiencia de esporulación luego de la limitación por sustrato.

Morales (2007) desarrolló un proceso para la producción de altas concentraciones de esporas de *B. subtilis* 83 en lote alimentado. En ese estudio se reporta una concentración de esporas viables de *B. subtilis* de 7.2×10^{10} spo/ml, con una eficiencia de esporulación de 0.86 spo/cel. Esta concentración alcanzada se encuentra en el orden de la máxima concentración reportada en la literatura (1.52×10^{10} spo/ml reportada por Chen *et al.*, (2009)). Estos resultados demuestran que es posible lograr altas concentraciones celulares con medios definidos y sin fuentes complejas. Sin embargo, los rendimientos de sustrato en biomasa son bajos. Los valores reportados para este parámetro, 0.3 g/g de glucosa, son inferiores en 50 % de aquellos habituales para cepas de *Bacillus* (0.6 g/g de glucosa; (Liu *et al.*, 1994)). En este sentido, la cuantificación de metabolitos generados permitirán esclarecer los flujos de carbono y el comportamiento metabólico de la cepa, e identificar fenómenos como inhibición de crecimiento por sustrato o por subproductos, o sobreflujo de carbono que permitan incrementar los rendimientos.

En función de lo anterior, es evidente que el proceso desarrollado por Morales (2007) podría mejorarse en términos de las condiciones de cultivo si se conocen a fondo los requerimientos nutricionales (carbono, nitrógeno, oxígeno, etc.), el comportamiento cinético y metabólico de la bacteria (generación de ácidos y otros metabolitos), que permitan diseñar con precisión los medios de cultivo inicial y de alimentación, que junto con las estrategias del lote alimentado (evitando acumulación de sustratos) y de esporulación, permitan obtener mayores rendimientos y densidades de células vegetativas así como una alta eficiencia de formación de esporulación (con alta viabilidad) para la cepa en cuestión.

2 HIPÓTESIS

En cultivos en lote alimentado prediseñados, evitando la acumulación de la fuente de carbono y de nitrógeno en el medio, se alcanzarán mayores rendimientos en células vegetativas para su posterior esporulación, con respecto al cultivo en lote, incrementando la concentración de esporas viables y productividad, minimizando la síntesis y acumulación de subproductos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar estrategias de crecimiento vegetativo de *Bacillus subtilis* 83 en lote alimentado para la obtención de alta densidad de esporas viables en medios definidos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los requerimientos nutricionales de *Bacillus subtilis* 83, su cinética de crecimiento y su composición elemental.
- Rediseñar el medio de cultivo para incrementar el rendimiento de la fuente de carbono en células vegetativas y minimizar sustratos residuales.
- Evaluar la influencia de la tensión de oxígeno disuelto en el crecimiento vegetativo en cultivos por lote y lote alimentado.
- Establecer estrategias de cultivo por lote alimentado, valorando diferentes perfiles de alimentación de sustratos (exponencial, constante y mixto) que logren altos rendimientos de sustrato y alta densidad de células vegetativas para su posterior esporulación.

4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se esquematiza en el diagrama de flujo ilustrado en la Figura 4-1. Primero, se realizó el estudio cinético partiendo como base del medio mineral de Martínez *et al.* (1997), en el cultivo en lote, al cual se le llamó medio mineral estándar. Esto se llevó a cabo con el fin de medir y conocer la velocidad específica de crecimiento de la bacteria, las concentraciones de células vegetativas y esporas alcanzadas en lote y los rendimientos respectivos para los diferentes sustratos de *Bacillus subtilis* 83. Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de composición elemental para la cepa en cuestión, con el fin de establecer la cantidad de fuente de carbono y nitrógeno, que debería ser utilizada estequiométricamente en el medio mineral inicial para asegurar la formación de la bacteria sin que existiera limitación de alguno de los sustratos enunciados anteriormente.

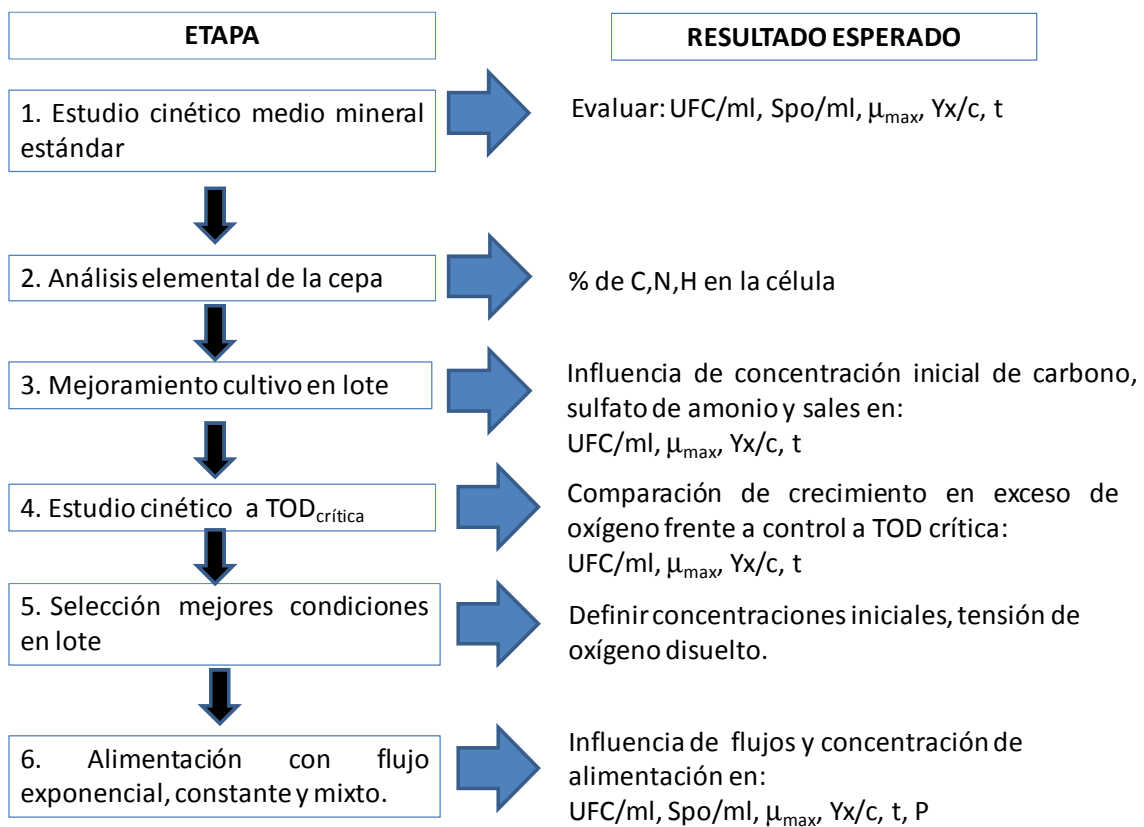


Figura 4-1 Estrategia experimental

Con un diseño experimental se evaluó la influencia de utilizar un medio balanceado estequiométricamente en carbono y nitrógeno, y de las concentraciones iniciales de estos sustratos y de las sales minerales, sobre la concentración máxima de células vegetativas alcanzadas en el lote y sobre los rendimientos de los sustratos utilizados. Para conocer el coeficiente de mantenimiento de la bacteria, se llevó a cabo una fermentación con exceso de fuente de carbono.

Posteriormente, se determinó experimentalmente la tensión de oxígeno disuelto crítica para la bacteria, y se estableció una tensión de oxígeno disuelto mínima, superior a la anterior, que permitiera reproducir los valores de las concentraciones celulares y rendimientos alcanzados en los cultivos en lote sin limitación de oxígeno.

Seleccionando la concentración del medio inicial y la tensión de oxígeno disuelto mínima para el crecimiento de la bacteria, se llevó a cabo el estudio de crecimiento vegetativo y esporulación en los cultivos en lote alimentado. Este se realizó para perfiles de alimentación a flujo exponencial, a flujo constante y un perfil mixto.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Microorganismo

La cepa de *Bacillus subtilis* 83 (Figura 5-1), aislada del follaje de cultivos de mango, fue proporcionada por el Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. (Unidad Culiacán) en forma liofilizada. La cepa fue crecida en medio líquido YPG (extracto de levadura, peptona y glucosa) y conservada en glicerol al 20% (v/v).

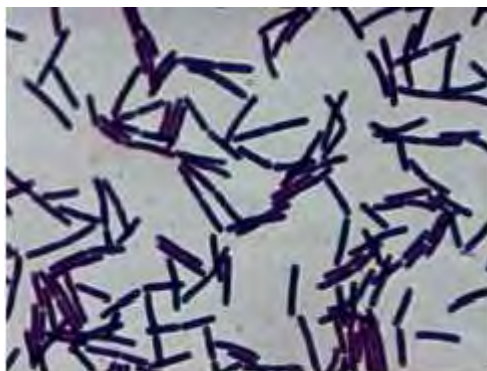


Figura 5-1 *Bacillus subtilis* 83, vista al microscopio (100x).

5.1.2 Composición de medios de cultivo

5.1.2.1 Medio sólido YPG

El medio sólido YPG, fue utilizado para realizar el conteo en placa de células viables, Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml) y de esporas viables (spo/ml). La composición del medio se muestra en la Tabla 5-1:

Tabla 5-1 Composición del medio sólido YPG

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Dextrosa	10
Agar	15

5.1.2.2 Medios líquidos

Se utilizó el medio YPG, para preparación de inóculos y el medio mineral inicial (Martínez *et al.*, 1997) para el crecimiento y producción de células y esporas de *B. subtilis* 83. La composición de los medios se muestran en las Tablas 5-2 y 5-3:

Tabla 5-2 Composición del medio líquido YGP

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Glucosa	10

Tabla 5-3 Composición del medio mineral estándar

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	10.000
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.000
K ₂ HPO ₄	5.320
KH ₂ PO ₄	6.400
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.400
MnCl ₂	0.005
CaCl ₂	0.040
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.030

5.1.2.3 Preparación del medio mineral

Se preparó una solución con el sulfato de amonio y los fosfatos de potasio. Esta solución se ajustó a un pH de 7.2 con NaOH 2N. La solución se esterilizó y se le añadieron, bajo condiciones estériles, las soluciones de glucosa y las sales restantes por separado. Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C por 20 min.

5.1.3 Preparación de inóculos

En primera instancia, se tomaron tres asadas del glicerol, y se estirió en una caja Petri con medio sólido YPG. La caja Petri se incubó a 30°C por 24 h. De la caja Petri se

tomaron 5 asadas de las colonias formadas en un matraz con medio YPG en una relación de 1 % respecto al volumen total, se incubó el(los) matraz (ces) a 30°C y 200 rpm por 12 h. A continuación se transfirió a un nuevo matraz con medio YPG en relación de 10 % respecto al volumen total, y se incubó nuevamente el (los) matraz (ces) en una incubadora a 30°C, a 200 rpm por 12 h hasta alcanzar una concentración igual a 2 densidades ópticas (DO), aproximadamente 1×10^8 cel/ml.

5.1.4 Cultivos en lote fermentador de 7 l

En el fermentador de 7 l se realizó el análisis cinético en lote del crecimiento vegetativo y producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83 en el medio mineral estándar y el seguimiento al crecimiento vegetativo en los medios minerales mejorados.

5.1.4.1 Condiciones de cultivo 7 l

El cultivo en lote se llevó a cabo en biorreactores de 14 l de volumen nominal (New Brunswick Scientific, modelos Labroferm y Microferm, Figura 5-2). Las condiciones de la fermentación fueron:



Figura 5-2 Biorreactor de 14 l

Volumen de trabajo: 7 l

3 turbinas Rushton de 6 paletas ($D/T=0.5$), diámetro de 0.105 m.

Aireación: 1 vvm

Temperatura: 30°C.

36

Agitación: 230 rpm

Control de espuma (Clerol y AF, Dow Corning, al 30 % p/v, controlado por un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica).

Tiempo de fermentación: 24 h.

Se realizó un seguimiento cada 2 h de cultivo. Se determinaron: glucosa residual, amonio residual, producción de ácidos orgánicos, células totales, UFC totales y esporas viables.

5.1.5 Cultivos en matraces de 500 ml

El cultivo en matraces de 500 ml se realizó para la evaluación de crecimiento vegetativo de *B. subtilis* 83 en el medio mineral utilizando 100 ml, bajo las siguientes condiciones:

Volumen de trabajo: 100 ml

Temperatura: 30°C.

Agitación: 200 rpm

Tiempo de fermentación: 5, 8 y 14 h.

Se tomaron muestras al inicio y al final de la fase de crecimiento vegetativo, se determinaron: glucosa residual, amonio residual, células totales y UFC totales.

5.1.6 Cultivo a TOD controlada y en lote alimentado en fermentador de 30 l

Los cultivos se realizaron en un biorreactor de 43 l de volumen nominal (modelo Biostat UD, B. Braun, Figura 5-3). En este reactor se realizaron los estudios de tensión de oxígeno disuelto y los cultivos alimentados.



Figura 5-3 Biorreactor de 30 l

5.1.6.1 Condiciones de cultivo en el fermentador de 30 l

Volumen de trabajo: 14 – 20 l

3 turbinas Rushton de 6 paletas ($D/T=0.5$), diámetro de 0.105 m.

Aireación: 1 vvm

Temperatura: 30°C.

Agitación: entre 100 y 800 rpm

Control de espuma (Clerol y AF, Dow Corning, al 30 % p/v, controlado por un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica).

Tiempo de fermentación: 24 h (lote) y 60 h aprox. (lote alimentado).

Se realizó un seguimiento periódico durante el cultivo. Se determinaron: glucosa residual, amonio residual, producción de ácidos orgánicos, acetoína y 2,3-butanodiol, células totales, UFC totales y esporas viables.

5.1.6.2 Perfiles de alimentación exponencial

La alimentación exponencial es utilizada con el fin de controlar la velocidad específica de crecimiento en la etapa de alimentación, y el modelo de crecimiento está dado por el siguiente balance de masa:

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu VX \quad \text{Ec.1}$$

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_0 - \frac{\mu(VX)}{Y_{x/s}} \quad \text{Ec.2}$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{Ec.3}$$

$$F = \frac{\mu(VX)}{S_0 Y_{x/s}} \quad \text{Ec.4}$$

Donde V: volumen de fermentación, X: concentración celular, μ : velocidad específica de crecimiento, F: Flujo de alimentación, S: concentración de sustrato en el medio, S_0 : concentración de sustrato en la alimentación. $Y_{x/s}$: rendimiento de sustrato en células y t: tiempo. Si se considera el caso donde μ es constante y se puede controlar, dado un $t=0$ al inicio de la alimentación, entonces $V=V_0$ y $X=X_0$ (volumen y concentración celular al inicio de la alimentación), la ecuación puede ser integrada y escrita:

$$XV = V_0 X_0 \exp(\mu t) \quad \text{Ec.5}$$

Asumiendo un estado pseudoestacionario para la concentración de sustrato $\frac{d(VS)}{dt} = 0$, y si se asume que $Y_{x/s}$ es constante en el tiempo, se obtiene reemplazando la Ec. 5 en la Ec 4.:

$$F = \frac{\mu(V_0 X_0) \exp(\mu t)}{S_0 Y_{x/s}} \quad \text{Ec.6}$$

La adición del medio de cultivo se realizó con una bomba peristáltica de precisión Masterflex L/S Modelo 7518-10, conectada a un controlador de PLC con el cual se prediseñaron los flujos según el perfil exponencial que se requería.

5.2 Métodos analíticos

5.2.1 Glucosa residual

Las células bacterianas se separaron del caldo de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5ml utilizando una centrifuga Eppendorf, modelo 5417C a 12000 rpm durante 10 min. En el sobrenadante se determinó la glucosa residual en un analizador Yellow Spring Instruments (YSI). El método 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, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es cuantificado y es proporcional a la concentración de glucosa.

5.2.2 Amonio residual

La cuantificación de amonio se basa en el método de Indofenol (Kaplan, 1969). En esta técnica, el amonio reacciona con hipoclorito de sodio, formándose la cloramina. Posteriormente, la cloramina reacciona con fenol para formar el cromógeno p-hidroxifeniliminobenzoquinona, el cual se cuantifica colorimétricamente a 635 nm.

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

- Preparar 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).
- Preparar estándares a concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mM de sulfato de amonio a partir de una solución 6 mM.
- Adicionar 1 ml de la solución A en un tubo de 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 reacción de la mezcla es de 30 minutos. Leer 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 los mínimos cuadrados.

- Obtener la pendiente y ordenada en el origen para calcular las concentraciones de amonio de las muestras problema. La curva de calibración se muestra en el Anexo A.

5.2.3 Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Cuenta en Placa

- Se realizaron diluciones de la muestra (caldo de fermentación) en tubos de vidrio de 13 x 150 mm que contenían solución salina al 0.9 % de NaCl y 0.05 % de Tween 40.
- Se tomaron 0.1 ml de las soluciones y se colocaron en cajas Petri con medio YPG y agar. La muestra se homogenizó con perlas de vidrio sobre la superficie de la caja.
- Las cajas Petri inoculadas se incubaron durante 48h a 30°C y se revisaron a las 24 y 48 h de incubación. Para obtener la concentración se utilizó la siguiente relación:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{UFC \text{ en placa}}{Volumen \text{ adicionado}} * \text{Factor de dilución} \quad \text{Ec. 7}$$

El error experimental de esta técnica fue del 30 %, su determinación se detalla en el Anexo B.

5.2.4 Cuantificación de esporas. Choque térmico y siembra en placa

Las diluciones del caldo de fermentación se sometieron a un tratamiento térmico a 85°C durante 15 min para eliminar las células vegetativas del cultivo (Rodríguez, 2005):

- Se introdujeron las diluciones del caldo de fermentación en un baño con agua a 85°C durante 15 min.
- Se tomaron 0.1 ml de las soluciones y se colocaron en cajas Petri con medio YPG y agar. La muestra se homogenizó con perlas de vidrio sobre la superficie de la caja.

- Las cajas Petri inoculadas se incubaron durante 48 h a 30°C y se revisan a las 24 y 48 h de incubación. Para obtener la concentración se utilizó la siguiente relación:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{UFC \text{ en placa}}{\text{Volumen adicionado}} * \text{Factor de dilución} \quad \text{Ec. 8}$$

El error experimental de esta técnica es del 30 %. Su determinación se detalla en el Anexo B.

5.2.5 Conteo de células totales mediante conteo directo.

La cuantificación de células totales de *B. subtilis* (sin distinción entre células vegetativas viables y no viables; y esporas, viables y no viables) se llevó a cabo mediante conteo directo al microscopio, utilizando la cámara de Neubauer, según la técnica de Morales (2007).

La Figura 5-4 ilustra la cámara de Neubauer. Esta consta de cuatro canales longitudinales y uno transversal. En los espacios limitados por los canales longitudinales del centro y canal transversal se encuentra grabada una rejilla de 9 mm²; esta rejilla consta de 9 cuadrantes cada de uno de 1 mm². El cuadrante central (que para los propósitos de este trabajo es el de interés), se subdivide a su vez en 25 cuadrantes más cada uno con un área de 0.04 mm².

El cubre objetos de la cámara de Neubauer es sensiblemente más grueso que los cubre objetos tradicionales; cuando este se coloca sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0.1 mm, de forma tal que el volumen total encerrado por cada uno de los 25 cuadrantes centrales es de 0.004 mm³.

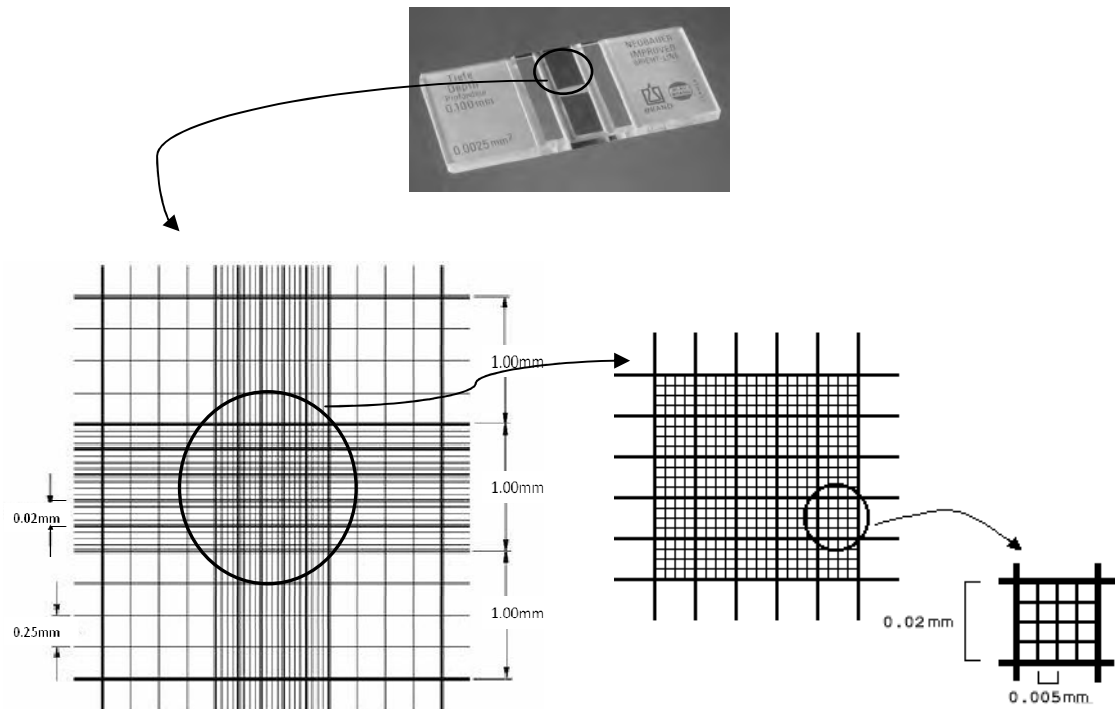


Figura 5-4 Método de conteo en cámara de Neubauer

La muestra homogénea (100 μ l) se coloca en el centro de la cámara y se coloca el cubre objetos. Se ubica la cámara de Neubauer sobre el microscopio y se enfoca con el objetivo de 10x. Posteriormente se localiza el cuadro central de la rejilla (aquel que contiene los 25 cuadrantes de 0.004 mm²), se realiza el cambio del objetivo a 40x y se realiza un acoplamiento a un sistema de cómputo y adquisición de imágenes, el cual permite amplificar y digitalizar la imagen de la cámara de Neubauer. La adquisición de la imagen se realiza con el software *Image Pro Plus 4.1* (Media Cybernetics, MS, U.S.). Cabe señalar que se hace necesario este acoplamiento para realizar la cuenta de células, debido al pequeño tamaño de la bacteria (entre 2 y 0.5 μ m aproximadamente). Finalmente se realiza el conteo celular y la concentración se puede calcular con la siguiente relación:

$$\frac{\text{cel}}{\text{ml}} = \frac{\text{células contada en cuadrante}}{0.004 \text{ mm}^3 / 1000} * \text{Factor de dilución} \quad \text{Ec.9}$$

5.2.6 Determinación de ácidos orgánicos por HPLC

La concentración de acetato, lactato, piruvato, succinato, acetoína y 2,3-butanodiol, fue determinada mediante análisis de HPLC (Bio-Rad, 1994). Se utilizó un módulo de separación marca Waters serie 2695, equipado con una columna para análisis de ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (7.8x300 mm) empacada con una resina de estireno-divinilbenceno. La elución se realizó con ácido sulfúrico 10 mM, a una tasa de dilución de 0.6 ml/min y una temperatura de la columna de 40°C.

La detección de los compuestos se llevó a cabo con un detector de arreglo de diodos marca Waters, serie 2996, y un detector de índice de refracción marca Waters serie 2414 trabajando a una longitud de onda de 210 nm. Las curvas de calibración de los compuestos analizados se presentan en el Anexo C.

5.2.7 Análisis elemental de la célula vegetativa

El análisis elemental de la bacteria se llevó a cabo para la determinación de carbono, nitrógeno e hidrógeno. La determinación se basa en la combustión catalítica de la muestra, la separación de los gases de combustión y su detección por conductividad térmica. Este análisis se llevo a cabo en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en un equipo marca Elementar Analysensysteme GmbH, Vario EL III Elementar Analyzer.

5.2.8 Determinación preliminar de la tensión de oxígeno disuelto crítica (TOD_{crit})

La tensión de oxígeno disuelto crítica (TOD_{crit}) se cuantificó por la técnica de eliminación de gas y se realizó de la siguiente manera (Yu *et al.*, 2002):

- Encontrándose ya en la fase exponencial de crecimiento y con ayuda de un electrodo para la medición de oxígeno disuelto, se suspende la alimentación de aire al biorreactor.
- Se toman las lecturas de oxígeno disuelto, hasta que la concentración en el medio de fermentación no varíe significativamente.

- Posteriormente se grafica el perfil de tensión de oxígeno disuelto contra el tiempo y se ubica la tensión a la cual el valor de la pendiente de la recta cambia. Dicho cambio corresponde a la tensión de oxígeno disuelto crítica.

5.2.9 Bioensayos de antagonismo *in vitro*

Se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* tomando como modelo de estudio el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 5-5). Los experimentos se realizaron por triplicado. En estas pruebas se evaluó el efecto antagónico de los metabolitos producidos por *Bacillus subtilis* 83, según lo establecido por Rodríguez (2005):

- Las células bacterianas se separaron del caldo de cultivo en una centrífuga Eppendorf, modelo 5417C a 12000 rpm durante 10 min.
- El sobrenadante de caldo de cultivo fue filtrado en membranas de 0.22 μm de diámetro de poro, con el fin de separar el paquete celular remanente de los metabolitos producidos.
- Se depositaron 50 μl de la muestra de sobrenadante (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 orificios equidistantes se depositaron 50 μl de agua destilada estéril como testigo (B).
- *Colletotrichum gloeosporioides* se inoculó en el centro de la caja Petri en forma de explante de 5 mm de diámetro de medio PDA con micelio de hongo previamente crecido durante 6 días (C).
- Las cajas se incubaron a 30°C por 6 días y se comparó el diámetro de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* en el área de la caja Petri, en presencia del tratamiento y el testigo para obtener un porcentaje de inhibición según la ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \% - X \% \quad \text{Ec.10}$$

Donde X, es la relación del diámetro de crecimiento del hongo en el eje de A sobre el diámetro de crecimiento del hongo en el eje de B.

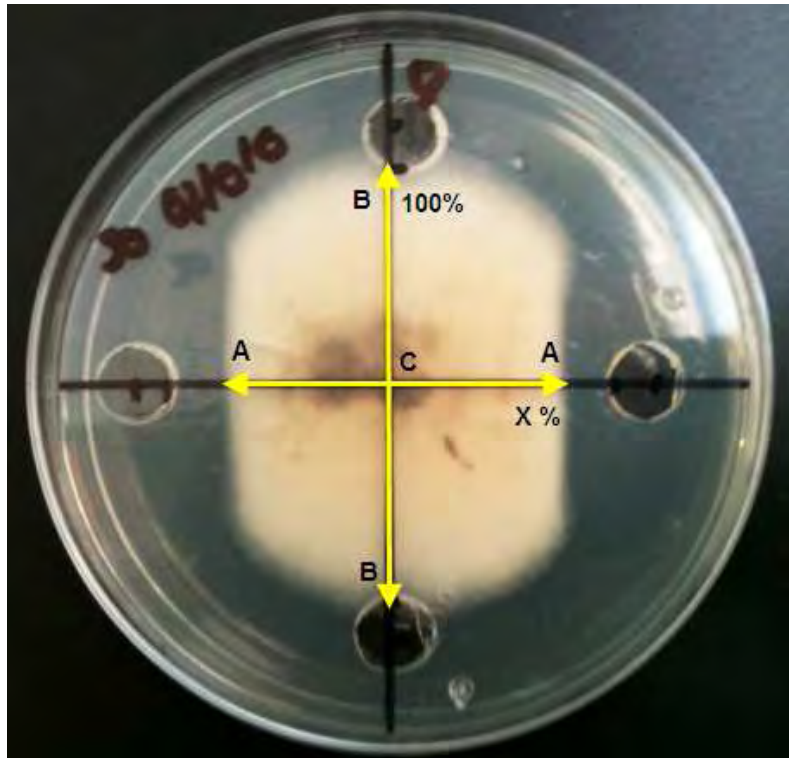


Figura 5-5 Esquema de bioensayo con *C. gloeosporioides*.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cinética de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83 en medio mineral estándar en cultivos por lote.

Se realizó el cultivo en lote de *B. subtilis* 83, en biorreactores con un volumen de trabajo de 7L, utilizando un medio mineral suplementado con glucosa, a las concentraciones establecidas en la sección 5.1.2.2. El seguimiento se llevó a cabo por 24 h, tomándose muestra del caldo de cultivo periódicamente. La Figura 6-1, muestra el seguimiento al crecimiento bacteriano total, vegetativo y la esporulación de *B. subtilis* 83, así como la evolución de nutrientes, productos, TOD, y pH.

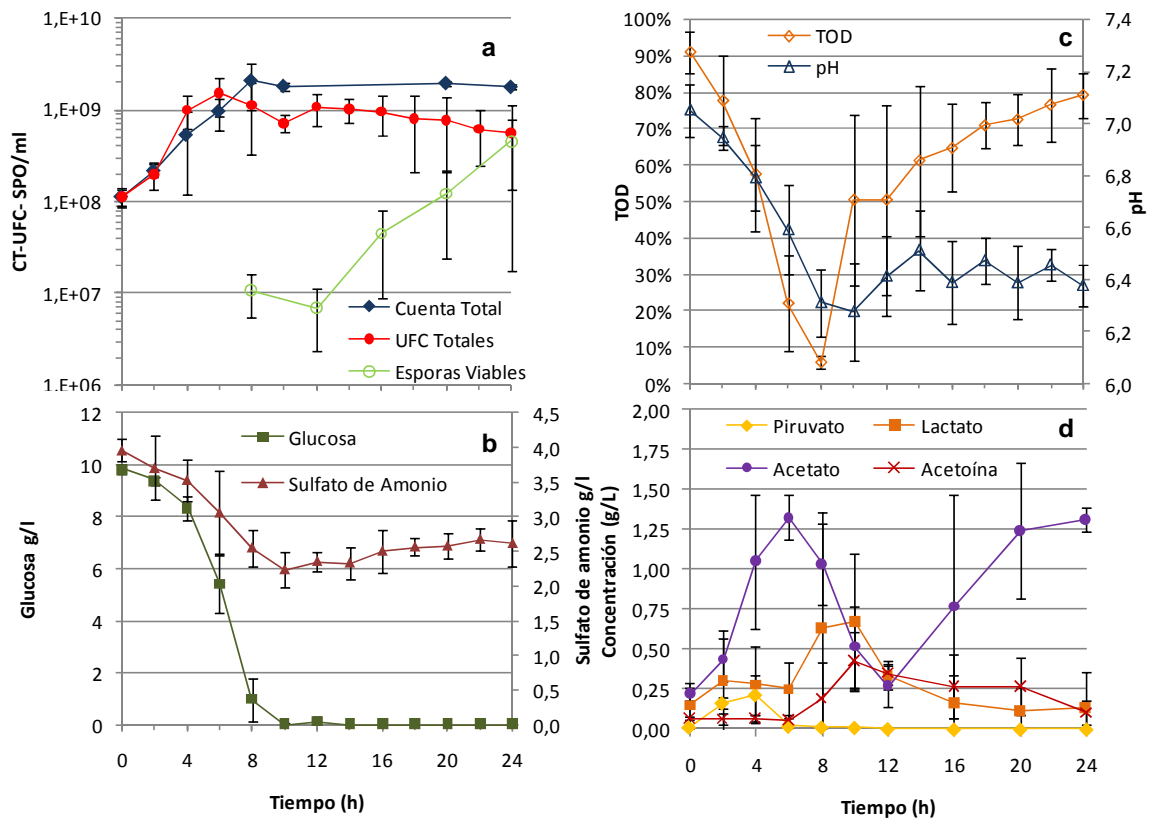


Figura 6-1 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* 83 en medio mineral durante cultivo en lote biorreactor de 7 l, las barras de error indican la desviación estándar de los parámetros medidos.

Se inoculó el reactor con una concentración inicial aproximada de 1×10^8 cel/ml. La fase exponencial de crecimiento se dió entre las 0 y 6 h, el consumo total de glucosa como sustrato limitante se presenta entre las 8 y las 10 h (ver panel b, Figura 6-1). La concentración máxima de células vegetativas lograda en la fase exponencial de crecimiento, alcanzó valores de 1.5×10^9 UFC/ml. Posteriormente, se presentó una

etapa de transición, evidenciada por un descenso de la viabilidad de las células en el medio de cultivo de hasta un 60% (entre las 10 y 12 horas panel a, Figura 6-1). Se evidenció un incremento en la concentración de esporas viables a partir de las 12 h. Finalmente a la hora 24, la composición de UFC en el medio de cultivo correspondía principalmente a esporas viables.

En el panel a, de la Figura 6-1, se evidencia que la concentración de esporas viables al final de la fermentación fue de 0.45×10^9 spo/ml. Esta corresponde a una eficiencia de esporulación de 29 %, medida en relación al mayor número de células vegetativas en el cultivo (1.5×10^9 UFC/ml) alcanzadas a las 6h de fermentación.

El sulfato de amonio consumido en el proceso fue de 1.7 g/l lo que es igual a un 42.5 % del total adicionado al medio mineral. La concentración de este sustrato se incrementa ligeramente en el medio durante la fase estacionaria y de esporulación, pasando de 2.24 g/l a las 10 h a 2.64 g/l a las 24 h (panel b, Figura 6-1). Es posible que esto ocurra por el amonio liberado al medio debido a la degradación de proteínas y enzimas, por acción de las proteasas de la bacteria (Schultz *et al.*, 2009).

Las concentraciones de células vegetativas logradas durante la fase exponencial del lote, 1.5×10^9 UFC/ml, pueden ser comparadas con los trabajos de Morales (2007) y Rodríguez (2005), donde se produjeron 1.2×10^9 UFC/ml y 0.7×10^9 UFC/ml, respectivamente. Además, en el trabajo de Rodríguez (2005), la concentración de esporas viables alcanzadas a las 24 h de cultivo fue de 0.5×10^9 spo/ml, un resultado similar a los 0.45×10^9 spo/ml del proceso que aquí se reporta.

El descenso de pH y de la tensión de oxígeno disuelto se dio proporcionalmente al crecimiento vegetativo. Este comportamiento (panel c, Figura 6-1) concuerda con lo reportado por Nakata y Halvorson (1960) quienes mencionan que las especies del género *Bacillus*, en presencia de glucosa, disminuyen el pH como resultado de la producción de ácidos orgánicos como el piruvato y el acetato. Como se observa en el panel d, de la Figura 6-1, durante las primeras 8 h de fermentación se presenta la generación de piruvato, lactato, acetato y acetoína. El ácido pirúvico se sintetiza y se excreta al medio durante las primeras 4 h de fermentación, posteriormente se reintegra a la célula llegando a valores prácticamente de cero a las 6 h. Se sabe que algunas especies del género *Bacillus* sp. producen ácido pirúvico al inicio de la etapa de crecimiento exponencial (Tännler *et al.*, 2008). Su acumulación posiblemente puede

asociarse a un “pool” de alto valor energético en la célula, que puede ser utilizado posteriormente como sustrato de las principales vías metabólicas, tales como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o la producción de ácido acético, ácido láctico y acetoína.

Como puede observarse en la figura 6-1 (panel c), el pH presentó un mínimo en 10 h de cultivo ($\text{pH}=6.28 \pm 0.19$), momento que correspondió al máximo pico de ácido láctico, 0.7 ± 0.4 g/l (panel D, Figura 6-1) y al agotamiento de la glucosa (panel b, Figura 6-1). Luego de las 10 h, el pH en el medio se incrementa de ligeramente hasta 6.4 ± 0.1 . La generación de acetoína está relacionada con el crecimiento de la bacteria y su concentración se incrementa continuamente hasta el agotamiento de la fuente de carbono, y a partir de ahí, su concentración disminuye, posiblemente debido a que este metabolito es reutilizado por la bacteria. El aumento de la concentración de ácido acético puede esperarse como un subproducto, debido al consumo de otros metabolitos del medio de cultivo, como el ácido láctico, la acetoína y/o otros subproductos como acetoacetato o el acetilbutanodiol según lo reportado por López y Fortnagel (1972).

El cultivo en lote estudiado se llevó a cabo bajo condiciones de agitación de 230 rpm y una velocidad de aireación de 1 vvm. Para efectos de este trabajo, estas condiciones del cultivo en lote no aseguran un suministro no limitante de oxígeno al sistema. A pesar que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) no desciende a valores cercanos a cero durante la etapa de crecimiento exponencial, entre la 0 y 6h (TOD $22.1 \pm 13.1\%$), alcanza un valor menor a 10% entre la 7h y 8 h de cultivo, lapso en el cual no hay un incremento en la concentración de células vegetativas, debido a que posiblemente el oxígeno posiblemente fue limitante (ver sección 6.4). Con el fin de la fuente de carbono, la tensión de oxígeno disuelto se incrementa a valores cercanos a $50 \pm 23 \%$ a las 10 h, indicando el inicio de la fase estacionaria (panel c, Figura 6-1). La cantidad de oxígeno disuelto en el medio continúa en aumento durante la fase de esporulación, llegando a valores de $80 \pm 6.1 \%$ a las 24h de este proceso, momento en el cual la concentración de esporas es máxima y su presencia no demanda este sustrato.

La velocidad específica de crecimiento máxima para esta cepa fue de $0.45 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$. Este valor es similar al valor reportado por Martínez (1996) (0.4 h^{-1}), para otra cepa de *B. subtilis* creciendo en este medio mineral.

Los parámetros del crecimiento bacteriano vegetativo y generación de esporas en el cultivo en lote en medio mineral se resumen en la Tabla 6-1.

Tabla 6-1 Parámetros de fermentación en cultivo en lote de *B. subtilis* en medio mineral

Parámetro	Unidades	Valor
UFC máximas	UFC/ml x 10 ⁹	1.50 (± 0.6)
Esporas viables máximas	Spo/ml x 10 ⁹	0.45 (± 0.31)
Y _{UFC/gglucosa}	UFC/g x 10 ¹¹	1.50 (± 0.6)
Y _{Spo/gglucosa}	Spo/g x 10 ¹¹	0.45 (±0.31)
Productividad de UFC	UFC/lh x 10 ¹¹	2.50 (± 1.0)
Productividad de esporas	Spo/lh x 10 ¹¹	0.19 (±0.12)
μ	h ⁻¹	0.45 (±0.03)

6.2 Análisis elemental de la cepa *Bacillus subtilis* 83.

El análisis elemental permite determinar el contenido total de carbono, hidrógeno y nitrógeno presente en una muestra. Este análisis se realizó en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y los resultados arrojados se resumen en la Tabla 6.2.

Tabla 6-2 Análisis elemental de células vegetativas de *Bacillus subtilis* 83.

Componente	% Peso	Relación Molar
C	43.2	1.00
H	6.6	1.82
N	10.7	0.21

Conociendo la composición elemental de *B. subtilis* 83, se calculó el rendimiento de glucosa en biomasa (células totales), bajo la suposición de que todo el nitrógeno consumido es utilizado para la generación de biomasa al final de la fase exponencial, momento en el cual se presenta la mayor cuenta bacteriana total. En la figura 6-1 (panel b) se observa que la cantidad de fuente de nitrógeno consumida hasta ese momento fue de 1.7 g de sulfato de amonio, por lo que se puede calcular el peso total de biomasa generada realizando un balance de materia para el elemento nitrógeno. Los resultados se resumen en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3 Biomasa generada en el cultivo en lote

Compuesto	Inicial g/l	Consumida g/l	Residual g/l
Glucosa	10.0	10.0	0.0
S. Amonio	4.0	1.7	2.3
Biomasa	0.0	0.0	3.3

De la tabla anterior se calcula el rendimiento experimental del proceso:

$$Y_{x/s} = 0.33 \frac{\text{biomasa}}{\text{gGlucosa}} \text{ o } Y_{x/s} = \frac{2.05 \times 10^{11} \text{ cel}}{\text{gGlucosa}}$$

Estos valores de rendimientos celulares serán utilizados como variables para calcular los flujos de los perfiles alimentados exponencialmente en los cultivos alimentados.

6.3 Mejoramiento del medio mineral

Conociendo la relación estequiométrica de carbono-nitrógeno necesaria para el crecimiento del microorganismo, se implementó un diseño experimental que evaluó la influencia de la concentración de glucosa, sulfato de amonio y las sales minerales, sobre la máxima concentración de células vegetativas viables, durante la fase de crecimiento exponencial en lote. El estudio consistió de dos etapas, una primera de tamizado, llevada a cabo en matraces y la segunda de escalamiento de los mejores puntos del diseño en un reactor de 7 l.

6.3.1 Diseño experimental

Para evaluar la influencia de las concentraciones iniciales de glucosa, sulfato de amonio y sales minerales sobre el crecimiento vegetativo y la viabilidad en la fase exponencial del cultivo en lote, se elaboró un diseño experimental 2^3 , con tres factores (glucosa, sulfato de amonio y sales) a tres niveles (inferior, centro y superior). El punto al centro corresponde al medio mineral balanceado estequiométricamente en carbono y nitrógeno, con base en el balance de materiales de la sección 6.2. En la Tabla 6-4 se muestran los niveles y las concentraciones sustratos (factores) a evaluar y el diseño experimental, que consistió en 8 experimentos realizados por duplicado y un punto al centro por triplicado, se esquematiza en la Figura 6-2.

Tabla 6-4 Niveles de evaluación de los factores del diseño experimental.

Factores		Niveles de evaluación		
		Inferior (-)	Centro (0)	Superior (+)
A. Glucosa (g/l)		5.000	10.00	15.00
B. (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)		1.000	1.700	2.400
C. Sales (g/l)	K ₂ HPO ₄	2.660	5,320	7.980
	KH ₂ PO ₄	3.200	6.400	9.600
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.200	0.400	0.600
	MnCl ₂	0.0025	0.005	0.010
	CaCl ₂	0.0020	0.040	0.060
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.015	0.030	0.045

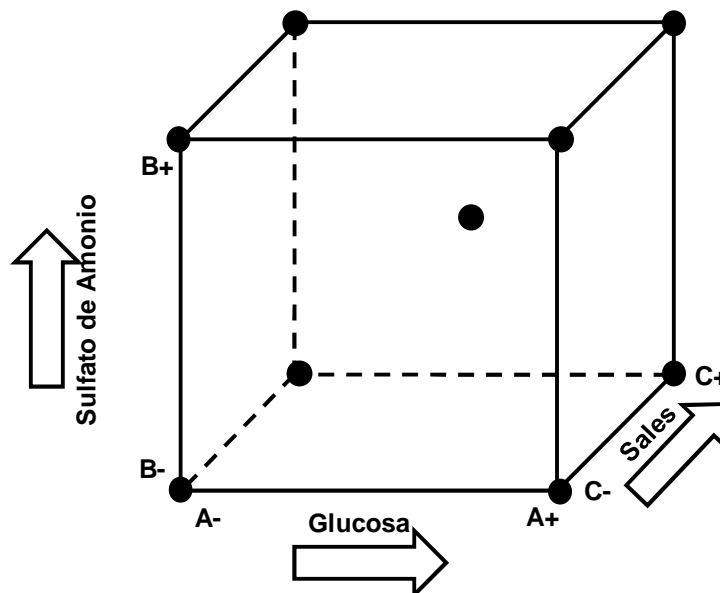


Figura 6-2 Esquema del Diseño experimental 2³.

Los resultados del diseño experimental se analizaron con ayuda el software *Design Expert 5.0.7* (Stat Ease Inc., MN, U.S.). Los resultados del análisis de varianza ANOVA, muestran que los modelos experimentales lineales no se ajustaron a los resultados, sin embargo, fue posible determinar, con un peso estadístico, aquellos factores más influyentes en cada una de las variables de respuesta (Ver Anexo D).

En la Figura 6-3 se presentan los resultados respecto a la máxima concentración de células vegetativas viables al final de la fase exponencial y los datos de viabilidad de la población bacteriana, medidas como la relación de células viables a células totales.

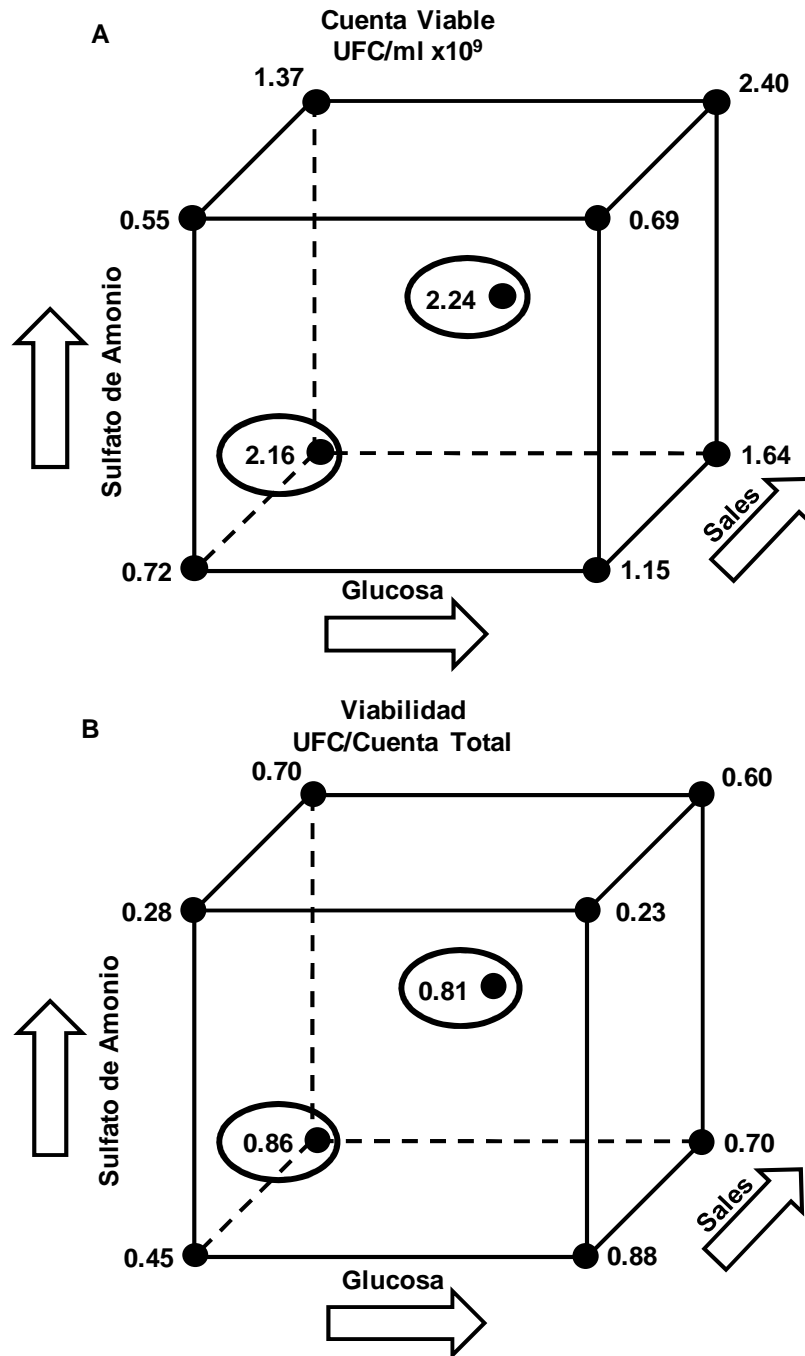


Figura 6-3 Resultados diseño experimental. A. Concentración de UFC máxima; B. Viabilidad: UFC/Cuenta Total. Se resaltan los puntos donde se obtuvieron los mejores resultados en ambos parámetros estudiados.

En el modelo experimental de cuenta viable, el factor positivo con mayor influencia fue la concentración de sales en el medio; es decir, un incremento de la concentración de las sales (por lo menos dentro del rango estudiado), permitiría maximizar la concentración de unidades formadoras de colonia en la fase exponencial de crecimiento. El valor más alto de la concentración de células viables se obtuvo en el

punto en el cual todos los factores se encontraban a su mayor concentración $2.4 \pm 0.3 \times 10^9$ UFC/ml (ver panel A, Figura 6-3). Sin embargo, al analizar los resultados se observa, que se presenta un ligero incremento en la concentración de células viables del 10 %, con respecto al punto central aunque el aumento en la concentración de la fuente de carbono fue de 1.5 veces. Esto significa que a pesar de que se genera una mayor biomasa, el rendimiento de los sustratos en células vegetativas viables disminuyó.

En el modelo de viabilidad bacteriana, los resultados permiten establecer que un aumento de la concentración de sulfato de amonio (sustrato en exceso) generó una disminución de la viabilidad al final de la fase exponencial. Sin embargo, un incremento de la concentración del resto de sales, parece contrarrestar este efecto de disminución de células viables (ver panel B, Figura 6-3). Esto concuerda con un comportamiento reportado por Svarachorn *et al.* (1989) en el cual la presencia de cationes monovalentes (K^+ , NH_4^+) induce la autólisis de *B. subtilis* y que a su vez este efecto es contrarrestado por cationes divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}).

Del análisis anterior, se seleccionaron las condiciones que permitieran mejorar el proceso en cuanto a la concentración de células vegetativas y la viabilidad de las células totales en el medio de cultivo. Estos resultados se resaltan en la figura 6-3 y fueron seleccionados para realizar un escalamiento a reactores de 7 l.

6.3.2 Cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83 en medio mineral mejorado.

Se realizaron los cultivos en lote de *Bacillus subtilis* 83, a las dos condiciones seleccionadas en la sección anterior. Estos experimentos se llevaron a cabo en un reactor de 7 l, bajo las condiciones establecidas en la sección 5.1.4.1. Se hizo un seguimiento por 12 h, tomando muestra del caldo de cultivo cada 2 h. Los experimentos se realizaron por duplicado y en la Figura 6-4 se muestra el promedio de los resultados, las barras horizontales denotan el error estándar. En el Anexo E se exponen las gráficas de los duplicados para demostrar la reproducibilidad de los datos. La composición de los medios de cultivo evaluados se describen en la tabla 6.5

Tabla 6-5 Composición de medios de cultivo seleccionados para mejoramiento del lote.

Factores	Medio	
	A	B
Glucosa (g/l)	5.000	10.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	1.000	1.700
Sales (g/l)	K ₂ HPO ₄	7.980
	KH ₂ PO ₄	9.600
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.600
	MnCl ₂	0.010
	CaCl ₂	0.060
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.045
		0.030

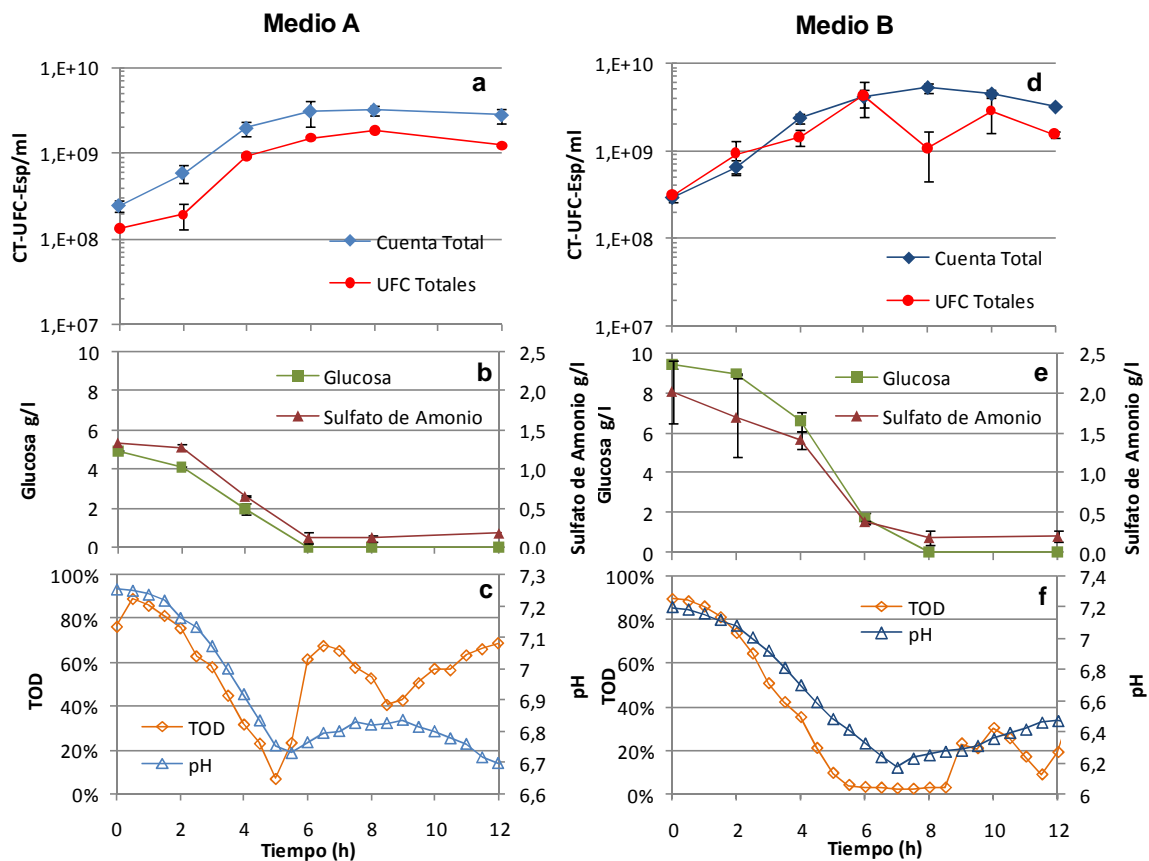


Figura 6-4 Cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83 en medios mejorados en biorreactores de 7l. Izq). Medio A: Glucosa 5 g/l, Sulfato de Amonio 1 g/l, Sales 1.5X; Der). Medio B: Glucosa 10 g/l, Sulfato de Amonio 1.7 g/l, Sales 1X.

Como era de esperarse, la glucosa se consumió completamente entre las 4 y 6 h para el medio que la contiene en 5.0 g/l (panel b, Figura 6-4), frente a un tiempo de consumo de entre 8 y 10 h del cultivo con 10 g/l de glucosa (panel e, Figura 6-4). La velocidad

específica de crecimiento máxima de la bacteria fue muy similar para ambos casos ($0.42 \pm 0.01\text{h}^{-1}$ y $0.42 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$, respectivamente), por lo que se infiere que no hay indicios de inhibición del crecimiento debido a la concentración inicial de los sustratos. Esto concuerda con lo reportado por Monteiro, *et al* (2005) quienes indican que para *Bacillus subtilis*, concentraciones iniciales de glucosa entre 5 y 20 g/l promueven el flujo de carbono principalmente para la producción de biomasa.

La mayor concentración de células vegetativas, se alcanzó en el medio B y fue de 4.4×10^9 UFC/ml a las 6 h de proceso (panel b- Figura 6-4), mientras el medio A alcanzó una concentración de células viables de 1.89×10^9 UFC/ml (8 h) (panel a, Figura 6-4) (ver Tabla 6-6). La concentración de células vegetativas en el medio B fue 2.9 veces mayor a la lograda con el medio mineral estándar (ver sección 6.1) y la concentración alcanzada en el medio A fue igual al medio estándar disminuyendo el consumo de fuente de carbono a la mitad (5.0 g/L) y el de sulfato de amonio a la cuarta parte (1.0 g/l).

Por otro lado en la Figura 6-4 (paneles c y f), se observa la evolución del oxígeno disuelto en el medio. Para ambos casos estudiados, hay un descenso conforme aumenta la concentración celular y así la demanda de este nutriente. El medio B llegó a encontrarse limitado por este sustrato entre las 6 y 8 h, tiempo en el cual la concentración se mantuvo en valores cercanos a cero. Es en este lapso de tiempo en el cual se presentó un descenso significativo en la viabilidad del medio B, por lo cual fue probable que esta limitación afectó directamente el rendimiento de la bacteria durante esta etapa de la fermentación. Para el medio A, el descenso de la tensión de oxígeno disuelto en el medio no alcanzó valores de cero. En este caso, la concentración de células vegetativas viables no se vio disminuida en el cultivo, manteniéndose en valores cercanos a 1.5×10^9 UFC/ml, 6 h después del consumo total de glucosa en el medio.

Tabla 6-6 Parámetros de medios de cultivo en lote

Parámetro	Unidades	Cultivo medio inicial	Medio A	Medio B
UFC máximas	UFC/ml $\times 10^9$	1.53(± 0.45)	1.89(± 0.56)	4.40(± 1.32)
$Y_{\text{UFC/gglucoaa}}$	UFC/g $\times 10^{11}$	1.53(± 0.45)	3.78(± 1.87)	4.40(± 1.32)
Productividad de UFC	UFC/lh $\times 10^{11}$	2.50(± 0.75)	3.15(± 1.86)	7.3(± 2.2)
μ	h^{-1}	0.45(± 0.03)	0.42(± 0.01)	(0.42 ± 0.06)

Con base en estos resultados, se puede afirmar que es posible incrementar en el medio B la concentración de células vegetativas viables alcanzadas en el lote evaluado inicialmente. Ahora es necesario determinar la tensión de oxígeno disuelto a la cual es posible llevar a cabo el crecimiento de la bacteria sin sacrificar los rendimientos alcanzados hasta ahora.

6.4 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83 en medio mineral mejorado bajo condiciones de mínima tensión de oxígeno disuelto

6.4.1 Determinación de la tensión de oxígeno disuelto crítica

El objeto de este ensayo fue encontrar un valor preliminar para llevar a cabo un estudio cinético de la bacteria controlando un mínimo de tensión de oxígeno disuelto, con el fin de asegurar el requerimiento de oxígeno de la célula para evitar un escenario de limitación de este sustrato que afecte el crecimiento vegetativo y el rendimiento celular.

En la Figura 6-5 se presenta la variación de la tensión de oxígeno disuelto (como proporción al valor de saturación) en el medio de cultivo, para tres concentraciones celulares distintas de *B. subtilis* 83 en fase de crecimiento exponencial. En estos experimentos se interrumpió el suministro de aire al fermentador y se observó paulatinamente la disminución en la concentración de este sustrato debido al consumo bacteriano. En un principio la bacteria consumió el oxígeno a una tasa constante, hasta el momento en el cual se presenta un cambio en la actividad metabólica de la célula hacia un metabolismo anaerobio, debido principalmente a la limitación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por la falta de oxígeno (Yu *et al.*, 2002). Este cambio puede evidenciarse como un cambio de pendiente en la gráfica de TOD vs. t (ver Figura 6-5), tomando como de referencia que el coeficiente de correlación de la recta de descenso de TOD no fuese inferior a 0.98.

El valor tentativo de la tensión de oxígeno disuelto crítica está alrededor del 10 %. Este dato concuerda con varios de los valores citados de concentración crítica de oxígeno para bacterias, según lo reportado por Liang *et al.* (2006) para *B. thuringiensis* con TOD críticas entre 18 % y 12 % y lo reportado por Yu *et al.* (2002) para *E. coli* donde las TOD críticas de oxígeno se encuentran entre el 20 % y 5 %.

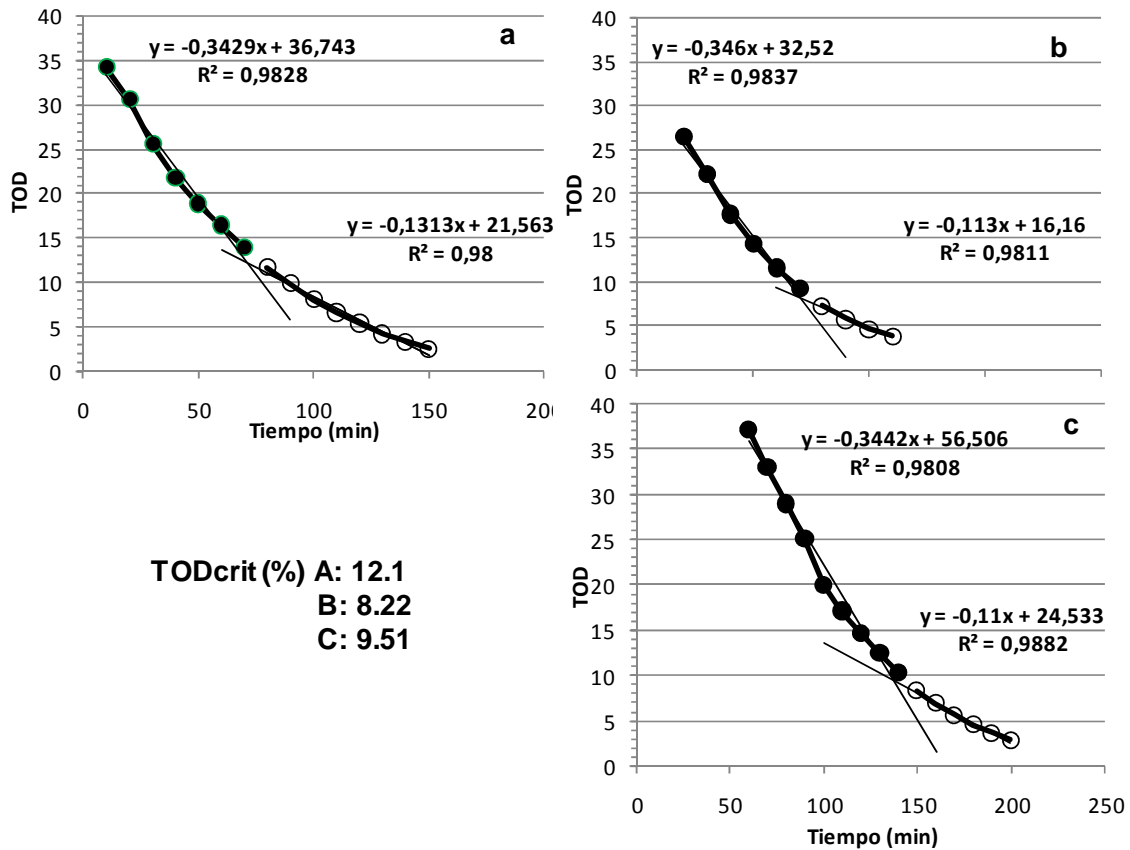


Figura 6-5 Determinación experimental de la tensión de oxígeno disuelto crítica (TOD_{crit}) bajo tres condiciones de concentración celular en el medio de cultivo.

6.5 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* 83 a tensión de oxígeno disuelto mínimo de 10 %

El cultivo en lote de *B. subtilis* 83 se llevó a cabo en un volumen de 20 l, en el biorreactor de 43 l de volumen nominal (modelo Biostat UD, B. Braun). La TOD en el medio se mantiene en un valor constante de 10%, por medio de un controlador en cascada que modifica la velocidad de agitación del impulsor. El objetivo de este ensayo fue identificar una tensión de oxígeno disuelto mínima en el medio que no representara un valor limitante para el crecimiento bacteriano y que no afectara los rendimientos celulares, obtenidos en la sección anterior. El cultivo comenzó con un valor de agitación base de 100 rpm que se fue incrementando para mantener la demanda de oxígeno de la bacteria y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) mínima de 10 %. El medio de cultivo inicial de este ensayo tiene la concentración del Medio A (ver Tabla 6-5). Se realizó seguimiento por 12 h, tomando muestra del caldo de cultivo cada 2 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y en la Figura 6-6 se muestra el promedio de los resultados y

la comparación con el cultivo base. En el Anexo E se incluyeron las tres réplicas de los triplicados para demostrar la reproducibilidad de los datos.

En la Figura 6-6 se presenta la cinética de crecimiento de *B. subtilis* 83 a TOD_{\min} de 10%, comparada con la cinética de crecimiento de la bacteria en el Medio A presentada en la sección anterior, que para efectos de este estudio fue un escenario de exceso de oxígeno.

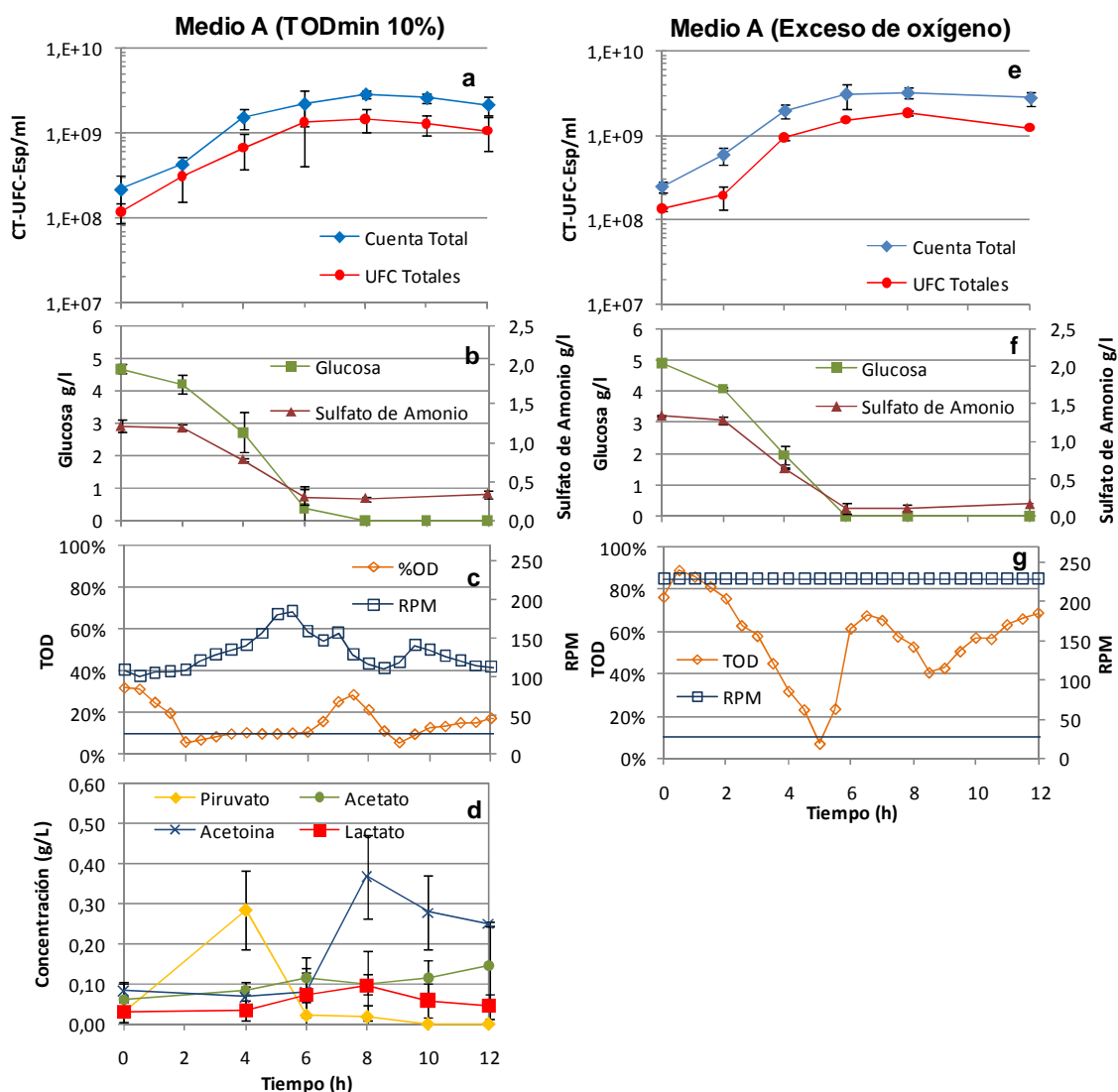


Figura 6-6 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83 en lote. Izq) Medio A a TOD de 10%, biorreactor 20L. Der) Medio A en “exceso de oxígeno”, biorreactor de 7L.

En la Figura 6-6 se observa que la fase exponencial de crecimiento se extiende hasta aproximadamente las 6 h, tanto en el cultivo a TOD mínima, como en el Medio A en

exceso de oxígeno (paneles a y e, Figura 6-6), momento en que la concentración de glucosa llega a valores cercanos a cero (paneles b y f, Figura 6-6). A partir de la segunda hora de fermentación se activa el control del oxígeno disuelto y se incrementó gradualmente de la velocidad de agitación (panel c. Figura 6-6). Los valores de agitación se incrementan de 100 rpm hasta un máximo de 190 rpm, lo cual coincide con el consumo total de glucosa en el medio. En dicho momento la velocidad de agitación desciende, casi de inmediato, nuevamente a 100 rpm (velocidad de agitación mínima). La demanda de oxígeno vuelve a incrementarse nuevamente entre las 7 y 9 h de cultivo, probablemente debido al consumo de los ácidos orgánicos generados por la misma (acetato, lactato) o a otros metabolitos de reserva (acetoína). Finalmente, la demanda de oxígeno nuevamente disminuye debido al descenso en la velocidad de agitación y su tendencia continúa a la baja (ver panel c Figura 6-6, entre hora 10 y 12), evidenciando el inicio de la fase estacionaria y de esporulación.

La Tabla 6-7 muestra los parámetros del proceso a TOD controlada y su comparación respecto al Medio A en exceso de oxígeno. Existe y una ligera disminución de 1.89×10^9 UFC/ml en el cultivo sin control a 1.51×10^9 UFC/ml en el cultivo controlado, y que representa una disminución del 20 %. Sin embargo, esta diferencia se encuentra entre el error experimental de la técnica de medición de UFC (30%) por lo cual no se considera significativo.

Tabla 6-7 Parámetros de crecimiento vegetativo en cultivos en lote

Parámetro	Unidades	Medio A (Exceso de Oxígeno)	Medio A (TOD 10%)
UFC máximas	UFC/ml $\times 10^9$	1.89(± 0.57)	1.51(± 0.45)
$Y_{UFC/gglucoaa}$	UFC/g $\times 10^{11}$	3.78(± 1.14)	3.02(± 0.90)
Productividad de UFC	UFC/h $\times 10^{11}$	3.15(± 0.95)	2.50(± 0.75)
μ	h^{-1}	0.42(± 0.01)	0.40(± 0.06)

En conclusión, no se observa una disminución significativa en las variables evaluadas durante el crecimiento de la bacteria bajo esta tensión de oxígeno disuelto mínima, lo que permitió establecerla como una condición de oxígeno no limitante para los cultivos en lote alimentado.

6.6 Crecimiento vegetativo y esporulación de *Bacillus subtilis* 83 en lotes alimentados

Los cultivos en lote alimentado de *B. subtilis* 83, se llevaron a cabo en el biorreactor de 43 l de volumen nominal (modelo Biostat UD, B. Braun) adaptado con un controlador de oxígeno disuelto para mantener la TOD por agitación en cascada, en el valor mínimo de 10 % definido en la sección anterior.

El cultivo en lote alimentado tradicionalmente consta de tres etapas. La primera es una fase en lote en la cual se da inicio al crecimiento del microorganismo bajo concentraciones no inhibitorias de sustratos en el medio de cultivo. Previamente, a la limitación de alguno de estos, comienza la alimentación gradual de los sustratos para así prolongar y promover la fase de crecimiento vegetativo. Finalmente, luego de finalizada la alimentación, existe una nueva fase en lote, en la cual se terminan de consumir los sustratos remanentes en el medio y se da la esporulación de la bacteria.

6.6.1 Diseño de medio de cultivo inicial en lotes alimentados

Para este estudio, se decidió dividir el volumen total de trabajo del fermentador, de la siguiente manera: la fase en lote inicial se trabajó con un volumen que representara dos tercios del total, de 20 o 14 litros, y en la alimentación se adicionaría el restante como parte de la solución de alimentación hasta 10 o 7 litros.

La solución de alimentación estuvo compuesta de glucosa y sulfato de amonio. Las concentraciones en la misma fueron de 500 y 85 g/l, respectivamente y fueron elegidas con base en el balance estequiométrico que se presenta en la sección 6.2. Bajo esta premisa, el medio de alimentación se encontraba balanceado estequiométricamente.

También se evaluó el efecto de la adición de sales (en pulsos) a diferentes tiempos de la fermentación, ya que debido a la alta concentración de glucosa y sulfato de amonio en la solución de alimentación, el incluir las sales en esta solución acarrearía problemas de solubilidad, principalmente por la precipitación de sulfatos y fosfatos. Por lo anterior, se decidió adicionar el total de sales inorgánicas en el medio inicial. La concentración de las mismas en el medio de cultivo inicial se calculó, asumiendo la generación de 50 g/l de biomasa, partiendo de 173 g/l de glucosa (que sería la concentración inicial de

glucosa, si se adicionara el total de glucosa que se alimenta en el medio inicial) y estimando el requerimiento de cada micronutriente conforme a la composición elemental de la bacteria que fue calculada para C,H y N y de la composición de micronutrientes promedio tomadas de Buitrago (2004). Los resultados se presentan en la Tabla 6.8:

Tabla 6-8 Composición elemental de la bacteria. Tomada de Buitrago (2004).

Elemento (Sustrato en el medio de cultivo)	Composición %
C ($C_6H_{12}O_6$)*	43.70%
N ($(NH_4)_2SO_4$)*	10.68%
O	31.30%
H*	6.550%
P (K_2HPO_4)	3.000%
P (KH_2PO_4)	
K (K_2HPO_4)	1.000%
K(KH_2PO_4)	
Ca ($CaCl_2$)	0.500%
Mg ($MgSO_4$)	0.500%
Fe ($FeSO_4$)	0.200%
Mn ($MnCl_2$)	0.070%

* El porcentaje en peso de C, N y H, es el determinado en el análisis elemental.

Como resultado del cálculo, las concentraciones iniciales de glucosa, sulfato de amonio y de sales en el medio inicial, quedaron determinadas como se consigna en la Tabla 6.9.

Tabla 6-9 Concentración inicial de sales en el medio alimentado.

Compuesto	Concentración Inicial (g/l)
$C_6H_{12}O_6$	10.00
$(NH_4)_2SO_4$	1.700
K_2HPO_4	5.730
KH_2PO_4	5.390
$CaCl_2$	1.040
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.800
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.800
$MnCl_2$	0.120

6.6.2 Evaluación de los perfiles de alimentación exponencial y a flujo constante, observaciones preliminares y diseño de lotes alimentados.

Para lograr altas concentraciones celulares, el modelo de crecimiento microbiano regido por una estrategia de alimentación exponencial es muy utilizado (Martínez *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 2005). Esto se debe a que es posible controlar la velocidad específica de crecimiento de la bacteria, con el flujo de alimentación preseleccionado. El modelo de adición se explica en la sección 5.1.4.2 y según la ecuación 6, el flujo de alimentación depende de una velocidad específica de crecimiento, que si se preestablece, y si los demás factores de la fermentación (volumen inicial, concentración inicial de células, concentración de sustrato en la alimentación, rendimiento de biomasa en sustrato) se mantienen constantes, resulta aplicable.

$$F = \frac{\mu(V_0 X_0) \exp(\mu t)}{S_0 Y_{x/s}} \quad \text{Ec.6}$$

Con base en la ecuación anterior y en los parámetros de rendimiento y concentración celular encontrados en el lote la Tabla 6-10 resume los datos calculados.

Tabla 6-10 Variables cinéticas del cultivo en lote de *Bacillus subtilis* 83.

Variable	Valor
V ₀ : Volumen inicial (ml)	14000
X ₀ : Concentración inicial (UFC/ml)	2.2x10 ⁹
S ₀ : Concentración glucosa en alimentación (g/ml)	0.5
Y _{x/s} : Rendimiento de glucosa en células (cel/g)	4.4x10 ¹¹

El primer flujo de alimentación exponencial se calculó para una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.15 h⁻¹. Este valor se toma con base en los resultados obtenidos por Martínez *et al.* (1997) en los cuales, a esta velocidad específica de crecimiento en la alimentación logra incrementar el valor de biomasa de *Bacillus subtilis* alcanzada en lote alimentado de 6 a 10 veces con respecto al cultivo en lote, en un medio mineral con componentes similares.

La Figura 6-7 ilustra los resultados del Lote Alimentado I (LAI). El comienzo de la alimentación se fijó hacia las 6 h de iniciado el cultivo (cercano al final de la fase

exponencial) y se extendió durante 26 h, luego de lo cual (y debido a la acumulación de glucosa en el medio), se observó de nuevo una fase en lote post-alimentación, en la cual se consumió el remanente de glucosa, hasta que finalmente comienza la fase estacionaria y de esporulación.

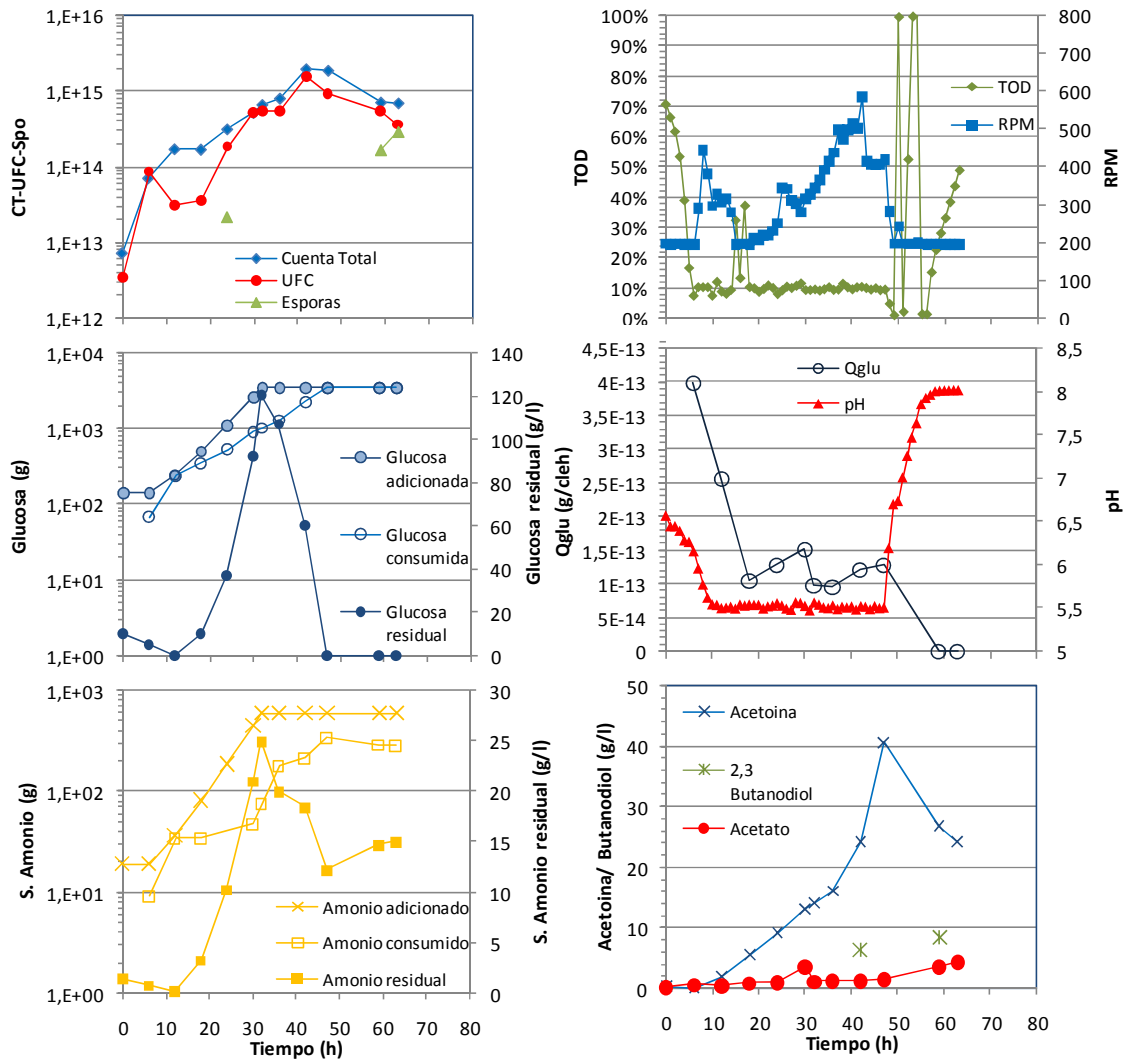


Figura 6-7 Cinéticas de crecimiento y esporulación en LAI.

En la Figura 6-7 (panel a) se observa que se logra extender la fase de crecimiento vegetativo; sin embargo, no fue posible alcanzar un equilibrio entre la cantidad de glucosa adicionada y la glucosa consumida por la bacteria, por lo que este sustrato se acumuló paulatinamente durante la alimentación en el medio, alcanzando una concentración máxima de 120.6 g/l.

En la etapa de lote inicial, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.5 h^{-1} durante las primeras 6 horas de cultivo, muy similar a la que se presentaba en el Medio B de 0.42 h^{-1} (sección 6.3.2). Sin embargo, en la etapa de alimentación se presentó un comportamiento que no estaba previsto. Durante las primeras 6 h de iniciada la alimentación se observó una disminución de UFC en el medio de cultivo, a pesar de que al microscopio fue medible un aumento en el total de células (panel a, Figura 6-7). Estas UFC se incrementaron nuevamente a partir de la hora 18, a una velocidad específica de crecimiento de 0.14 h^{-1} , cercana a 0.15 h^{-1} con la que se prediseñó la alimentación. Sin embargo, es muy probable que esta velocidad específica de crecimiento no estuviese ligada al flujo de alimentación y fuese más bien una consecuencia de la concentración de la glucosa que en ese momento se encontraba acumulada en el medio (de 10.4 g/l a la hora 18), llegando a valores cercanos a 120 g/l a la hora 30. Además se puede observar, que el perfil de alimentación de glucosa difiere de la pendiente de consumo de glucosa por parte del microorganismo (panel b, Figura 6-7), evidenciando un descenso en la velocidad de consumo de glucosa (panel e, Figura 6-7).

Una primera respuesta sobre la razón de este comportamiento, es que la bacteria pudo verse enfrentada a condiciones de estrés nutricional durante las primeras horas de alimentación (los valores de glucosa y sulfato de amonio en el medio llegan a valores cercanos a 0 entre la hora 6 y 12 del cultivo), y por eso la viabilidad de las células durante este tiempo disminuyó. Se sabe que durante el inicio de la fase estacionaria, *Bacillus subtilis* produce enzimas degradativas (Phillips and Strauch, 2002), o factores de canibalismo (González-Pastor, 2011), que atacan a las propias células de *Bacillus*. De igual manera es posible suponer que el flujo de alimentación inicial del cultivo anterior estuvo subestimado, ya la concentración celular que se tenía en el momento de iniciar la alimentación ($6.2 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$) era mayor a la considerada en el modelo de alimentación ($2.2 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$).

Para evaluar esta hipótesis, se decidió realizar un cultivo alimentado, pero llevando a cabo una alimentación a un flujo constante de 22.8 g/lh , denominado LAIP (Figura 6-8), un flujo mucho mayor que los 0.75 g/lh con los cuales comienza la alimentación exponencial en LAI. Con esto se esperaba que se evitara que la bacteria estuviese expuesta durante varias horas a concentraciones bajas de sustrato durante el inicio de alimentación.

Los resultados de este cultivo (LAIP) se ilustran en la Figura 6-8 y, al igual que en el cultivo LAI, se dio inicio a la alimentación a las 6 h de cultivo. La concentración de glucosa y de sulfato de amonio presentaron una rápida acumulación, alcanzando valores de 70 g/l y de 6.2 g/l, respectivamente, en tan solo 3 horas de alimentación.

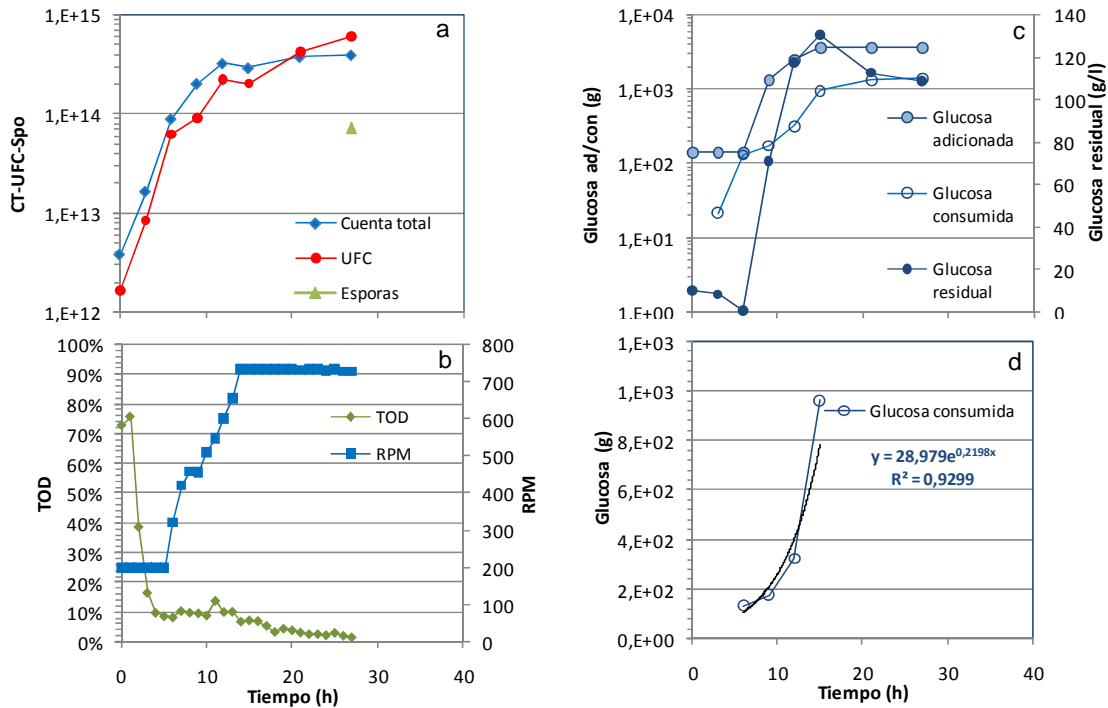


Figura 6-8 Cinética de crecimiento LAIP. Las líneas punteadas muestran el comienzo y el final de la alimentación.

Se pueden distinguir dos etapas de crecimiento bacteriano. La primera, es exponencial y corresponde al lote inicial y a una velocidad específica de crecimiento máxima cercana a 0.6 h^{-1} . La segunda ocurre luego de iniciada la alimentación, entre las 6 y 27 horas, donde la velocidad específica de crecimiento va disminuyendo gradualmente de 0.2 h^{-1} a 0.1 h^{-1} .

A pesar de que se observa una disminución paulatina en la velocidad específica de crecimiento de la bacteria, la concentración de UFC en el medio de cultivo no disminuye como en el cultivo presentado anteriormente, por el contrario, se incrementa aunque a velocidades específicas de crecimiento menores. Es posible que una alta acumulación de glucosa haya traído consigo inconvenientes asociados con la inhibición de crecimiento por altas concentraciones de sustrato. Este fenómeno de inhibición es específico para cada cepa en particular. Por ejemplo; para *B. thuringiensis var. kurstaki*, concentraciones iniciales de glucosa mayores a 56 g/l traen como consecuencia la

disminución de la velocidad específica de crecimiento y del rendimiento de glucosa en células (Arcas *et al.*, 1987); sin embargo, *B. thuringiensis var. israelensis* mantiene su máxima velocidad específica de crecimiento, hasta concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l (Berbert-Molina *et al.*, 2008). Martínez *et al* (1997) han reportado que para *B. subtilis*, la velocidad específica de crecimiento inicial no se ve afectada a concentraciones iniciales de glucosa entre 10 y 30 g/l.

Con base en los cultivos alimentados a flujo exponencial y a flujo constante evaluados anteriormente, se diseñaron los perfiles de los demás cultivos alimentados que se mostrarán a continuación y se dividieron en tres series de experimentos: cultivos alimentados exponencialmente (LAI y LAII), cultivos alimentados a flujo constante (LAIV-LAVIII) y cultivo alimentado a flujo mixto (LAIX). Los perfiles de alimentación se ilustran en el Anexo F. Así mismo, los resultados de todos los lotes alimentados se analizarán en las secciones 6.6.3 y 6.6.4.

6.6.2.1 Diseño de cultivos alimentados exponencialmente (LAI, LAII)

El flujo de adición exponencial de glucosa y sulfato de amonio se ajustó con el perfil exponencial de consumo de glucosa por parte de la bacteria que se obtuvo en el cultivo LAIP, entre la hora 6 y 15 (panel d, Figura 6-8), bajo la consideración:

$$\text{Total de glucosa consumida} = \text{Total de glucosa adicionada} \quad \text{Ec.11}$$

$$\frac{d(\text{Glucosa consumida})}{dt} = F \quad \text{Ec.12}$$

Lo esperado con estos ensayos era evitar la disminución de la concentración de células viables al inicio de la alimentación como se presentó en el cultivo LAI (panel a, Figura 6-7) y evitar la acumulación de los sustratos alimentados como ocurrió en LAIP (panel b, Figura 6-8). El tiempo de inicio de alimentación se adelantó a las tres horas con el objetivo de evitar concentraciones de glucosa cercanas a cero al comienzo de la alimentación. Las características de los lotes alimentados a flujo exponencial se muestran en la Tabla 6-11.

Tabla 6-11 Características de los perfiles de alimentación exponencial.

Característica	Perfil de alimentación		
	Exponencial		
Denominación	LAI	LAI	LAI
Intervalo de Flujo (g/lh)	0.75-25.5	1.00-34.0	1.00-34.0
$\mu(h^{-1})$ estimada	0.15	0.20	0.20
Tiempo de alimentación (h)	26	18	18
Relación C/N	11.0	18.0	11
Inicio de alimentación (h)	6	3	3

6.6.2.2 Diseño de cultivos alimentados a flujo constante (LAI, LAII, LAIII, LAIV, LAV, LAVI, LAVII, LAVIII):

En la figura 6-9 se esquematiza la estrategia de adición a flujo constante. En estos cultivos se espera *a priori* que la glucosa se acumule en el medio de cultivo al inicio de la alimentación, debido a que la alimentación de sustratos supera la demanda de consumo por parte de la bacteria. Conforme la concentración de células vegetativas se incrementa, de igual manera lo hará la demanda de sustratos, y se alcanzará un estado en el cual la demanda de la bacteria superará la alimentación de sustratos, por lo cual la glucosa remanente se consumirá. Finalmente, el flujo alimentado de glucosa se consumirá conforme se realiza la adición, extendiendo el crecimiento vegetativo hasta el momento en el que los nutrientes adicionales no lo puedan sostener y comenzará una fase estacionaria y de esporulación.

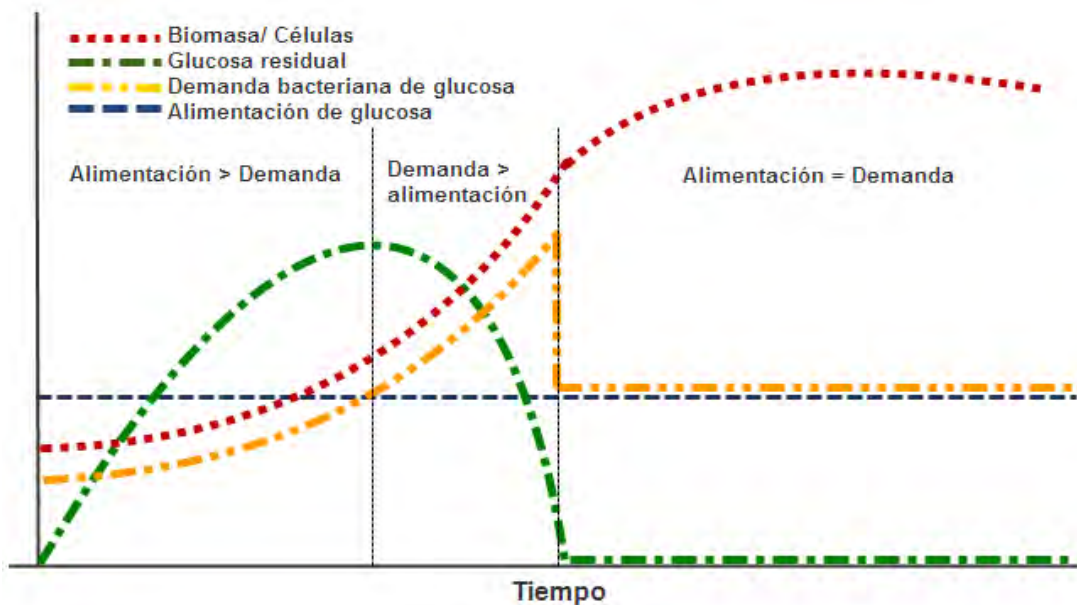


Figura 6-9 Esquema de alimentación a flujo constante

El flujo de adición se evaluó en un intervalo de adición de glucosa entre 12.6 g/lh y 2.9 g/lh. Que son valores corresponden a 1/2 y 1/8 del flujo que se alimentó en LAIP (22.8 g/lh). Estos experimentos se llevaron a cabo con el fin de evitar la acumulación de glucosa al inicio de la alimentación, tal como ocurrió en LAIP (panel b, Figura 6-8) donde se alcanzaron valores de 127 g/l, que pudieron inhibir el crecimiento bacteriano. Las características de los lotes alimentados a flujo constante se muestran en la Tabla 6-12.

Tabla 6-12 Características de los perfiles de alimentación a flujo constante.

Característica	Perfil de alimentación						
	Constante						
Denominación	LAIP	LAIV	LAV	LAVI	LAVII	LAVIII	
Intervalo de Flujo (g/lh)	22.8	12.6	5.1	2.6	5.1	2.9	2.9
$\mu(h^{-1})$ estimada				0.43			
Tiempo de alimentación (h)	9	17	34	18	18	54	53
Relación C/N	11	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
Inicio de alimentación (h)	6	3	3	6	6	6	3

6.6.2.3 Cultivo alimentado mixto (LAIX)

El cultivo mixto se denomina de esta manera por presentar una estrategia de alimentación que se dividió en un perfil exponencial al comienzo y luego una tasa de adición a flujo constante. Las características de lote alimentado a flujo mixto se muestran en la Tabla 6-13.

Tabla 6-13 Características del perfil de alimentación a flujo mixto

Característica	Perfil de alimentación	
	Mixto	
Denominación	LAIX	
Intervalo de Flujo (g/lh)	0.75-3.9	3.9
$\mu(h^{-1})$ estimada	0.15	N/A
Tiempo de alimentación (h)	12	12
Relación C/N	11.0	
Inicio de alimentación (h)	4	

Cada cultivo en lote alimentado que se realizó en una sola ocasión, sin réplicas. Los resultados de lo planteado en las secciones 6.6.2.1, 6.6.2.2 y 6.6.2.3 tuvieron una serie

de comportamientos generales que se analizarán a detalle y que permitirán discernir las diferencias particulares de cada estrategia de alimentación seleccionada.

6.6.3 Comportamientos generales: cambios morfológicos y fisiológicos de los cultivos en lote alimentado

A pesar de las diferencias de los perfiles y flujos de alimentación diseñados en la sección anterior, los resultados que se presentarán en este trabajo indican que se presentó un comportamiento similar en el crecimiento microbiano y en los cambios morfológicos de la célula durante el proceso de fermentación en lote alimentado. Estas similitudes permitieron dividir el proceso de fermentación en cuatro fases diferentes: Fase I. Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final. Cada una de estas fases presentó características bien definidas.

Las diferentes tipos de alimentación influyeron en los valores de los parámetros generales de la fermentación (concentraciones celulares y de metabolitos producidos, rendimientos y productividades), por lo cual fue posible establecer las diferencias entre los tipos de alimentación y el producto generado en mayor proporción.

La Figura 6-10 muestra, a manera de ilustración, las cuatro fases que se identificaron en los cultivos alimentados, utilizando como referencia el cultivo en lote alimentado LAVIII. Adicionalmente, en la Figura 6-11 se presentan micrografías de muestras de caldo de cultivo tomadas en diferentes tiempos de la fermentación y que detallan la evolución morfológica de la bacteria durante el proceso de fermentación. Las cinéticas de crecimiento bacteriano y esporulación de cada lote alimentado se muestran en detalle en el Anexo G, junto con las micrografías de los cultivos que se incluyen en el Anexo H.

6.6.3.1 Fase I: Crecimiento vegetativo

El cultivo comienza con una primera etapa de crecimiento vegetativo, la cual se da posterior a la inoculación y durante el arranque del proceso en modo lote. Se caracteriza por presentar un crecimiento exponencial de la bacteria en el medio mineral a altas velocidades específicas de crecimiento ($>0.4h^{-1}$). Durante esta etapa, el incremento en la concentración de células viables se da paralelamente con el incremento en la

concentración de células totales (panel a, Figura 6-10) y se extiende durante las primeras 6 o 9 h de la fermentación. En las imágenes microscópicas de muestras del medio de cultivo se observan primordialmente células vegetativas de forma bacilar, largas y organizadas en cadenas de varios miembros, que van disminuyendo de tamaño hasta el final de esta etapa (panel a, Figura 6-11).

Este crecimiento viene acompañado de una disminución vertiginosa en los valores de pH (panel e Figura 6-10). Se presenta la producción de ácidos orgánicos como acetato y de compuestos neutrales como acetoína y 2,3-butanodiol (panel f, Figura 6-10). El descenso en la TOD indica igualmente un incremento en la demanda de oxígeno por parte de la bacteria, activando el control de la TOD en el valor de 10 %, incrementando la velocidad de agitación del impulsor (panel d, Figura 6-10).

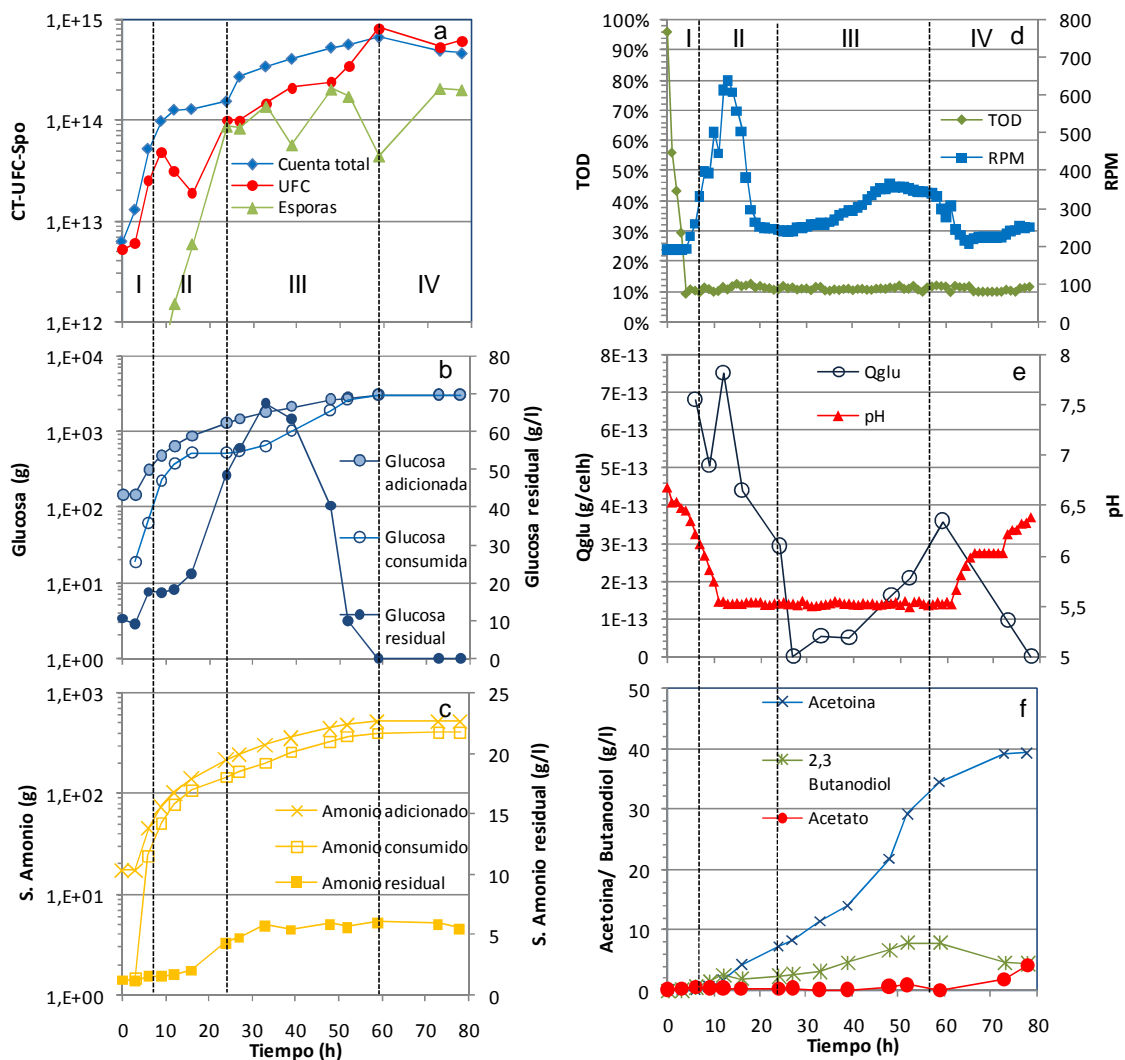


Figura 6-10 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAVIII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

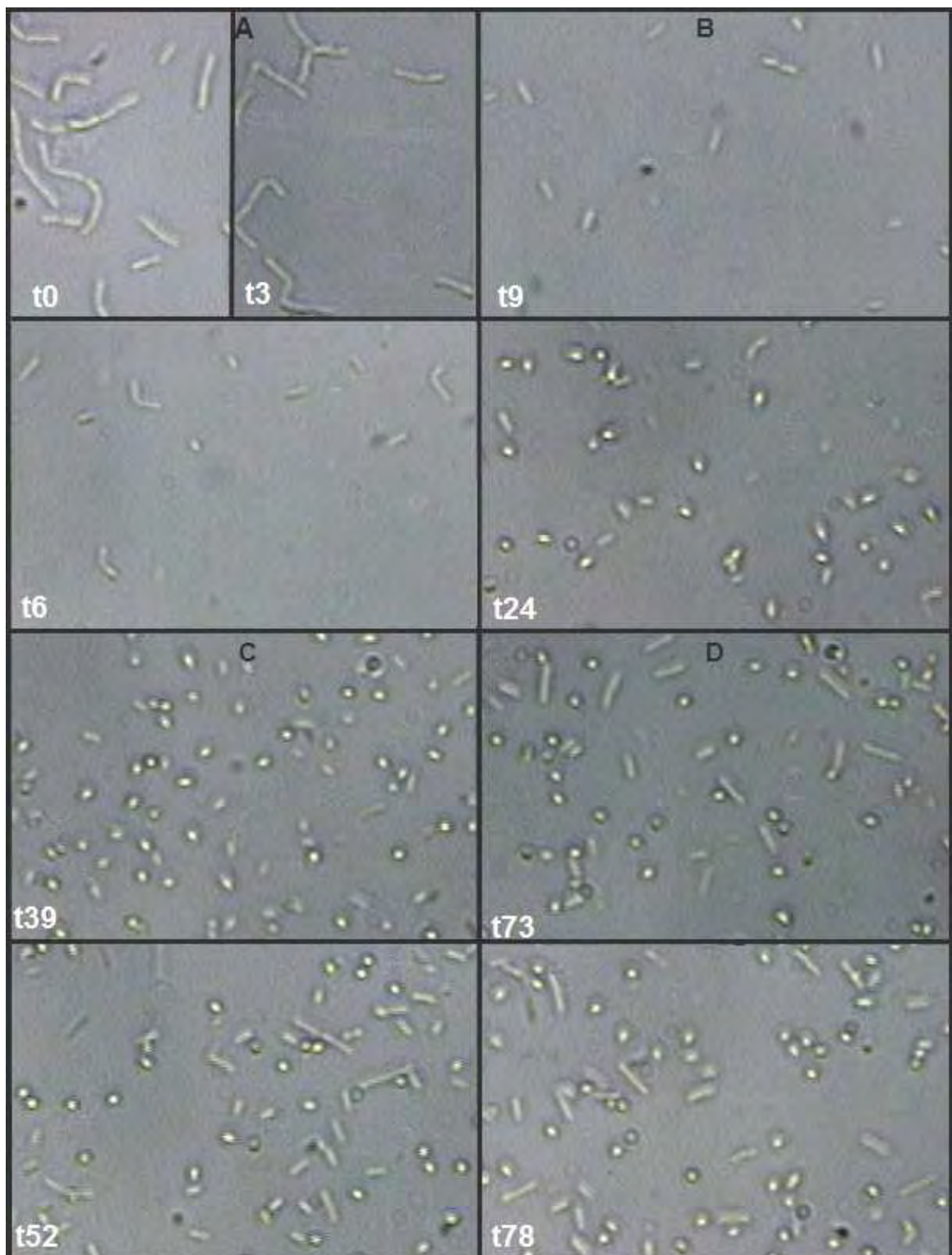


Figura 6-11 Micrografías 40x de muestras del caldo del cultivo del lote LAVIII. A) Fase I, a 0h, 3h y 6h de fermentación, células vegetativas largas; B) Fase II, a 9h y 24h de fermentación, disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III, a 37h y 52h de fermentación, población heterogénea ; D) Fase IV. a 73 y 78 h de fermentación, población heterogénea.

6.6.3.2 Fase II: Estado de transición y primera esporulación.

Sin importar el tiempo de inicio de la alimentación, esta fase se caracteriza por una disminución en el crecimiento vegetativo de todos los cultivos, en un periodo comprendido entre las 9 y 15 h. En esta etapa, se presenta una disminución en la velocidad específica de crecimiento de la bacteria, junto con una disminución en la viabilidad de la población bacteriana. Es decir, a pesar que es evidente un aumento en la concentración de células totales (biomasa) en el cultivo, la población de células vegetativas no aumenta e inclusive disminuye (panel a, Figura 6-10).

En la sección anterior se sugirió que la disminución en la concentración de células viables se debía principalmente a una posible limitación nutricional que estaba ocurriendo en el medio de cultivo. Sin embargo, se observa que este evento ocurre inclusive cuando los sustratos alimentados nunca se encuentran en concentraciones limitantes en el medio. Tal es el caso del lote alimentado de la Figura 6-10, en el que, tanto la concentración de glucosa, como la de sulfato de amonio, no son limitantes y permanecen en valores superiores a 10 g/l y 1 g/l, respectivamente, durante el lapso de tiempo cuando ocurre la disminución en UFC (ver paneles a, b y c, Figura 6-10).

López-y-López y de la Torre (2005) han reportado un comportamiento como el descrito aquí para cultivos alimentados de *B. thuringiensis*. Los autores observaron que la velocidad específica de crecimiento de la bacteria disminuye durante la alimentación, incluso cuando la concentración de los nutrientes en el medio supera a aquellas concentraciones que se tenían al comienzo de lote. Esto debido a que se establece un estado de “transición” en la bacteria. Los autores sugieren que el establecimiento de este estado intermedio se debe a causas distintas a la limitación por nutrientes y que puede estar relacionado con mecanismos de respuesta a péptidos o feromonas de *quorum sensing* generados en cultivos de alta densidad celular (Dunny and Leonard, 1997).

A la par de la disminución en la velocidad específica de crecimiento, igualmente lo hace la velocidad de consumo de glucosa (panel e, Figura 6-10) y existe un descenso en la demanda de oxígeno por parte de la bacteria, que se evidencia con una baja en la velocidad de agitación (panel d, Figura 6-10).

La disminución en la velocidad de consumo de glucosa trae consigo la acumulación de este sustrato en el medio. En algunos casos, esta acumulación se presenta en el comienzo de la etapa de transición, sobre todo cuando los flujos de alimentación son muy altos. Es posible que la bacteria utilice este exceso en la fuente de carbono para la fabricación de matrices poliméricas (Marvasi *et al.*, 2010), por lo cual la viscosidad del cultivo se incrementó en algunos casos hasta 20 veces (Anexo I). Se ha reportado que *B. subtilis* puede producir ácido γ -poliglutámico (PGA) y otros exopolisacáridos en presencia de glucosa y sulfato de amonio (Goto and Kunioka, 1991). Según varios autores (Goto y Kunioka 1997; Richard y Margaritis 2006 y Ogawa *et al* 1997) la síntesis de PGA se realiza durante el final de la fase exponencial y el comienzo de la fase estacionaria. Es posible que la síntesis de estos exopolisacáridos se promovieran la formación de agregados celulares (Figura 6-12) en los cuales existirían limitaciones nutricionales locales debidos a problemas difusionales que desencadenarían el proceso de esporulación de las células del agregado a pesar de que en el seno del medio de cultivo la concentración de nutrientes no fuera limitante.

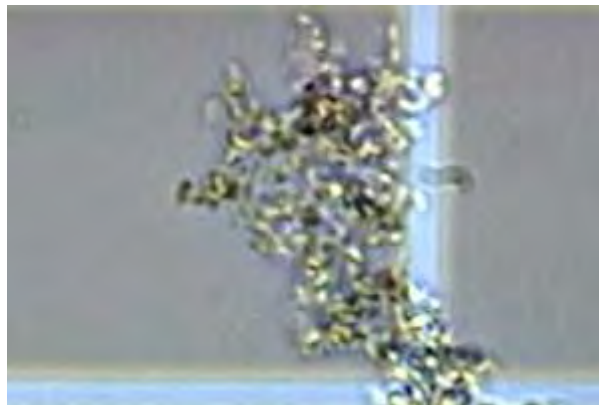


Figura 6-12 Ejemplo de agregado de células formado en el medio de cultivo durante la Fase II.

En el panel f de la figura 6-1, se observa la generación y acumulación de acetoína y 2,3-butanodiol en el medio. Se sabe que en *Bacillus subtilis*, estos compuestos se sintetizan bajo condiciones de sobreflujo de carbono (Tobisch *et al.*, 1999). Adicionalmente juegan un papel importante previniendo la acidificación del medio, cambiando el metabolismo de la célula: de formación de ácidos a la producción de compuestos neutros. Esto explica el porqué las concentraciones de acetato en el medio permanecieron en valores bajos, no superiores a 3 g/l mientras hubiese glucosa en el medio (panel f, figura 6-10). Otra función asociada con la vía productora de acetoína y 2,3 butanodiol es la

regeneración de poder reductor generado durante la glucólisis, regulando la relación de NADH/NAD⁺ dentro de la célula (Celińska and Grajek, 2009).

El estado de transición de *B. subtilis*, es un estado de toma de decisiones. La bacteria expresa varias funciones que le serán de utilidad para buscar fuentes alternativas de nutrientes y competir efectivamente por los recursos disponibles, con el fin de encaminarse por una decisión final (Phillips and Strauch, 2002). Estas funciones no se desarrollarán de manera uniforme en todas las células, sino que existirán diferentes grupos, resultando en una población heterogénea. Con base en esto es posible suponer que durante este periodo de transición y esporulación, existen en el medio varios tipos de células, concordante con lo reportado por Lopez *et al* (2009). Al inicio de la fase de transición, hay células vegetativas encargadas de la producción de la matriz polimérica, otras capaces de expresar la maquinaria de enzimas degradativas y otras productoras de factores de aniquilamiento y/o toxinas (células caníbales, (González-Pastor, 2011)) que pueden atacar a la misma población bacteriana que no había comenzado su proceso de esporulación, retrasando su propio compromiso de iniciar este proceso.

Posteriormente, la aparición de esporas viables al final de esta fase indica que la esporulación fue la elección final de un grupo de células vegetativas (panel a, Figura 6-11).

Las imágenes al microscopio tomadas de muestras del cultivo evidencian que hay una disminución del tamaño de las células vegetativas y es también evidente la aparición de flóculos o agregados celulares compuestos por células en proceso de esporulación o de esporas libres (panel B, Figura 6-11 y Figura 6-12).

6.6.3.3 Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo

La Fase III comienza con la reanudación del crecimiento vegetativo. El medio de cultivo ha dejado de ser un medio mineral, para convertirse en un medio complejo, que contiene restos celulares (proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc.) liberados en los procesos de muerte y maduración de las esporas. La población que constituye el medio está conformada por células vegetativas, esporas y restos celulares.

La concentración de células viables en el medio de cultivo aumenta y se observa que la población de esporas viables en el medio mantiene un comportamiento oscilatorio, lo que hace pensar que puede existir un estado de transición permanente, en el cual ocurren simultáneamente procesos de esporulación, germinación y de crecimiento vegetativo. El incremento en la velocidad de agitación es evidencia de un aumento en la demanda de oxígeno disuelto por parte de las bacterias, resultado del incremento en la población bacteriana (paneles a y c, Figura 6-10).

De igual manera, en esta etapa continúa la síntesis de acetoína y el 2,3-butanodiol (panel f, Figura 6-10) asociado al crecimiento de la bacteria y a la glucosa acumulada en el medio de cultivo. Las imágenes al microscopio de muestras del caldo de cultivo de esta fase de crecimiento muestran su heterogeneidad: existen células vegetativas (largas y pequeñas) y esporas (panel C, Figura 6-11).

6.6.3.4 Fase IV. Fase estacionaria y esporulación final

Con el agotamiento de la glucosa, el cultivo entra en una fase estacionaria, donde el crecimiento celular se detiene, la demanda de oxígeno disminuye y el pH del medio comienza a incrementarse, consecuencia del consumo de acetoína y 2-3 butanodiol. Es apreciable un ligero incremento en la concentración de ácido acético llegando a valores de 4.0 g/l, al final de la fermentación (panel f, Figura 6-10), que es liberado como subproducto del consumo de acetoína (López and Fortnagel, 1972).

Se evaluó la esporulación durante al menos 16 horas después del agotamiento de la glucosa. Luego de 20 horas de fase estacionaria tan solo un 20 % de las UFC al final del proceso correspondían a esporas viables, lo que indica que en el medio todavía hay una población mixta de células vegetativas y de esporas (panel d, Figura 6-10). La esporulación puede verse retrasada debido a la presencia de acetoína, 2,3-butanodiol y acetato que pueden ser reutilizados por la bacteria como reserva energética durante esta fase (Celińska and Grajek, 2009). Adicionalmente, se conoce que este proceso puede estar sujeto a represión catabólica de metabolitos, como lo postula Schaeffer, *et al* (1965).

6.6.4 Parámetros generales del proceso bajo diferentes flujos y perfiles de alimentación

En la sección anterior se describieron las características de cada una de las fases identificadas en el proceso de fermentación en lote alimentado. Existen diferencias puntuales en los parámetros generales del proceso (concentración de unidades formadoras de colonia, concentración de esporas viables, generación de subproductos, entre otras) que dependen de los perfiles y los flujos de alimentación que fueron evaluados.

Uno de los propósitos de este trabajo era incrementar la concentración de células vegetativas empleando una estrategia de lote alimentado, a las cuales posteriormente se les impondría condiciones que permitieran la esporulación, para finalmente obtener una alta concentración de esporas viables. Sin embargo, los resultados de este trabajo demostraron que es posible desarrollar procesos de alta densidad celular y de esporas viables, que generan adicionalmente altas concentraciones de metabolitos de alto valor agregado como la acetoína y el 2,3-butanodiol, que adicionalmente pueden ser utilizados por la bacteria como parte de su maquinaria involucrada en el proceso de control biológico. Las tablas 6-13 y 6-14 muestran los datos sobresalientes con respecto a las máximas concentraciones celulares y producción de subproductos en los cultivos alimentados realizados en este trabajo.

Tabla 6-14 Datos sobresalientes con respecto a células y metabolitos generados.

PERFIL		LOTE	EXPONENCIAL			CONSTANTE						MIXTO
Característica	Unidades	STD	LAI	LAI	LAI	LAIP	LAIV	LAV	LAVI	LAVII	LAVIII	LAIX
Flujo de alimentación	g/lh	NA	0.75-25.5	1.00-34.0	1.00-34.0	22.8	12.6	5.1	2.6	5.1	2.9	0.75-3.86
Tiempo UFC máximas	H	6	42	51	47	27	48	51	48	64	59	28
UFC máximas	UFC/ml x 10 ¹⁰	0.15	7.60	1.53	2.23	2.90	1.14	2.35	2.27	2.17	4.17	5.40
Tiempo Spo máximas	H	24	63	71	71	27	75	72	72	77	73	48
Esporas viables máximas	Spo/ml x 10 ¹⁰	0.05	1.40	0.30	0.66	0.51	0.34	0.88	0.76	1.07	1.03	3.13
Eficiencia de esporulación	Spo/UFCmax	0.30	0.18	0.20	0.30	0.12	0.24	0.37	0.33	0.50	0.25	0.60
Acetoína generada (g/L)	g/l	0.43	26.8	47.8	50.6	5.64	35.3	36.1	35.5	43.0	39.2	2.17
Butanodiol generado (g/l)	g/l	ND	8.50	3.20	2.78	5.78	7.73	1.84	11.8	4.22	4.68	2.6
Glucosa total adicionada	g/l	10	170	183	186	68	182	169	156	159	157	87

NA: No Aplica; ND: No determinado

En el cultivo alimentado LAIX se obtuvieron las mayores concentraciones de esporas viables y los mayores rendimientos en células viables y en esporas viables comparados con los demás cultivos alimentados. Estos valores representan un incremento en la concentración de esporas viables de 73 veces mientras la productividad del proceso de aumenta 35 veces con respecto al medio mineral inicial.

Tabla 6-15 Rendimientos y productividades de los cultivos realizados con diferentes perfiles de alimentación.

PERFIL		LOTE	EXPONENCIAL			CONSTANTE						MIXTO
Característica	Unidades	STD	LAI	LAII	LAIII	LAIP	LAIV	LAV	LAVI	LAVII	LAVIII	LAIX
Flujo de alimentación	g/lh	NA	0.75-25.5	1.00-34.0	1.00-34.0	22.8	12.6	5.1	2.6	5.1	2.9	0.75-3.86
Y UFC/g glucosa	UFC/g x10 ¹¹	1.50	4.47	0.83	1.20	4.29	0.79	1.39	1.45	1.37	2.66	5.98
Y SPO/g glucosa	SPO/g x 10 ¹¹	0.45	0.82	0.17	0.35	0.50	0.19	0.52	0.48	0.68	0.66	3.60
Y (Acetoina/ g glucosa)	g/g	0.04	0.15	0.26	0.27	0.08	0.19	0.21	0.23	0.25	0.25	0.02
Y(2-3But/g glucosa)	g/g	ND	0.07	0.02	0.02	0.09	0.04	0.01	0.07	0.05	0.03	0.03
Productividad de UFC	UFC/lh x 10 ¹¹	2.50	18.10	2.99	4.75	10.74	2.38	4.61	4.72	3.39	7.06	19.29
Productividad de esporas viables	SPO/lh x 10 ¹¹	0.19	2.22	0.43	0.93	1.90	0.46	1.22	1.05	1.39	1.41	6.53

ND: No determinado

En el cultivo LAIX, la glucosa alimentada al medio fue consumida inmediatamente por la bacteria y en consecuencia no hubo acumulación de este sustrato. Por esta razón disminuye la síntesis y acumulación de metabolitos relacionados con el sobreflujo de carbono (acetoina, 2,3-butanodiol que no superaron los 3 g/l durante el cultivo), comparado con lo ocurrido en los otros cultivos alimentados (LAI-VIII, LAIP). Esto permitió que la fuente de carbono se utilizara principalmente para la generación de biomasa. El rendimiento de glucosa en UFC máximas se incrementó en un 35 %, con respecto al lote Medio B (ver Tabla 6-6), escenario seleccionado en lote por sus mejores parámetros para la generación de células vegetativas.

La productividad de este proceso (LAIX) también se ve favorecida, ya que se elimina el tiempo empleado en consumir la glucosa residual al final de la alimentación, por lo que inicia la fase estacionaria y de esporulación, justamente en ese momento. La

productividad de esporas viables alcanza un considerable incremento, 3 veces respecto al segundo mejor lote alimentado (LAI) y de 34 veces con respecto al cultivo en lote en el medio estándar (ver Tabla 6-15).

A pesar de que el cultivo LAI alcanzó una mayor concentración de células viables (con respecto al cultivo LAIX), la eficiencia de esporulación de este proceso fue muy baja (un 18 %, frente a 60 % del LAIX). Estos dos últimos cultivos tienen la similitud de que la alimentación se lleva a cabo a una misma velocidad de flujo durante las primeras 12 h, luego de las cuales, el perfil de alimentación en LAI continúa exponencialmente (la glucosa se acumula a concentraciones de hasta 120 g/l a las 32 h), mientras que el cultivo LAIX tuvo a un valor de alimentación a flujo constante de 3.86 g/lh durante otras 12 h, sin que haya evidencia de glucosa residual en el medio. Las velocidades específicas de crecimiento en la Fase III son las más altas que se obtuvieron en todos los cultivos alimentados: 0.2 h^{-1} para el lote alimentado LAIX (entre las 16 y 28 h) y de 0.14 h^{-1} para el lote alimentado LAI (entre las 18 y 42 h de proceso).

Los cultivos alimentados LAII, LAIII, LA IV, LAV, LAVI, LAVII y LAVIII presentan velocidades específicas de crecimiento en la Fase III que no superan los 0.05 h^{-1} . Estas bajas velocidades específicas de crecimiento en la Fase III, pueden atribuirse a la acumulación de sustancias inhibitorias u otras fuentes de nutrientes, producidas durante la etapa de transición. Un ejemplo de estas sustancias es la subtilisina, la cual es producida durante las etapas 0 y II del ciclo de esporulación de *B.subtilis* (Pierce and Robertson, 1992). Es posible que debido a que los flujos iniciales de alimentación de estos cultivos fueron altos, durante la etapa de transición, las células vegetativas que se encontraban produciendo este tipo de enzimas hayan utilizado la fuente de carbono en exceso para su síntesis y liberación al medio de las mismas, resultando en una acumulación que resultaría inhibitoria en la etapa posterior de reanudación de crecimiento.

Sin embargo, la acumulación de glucosa en el medio no resultó del todo desfavorable, debido a la producción de altas concentraciones de acetoína y 2,3-butanodiol. En los cultivos alimentados mencionados anteriormente, se lograron títulos de acetoína mayores a 35 g/l al final de la Fase IV y, en algunos casos, la suma de las concentraciones de acetoína y 2,3-butanodiol superaron los 51 g/l (LAII y LAIII). Los rendimientos de glucosa en acetoína y 2,3-butanodiol juntos son de 0.3 g acetoína +

2,3-butanodiol /g glucosa y representan cerca del 60 % del rendimiento teórico para estas reacciones, 0.49 g acetoina/ g glucosa y 0.50 g 2,3-butanodiol / g glucosa.

La máxima concentración de acetoina alcanzada en este trabajo fue de 50.6 g/l en el cultivo LAIII (Tabla 6-13) y comparada con los valores más altos reportados en la literatura significa un incremento del 43 % en la concentración máxima de acetoina reportada para *B. subtilis* (Xiao *et al.*, 2006).

Una investigación reciente ha reportado la producción de 2,3-butanodiol en cultivos en lote y en lote alimentado por parte de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* cultivada en medios complejos y usando concentraciones de glucosa de hasta 200 g/l, obteniendo valores de 96 g/l de 2,3-butanodiol y 20 g/l de acetoina (Yang *et al.*, 2011). Esto parece indicar que, a pesar que el título de acetoina reportado, es mayor al encontrado en este trabajo, la selección del producto de interés (acetoina o 2,3-butanodiol) dependerá de parámetros de proceso y operación tales como la velocidad de agitación, el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{la}) y la tensión de oxígeno disuelto (Bourne *et al.*, 1992), que hace falta estudiar a detalle para estas bacterias.

Por otro lado, la producción de esos compuestos representa otra ventaja para el uso de esta cepa. Se ha reportado que estas sustancias volátiles promueven el crecimiento de plantas (Ryu *et al.*, 2003). Esto es un beneficio circunstancial que se suma a la bien conocida actividad antagonista que se conoce del microorganismo frente a hongos fitopatógenos y que las hace idóneas para extender el uso del medio de cultivo en la formulación de agentes de control biológico.

Estos resultados permiten generar expectativas de nuevas alternativas de proceso, enfocadas a la producción y purificación de estos dos compuestos. Industrialmente la acetoina es utilizada como saborizante en la industria láctea y de vinos (Xiao *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2010), mientras que el 2,3- butanodiol es valorado como un potencial biocombustible renovable y como precursor de varios compuestos químicos (Ji *et al.*, 2011).

Al parecer, el aumento en la eficiencia en el uso de la fuente de carbono por parte de la bacteria en cultivos alimentados depende de varios factores. El primero es un balance preciso entre la glucosa demandada y la glucosa suministrada. Un exceso en la alimentación conlleva a un incremento en la concentración de este sustrato en el medio,

lo que activa la producción de otros metabolitos, disminuyendo los rendimientos en biomasa. El estudio de Park *et al* (1992) es muy ilustrativo. Ellos realizaron cultivos en lotes alimentados controlando la concentración de glucosa en el medio a 3 valores (10 g/l, 1 g/l y 0 g/l). En exceso de glucosa (10 g/l) se observa una síntesis y acumulación de metabolitos, principalmente propionato. En limitación de glucosa (0.2 g/l), no hay síntesis de metabolitos, pero la concentración celular no incrementa. Usando 1 g/l, la síntesis de metabolitos es mínima y es posible extender el crecimiento vegetativo alcanzando concentraciones de células viables de hasta 3.4×10^{11} UFC/ml y un valor de biomasa 180 g/l (esto representa 4.8 veces más que el máximo valor de células logrado en el lote alimentado LAI). Sin embargo, la cepa de trabajo de estos autores, tiene una mutación en el gene spoOA12, la cual le impide llevar a cabo el proceso de diferenciación celular y de esporulación, esto último es muy relevante ya que es probable que en ese trabajo la población bacteriana en el medio de cultivo correspondiera únicamente a células vegetativas, que se comportaran fisiológicamente de la misma manera.

En ambientes naturales las poblaciones de *Bacillus* desarrollan colonias con poblaciones heterogéneas, viviendo en un estado de “transición” permanente (Phillips and Strauch, 2002). Sin embargo, en el laboratorio, el cultivo de estas cepas partiendo de poblaciones heterogéneas acarrearía problemas tales como la esporulación temprana. Por ello otro factor a considerar, es que los lotes alimentados deben iniciarse con un cultivo homogéneo, sincronizado, que solo contenga células vegetativas. En este trabajo, la fase de lote inicial, a pesar que se comenzó con un cultivo que incluía principalmente de células vegetativas (como se evidencia en las micrográficas), fue muy prolongada y permitió que la bacteria creciera en condiciones de exceso de glucosa, en la que fue acumulando subproductos y factores de esporulación (Grossman and Losick, 1988), que dieron inicio a un estado de transición y de diferenciación celular que se estableció en el cultivo previamente al inicio de la alimentación. Por ello y sin importar el perfil o flujo utilizado, este fenómeno de diferenciación siempre se presentó en los diferentes esquemas de proceso. El uso de cultivos sincronizados en el inicio de la alimentación es indispensable ya que permitirán establecer un estado quasi-estable en el cual la velocidad específica de crecimiento es controlada en estas células vegetativas. Este estado quasi-estable estará gobernado por variables fundamentales del cultivo que dependen de μ (acumulación de subproductos, concentración de biomasa, expresión genética, rendimientos, productividades, etc) y su final se

evidenciará con el ingreso al estado de transición y de esporulación que ya se ha discutido.

6.6.5 Producción de compuestos antifúngicos por *Bacillus subtilis* 83 en cultivos alimentados

Se realizaron bioensayos de antagonismo *in vitro* utilizando el caldo de cultivo libre de células, producto de la fermentación de *B. subtilis* 83 de los cultivos alimentados. El experimento se realizó por triplicado y se muestran las barras de error de las tres réplicas.

En la Figura 6-13 se muestran los porcentajes de inhibición de crecimiento causados por los metabolitos producidos por la bacteria cuando la concentración de células viables era máxima (UFC máx) y cuando la concentración de esporas viables fue máxima (SPO máx).

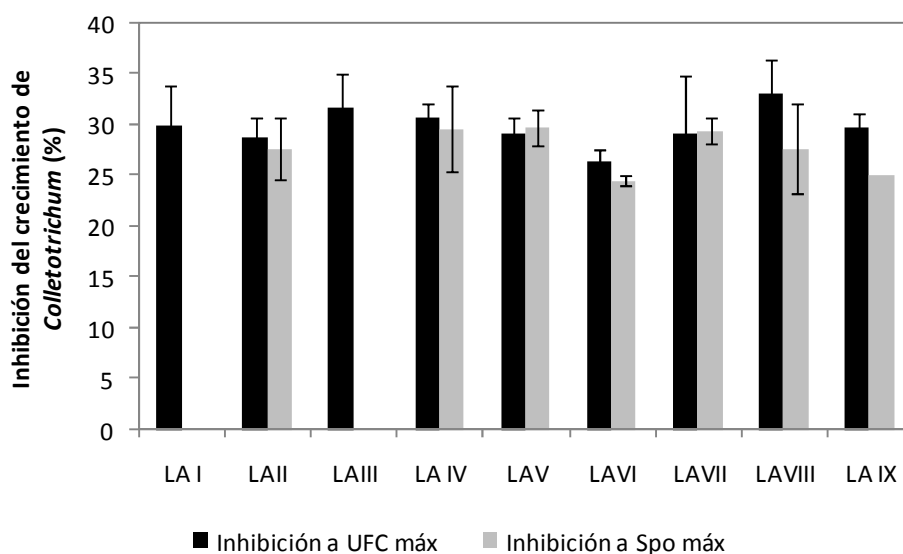


Figura 6-13 Producción de compuestos antifúngicos por *B. subtilis* 83 en cultivos alimentados.

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de inhibición de crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* entre los caldos de cultivo de los diferentes sistemas alimentados. El porcentaje de inhibición de crecimiento promedio es de 30 % cuando se evaluó la concentración del sobrenadante en los que la

concentración de células es máxima. Según lo reportado por Morales (2007), estos compuestos comienzan a producirse en *B. subtilis* a partir de la décima hora de fermentación, correspondiente en estos cultivos al inicio de la etapa de transición.

Existe una ligera disminución en el porcentaje de inhibición al tiempo de máxima concentración de esporas viables a (28 % en promedio), posiblemente asociada a la pérdida de actividad de algunas enzimas contenidas en el sobrenadante. Sin embargo, existen reportes de enzimas que pueden llegar a ser muy resistentes a altas temperaturas, como el caso de una bacteriocina utilizada para el biocontrol de cepas de *Agrobacterium spp.* sintetizada por *B. subtilis*, la cual que puede conservar su actividad durante 2 h estando expuesta a temperaturas de 100° C (Hammami *et al.*, 2009).

Los resultados aquí presentados demuestran que existe la liberación de compuestos con actividad antifúngica en el medio de cultivo y que estos compuestos se sintetizan en todas las condiciones de alimentación que fueron evaluados en este trabajo. La introducción de estas sustancias en el producto formulado con base en esporas podría incrementar la actividad antagonista de la cepa debido al impacto conjunto de células vegetativas, esporas y metabolitos antifúngicos (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012) e incrementar sus ventajas para su uso en el control biológico. De igual manera, la identificación y cuantificación de las sustancias responsables de esta actividad (surfactinas, iturinas, fengicinas, etc.) producidas por esta cepa en particular es una alternativa llamativa para diseñar procesos que se enfoquen en maximizar la producción de estos compuestos.

7 CONCLUSIONES

7.1 Conclusión general

En cultivos alimentados con glucosa y sulfato de amonio, controlando la TOD en un valor mínimo no limitante y utilizando una estrategia de alimentación predefinida mixta, que mantenga las concentraciones de glucosa en el medio en valores bajos, no limitantes, fue posible incrementar las concentraciones de células y esporas viables y los rendimientos de glucosa en células viables y esporas viables con respecto a cultivos en lote y a cultivos en lote alimentados, todos limitados por la fuente de carbono.

7.2 Conclusiones específicas

- Se caracterizaron los requerimientos nutricionales de *Bacillus subtilis* 83 y la producción de células y esporas viables en biorreactores de 7l.
- En el cultivo en lote, un medio balanceado estequiométricamente en glucosa y sulfato de amonio permitió incrementar las concentraciones de células vegetativas, mejorando el rendimiento de glucosa en células viables 2.9 veces, respecto al cultivo en lote limitado por glucosa.
- El crecimiento de la bacteria a una tensión de oxígeno disuelto mínima controlada de 10 %, no disminuye las concentraciones de células viables que se alcanzan en cultivos en lote.
- Durante los cultivos en lote se evidenció la formación de ácidos orgánicos como (acetato y lactato), así como de compuestos neutros como acetoína y 2,3-butanodiol.
- En los cultivos en lote alimentado se identificaron cuatro etapas del proceso, caracterizadas morfológica y fisiológicamente: Fase I: Crecimiento vegetativo;

Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación.

- El establecimiento de una etapa de transición y esporulación temprana en los cultivos alimentados es independiente del tipo de alimentación utilizada. Luego de la cual se desarrolla una población heterogénea (células vegetativas, células en proceso de esporulación y esporas) en el medio de cultivo.
- Durante el estado de transición la formación de agregados celulares, generarían limitaciones nutricionales locales que desencadenarían el proceso de esporulación de las células vegetativas, sin importar de que en el seno del medio de cultivo la concentración de nutrientes no fuera limitante.
- La Fase III se caracteriza por un incremento en la concentración de células viables, donde se llevan a cabo simultáneamente procesos de crecimiento vegetativo y de esporulación.
- El cultivo alimentado a flujo mixto, sin acumulación de glucosa y limitado por carbono, permitió incrementar la concentración de esporas viables y la productividad del proceso en 73 y 35, veces respectivamente, con respecto al cultivo en lote y en 2 y 3 veces respecto al segundo mejor escenario en cultivo en lote alimentado con acumulación de glucosa.
- Los cultivos alimentados exponencialmente y a flujo constante que presentan acumulación de glucosa en el medio son capaces de direccionar el flujo de carbono a la síntesis de altas concentraciones de acetoína (~50 g/l) y 2,3-butanodiol, alcanzando rendimientos de glucosa en estos productos de 0.3 g/g glucosa que corresponde al 60 % del rendimiento teórico.
- Los sobrenadantes de los todos los cultivos alimentados, libres de células, contienen sustancias que presentan actividad antagonista frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y no se presentan diferencias en relación al tipo de cultivo.

8 PERSPECTIVAS

- Utilizar inóculos sincronizados y disminuir el tiempo del lote inicial en cultivos alimentados, para evitar la generación temprana de subproductos y acumulación de factores de esporulación independientes del flujo de alimentación utilizado.
- Evaluar la influencia de la velocidad específica de crecimiento en lotes alimentados. Procurando controlar la velocidad de crecimiento desde la inoculación del reactor.
- Evaluar la producción y cuantificación de biopolímeros sintetizados durante la etapa de transición de *B. subtilis* 83 y su influencia en la agregación y esporulación celular.
- Realizar cultivos en lote alimentado con estrategias de control de lazo cerrado, (pH stat, DO stat, control de glucosa en línea) con el fin de monitorear permanentemente el estado metabólico de la bacteria para un fin determinado (generación de biomasa, metabolitos, etc).
- Identificar y cuantificar compuestos responsables de actividad antagónica en los caldos de cultivos de *B. subtilis* 83.
- Identificar y cuantificar compuestos responsables de promoción de crecimiento de plantas, producidos por *B. subtilis* 83.
- Evaluar un proceso de producción de metabolitos como acetoína y 2,3 butanodiol en cultivos por lotes, empleando varias concentraciones de glucosa en el medio inicial, realizando un estudio a las condiciones de operación, pH, TOD, etc. que permitan maximizar su síntesis.

BIBLIOGRAFÍA

Akesson, M., Hagander, P., Axelsson, J.P., 1999. A probing feeding strategies for *Escherichia coli* cultures. *Biotechnology Techniques* 13, 523-528.

Alam, S., Capit, F., Weigand, A., Hong, J., 1989. Kinetics of 2,3 Butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effect of initial substrate concentration and aeration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 47, 71-84.

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. Colegio de Posgraduados, Chapingo, Estado de México.

Arcas, J., Yantorno, O., Ertola, R., 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology Letters* 9, 105-110.

Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* 134, 307-319.

Berbert-Molina, M.A., Prata, A.M.R., Pessanha, L.G., Silveira, M.M., 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35, 1397-1404.

Bhaduri, S., Bandyopadhyay, S., Bose, S., 1989. Repression of sporulation: Isolation and characterization of repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 497-504.

Bio-Rad, 1994. Guide to Aminex for HPLC columns for food and beverage, biotechnology, and bio-organic analysis. Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, pp. 1-77.

Bourne, J.R., Zurita, E.P., Heinzle, E., 1992. Bioreactor scale-up for the oxygen-sensitive culture *Bacillus subtilis*: the influence of stirrer shaft geometry. *Biotechnology Progress* 8, 580 - 582.

Buitrago, G., 2004. La producción de ingredientes activos en *Bacillus thuringiensis*. In: Bravo, A., Ceron, J. (Eds.), *Bacillus thuringiensis* en Control Biológico. Editorial Buena Semilla, Bogotá, p. 243.

Cano, R.J., Borucki, M.K., 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268, 1060-1064.

Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.I., Chulze, S., Etcheverry, M., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in *citro* and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156, 748-754.

Celińska, E., Grajek, W., 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnology Advances* 27, 715-725.

Cortezzo, D.E., Setlow, P., 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemical. *Journal of Applied Microbiology* 98, 606-617.

Chen, Z.-M., Li, Q., Liu, H.-M., Yu, N., Xie, T.-J., Yang, M.-Y., Shen, P., Chen, X.-D., 2009. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1353-1360.

Demoz, B.T., Korsten, L., 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control* 37, 68-74.

Dettwiler, B., Dunn, I.J., Heinzle, E., Prenosil, J.E., 1992. A simulation model for continuous production of acetoin and butanediol using *Bacillus subtilis* with integrated pervaporation separation. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 791-800.

Driks, A., 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 1-20.

Dunny, G., Leonard, B., 1997. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 51, 527-764.

Eichenberger, P., 2007. Genomics and cellular biology of endospore formation. In: Graumann, P. (Ed.), *Bacillus: cellular and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, U.K., pp. 375-418.

Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1, 117-126.

Errington, J., 2009. From spores to antibiotics via the cell cycle. *Microbiology* 156, 1-13.
Ferreira, J.H.S., Matthee, F.N., Thomas, A.C., 1991. Biological control of *Eutypia lata* of grapevine by an antagonis strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81, 283-287.

Fisher, S., Sonenshein, A., 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology* 45, 107-135.

Fujita, M., González-Pastor, J.E., Losick, R., 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 187, 1357-1368.

Galindo, E., Carillo-Fasio, J.A., García, R., Patiño-Vera, M., 2005. Tecnología para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad poscosecha. *Claridades Agropecuarias* 148, 50-59.

Gerhart, P., Marquis, R.E., 1989. Spore thermo-resistance mechanisms. In: Smith, I., Slepecky, R.A., Setlow, P. (Eds.), *Regulation of prokaryotic development*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 43-63.

Gilmore, M.E., Bandyopadhyay, D., Dean, A.M., Linnstaedt, S.D., Popham, D.L., 2003. Production of muramic δ -lactam in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* 186, 80-89.

- González-Pastor, J.E., 2011. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Reviews 35, 415-424.
- Goto, A., Kunioka, M., 1991. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 56, 1031-1035.
- Grossman, A., Losick, R., 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 85, 4369-4373.
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A., Nesme, X., 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium spp.* strains. Letters in Applied Microbiology 48, 253-260.
- Jayaraj, J., Radhakrishnan, N.V., Kannan, R., Sakthivel, K., Suganya, D., Venkatesan, S., Velazhaban, R., 2005. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* Biocontrol Science and Technology 15, 55-65.
- Ji, X., He, H., Ouyang, P., 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-art-review. Biotechnology Advances 29, 351-364.
- Jong, J.Z., Hsium, D.Y., Wu, W.T., Tzeng, Y.M., 1995. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production in a tower type bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 48, 207-213.
- Kaplan, A., 1969. The determination of urea, ammonia, and urease. Methods of Biochemical Analysis 17, 311-324.
- Kwon, E.-Y., Kim, K.M., Kim, M.K., Lee, I.Y., Kim, B.S., 2011. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. Bioprocess and Biosystems Engineering 34, 789-793.
- Lai, E.-M., Phadke, N.D., Kachman, M.T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J., Maddock, J.R., Driks, A., 2003. Proteomic analysis of the spore coat of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. Journal of Bacteriology 185, 1443-1454.
- Laloo, R., Maharajh, D., Görgens, J., Gardiner, N., Görgens, J.F., 2009. High-density spore production of a *B. cereus* aquaculture biological agent by nutrient supplementation. Applied Microbiology and Biotechnology 83, 59-66.
- Liang, F., Shouwen, C., Ming, S., Ziniu, Y., 2006. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Bacillus thuringiensis* improve the cell density and insecticidal crystal proteins yield. Applied Microbiology and Biotechnology 74, 390-397.
- Liu, W.M., Bajpai, R., Bihari, V., 1994. High-density cultivation of sporeformers. Annals New York Academy of Sciences 721, 310-325.
- López-y-López, V.E., de la Torre, M., 2005. Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. Applied Microbial and Cell Physiology 67, 254-260.

- Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 152-163.
- López, J., Fortnagel, P., 1972. The regulation of butanediol cycle in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 279, 554-560.
- Luna, C.L., Mariano, R.L.R., Souto-Maior, A.M., 2002. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19, 133-140.
- Martínez, A., 1996. Estrategias de fermentación para la producción de β -galactosidasa de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis*., Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Martínez, A., Ramírez, O.T., Valle, F., 1997. Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47, 40-45.
- Marvasi, M., Visscher, P.T., Casillas Martinez, L., 2010. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters* 313, 1-9.
- Matar, S.M., El-Kazzaz, S.A., Wagih, E.E., El-Diwany, A.I., Moustafa, H.E., El-Saadani, M.A., Abo-Zaid, G.A., Hafez, E.E., 2009. Bioprocessing and scaling-up cultivation of *Bacillus subtilis* as a potential antagonist to certain plant pathogenic fungi, III. *Biotechnology* 8, 138-143.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu, J.S., Losick, R., 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 50, 1683-1701.
- Monteiro, S., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J., Cunha, A.E., 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* 21, 1026-1031.
- Mora, A.A., Teliz, O.D., Reboucas, S.J., 2002. Importancia del mango. El mango manejo y comercialización. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas y Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, México DF.
- Morales, D., 2007. Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83 con alta viabilidad. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Nagórska, K., Bikowski, M., Obuchowski, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 54, 495-508.
- Nakata, H.M., Halvorson, H.O., 1960. Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 80, 801-810.
- Nicholson, W.L., Munukata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64, 548-572.

- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Domes, J., Thonart, P., 2005a. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 692-698.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16, 115-125.
- Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P., 2005b. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 29-38.
- Park, Y.S., Kai, K., Lijima, S., Kobayashi, T., 1992. Enhanced β -galactosidase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 686-689.
- Phillips, Z.E.V., Strauch, M.A., 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 392-402.
- Pierce, J.A., Robertson, C., R., 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* 8, 211-218.
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 7, 579-586.
- Prabakaran, G., Balaraman, K., Hoti, S.L., Manonmani, A.M., 2007. A cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus sphaericus* H5a5b (VCRC B42) for mosquito control. *Biological Control* 41, 379-383.
- Pusey, P.L., Wilson, C.L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68, 753-756.
- Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R., 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.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Wei, H., Paré, P.W., Kloepper, J., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 4927-4932.
- Schaeffer, P., Millet, J., Aubert, J.-P., 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 207-255.
- Schultz, D., Ben Jacob, E., Onuchic, J.N., Wolynes, P.G., 2007. Molecular level stochastic model for competence cycles in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 17582-17587.

- Schultz, D., Wolynes, P.G., Jacob, E.B., Onuchic, J.N., 2009. Inaugural article: Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21027-21034.
- Serrano-Carreón, L., Galindo, E., 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia* 58, 77-88.
- Setlow, P., 1992. I will survive: protecting and repairing spore DNA. *Journal of Bacteriology* 174, 2737-2741.
- Setlow, P., 2000. Resistance of bacterial spores. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), *Bacterial stress response*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 217-230.
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
- Shi, F., Zhu, Y., 2007. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. *Biocontrol* 52, 845-853.
- Sonenshein, A., 2000. Control of initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 561-566.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845-857.
- Svarachorn, A., Shinmyo, A., Tsuchido, T., Takano, M., 1989. Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by monovalent cations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30, 299-304.
- Takahiro, S., Yamane, T., Shimizu, S., 1990. Phenomenological background and some preliminary trials of automate substrate supply in pH-stat modal fed-batch culture using a set point of high limit. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69, 292-297.
- Tännler, S., Decasper, S., Sauer, U., 2008. Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. *Microbial Cell Factories*, 7-19.
- Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M., 1999. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181, 6996-7004.
- Veening, J.W., Murray, H., Errington, J., 2009. A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* 23, 1959-1970.
- Walker, S.T., 2000. Clasificación, estructura y funcionamiento de las bacterias. *Microbiología*. McGraw Hill, Interamericana, México D.F.
- Xiao, Z., Qiao, S., Ma, C., Xu, P., 2010. Acetoin production associated with increase of biomass in *Bacillus pumilus* ATCC 14884. *African Journal of Microbiology Research* 4, 1997-2003.

- Xiao, Z.J., Liu, P.H., Qin, J.Y., Xu, P., 2006. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 61-68.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N., 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low commercial products and by-products. *Biological Control* 60, 280-289.
- Yang, D.M., Bi, Y., Chen, X.R., Gen, Y.H., Zhao, J., 2006. Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. *Yindi*). *Acta Horticulturae* 712, 735-739.
- Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Lin, Q., Xia, H., Xu, Z., Yang, S., 2011. Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Basic Microbiology* 51, 650-658.
- Yu, H., Shi, Y., Zhang, Y., Yang, S., Zheng, Z., 2002. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Escherichia coli* on production of poly(L-hydroxybutyrate) and fermentative parameters. *FEMS Microbiology Letters* 214, 223-227.
- Zhu, B.-F., Xu, Y., Fan, W.-L., 2009. High-yield fermentative preparation of tetramethylpyrazine by *Bacillus* sp. using an endogenous precursor approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37, 179-186.

ANEXOS

ANEXO A Curva de calibración de concentración de sulfato de amonio

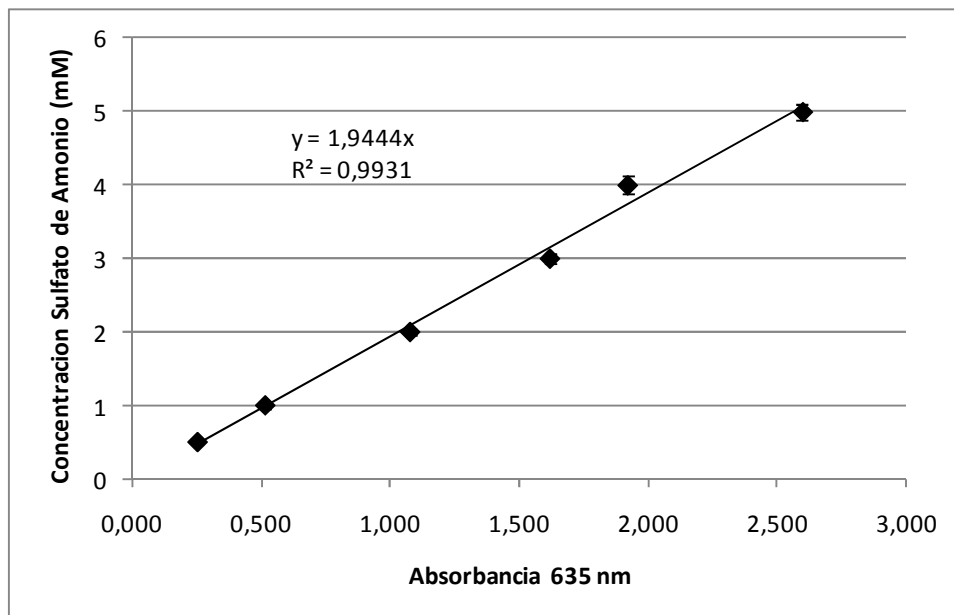


Figura A-1 Curva de calibración absorbancia vs. sulfato de amonio

Se prepararon estándares de calibración 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM de sulfato de amonio. Se realizó el ensayo de calibración por triplicado y en la gráfica se muestra el promedio de los 3 ensayos.

ANEXO B Error experimental de técnica de cuenta en placa

En la tabla se presenta el seguimiento de los valores de UFC para una fermentación de *B. subtilis* 83. El valor que se reporta es el promedio de la cuenta en placa de tres mediciones con su respectiva desviación estándar. El promedio de las desviaciones estándares durante el experimento se tomó como el valor del error experimental de la técnica empleada, en este caso su valor es aproximadamente del 30%.

Tabla A-1 Error experimental en técnica de cuenta en placa

Tiempo (h)	UFC/ml	SD (UFC/ml)	% Error
0	3,73E+08	4,62E+07	12
3	4,33E+08	5,77E+07	13
6	1,77E+09	1,15E+09	65
9	3,33E+09	6,11E+08	18
12	2,10E+09	9,17E+08	44
16	1,23E+09	6,81E+08	55
24	6,23E+09	7,37E+08	12
27	5,97E+09	4,73E+08	8
33	8,60E+09	6,08E+08	7
39	1,17E+10	3,66E+09	31
48	1,27E+10	2,58E+09	20
52	1,78E+10	1,03E+10	58
59	4,17E+10	1,29E+10	31
73	5,40E+10	1,57E+10	29
78	6,23E+10	2,42E+10	39
% Error Promedio			30

ANEXO C Curva de calibración de ácidos orgánicos y acetoína en HPLC

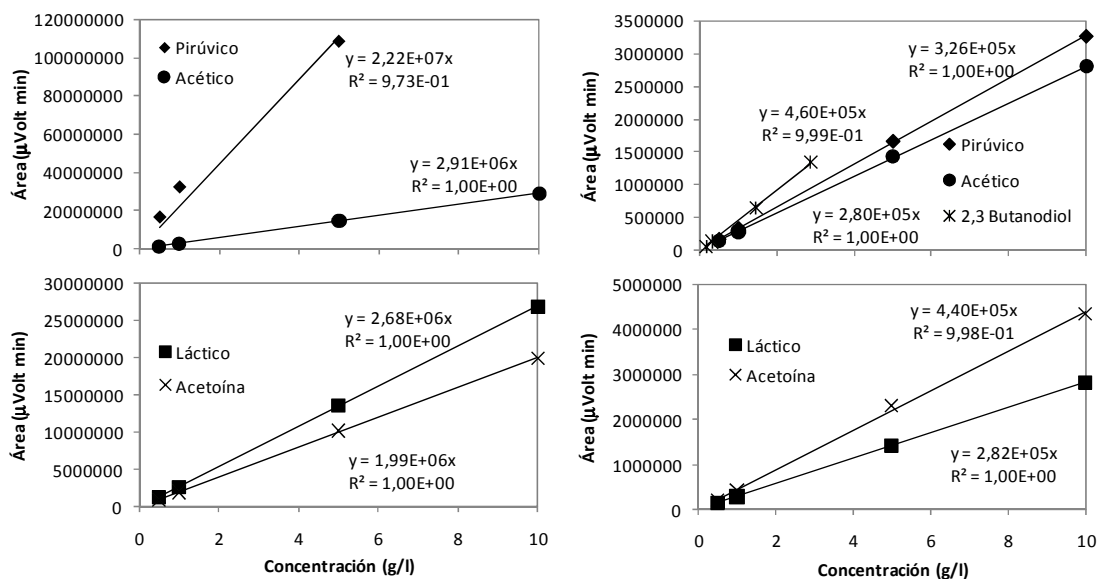


Figura A-2 Curvas de calibración de ácidos orgánicos. Izq) Ultravioleta; Der) Índice de refracción.

Se prepararon estándares de calibración de 0.5 g/l, 1 g/l, 5 g/l y 10 g/l de piruvato de sodio, ácido acético, ácido láctico, acetoína y 2,3-butanodiol.

ANEXO D Modelos experimentales. Concentración de células vegetativas y viabilidad

Modelo de cuenta viable

Los resultados de concentración máxima de células vegetativas viables, del diseño experimental de la sección 6.3.1, fueron analizados en el software *Design Expert 5.0.7* (Stat Ease Inc., MN, U.S.). El modelo empírico ajustado a los datos es el siguiente:

$$\frac{UFC}{ml} = 1.335 \times 10^9 + 5.580 \times 10^8 [C] + 2.303 [A][B][C]$$

El modelo está en términos de variables codificadas, donde: A=Glucosa; B=Sulfato de amonio; C= Sales

Con un coeficiente de correlación $R^2 = 76.6\%$.

Modelo de viabilidad

Los resultados de viabilidad del diseño experimental de la sección 6.3.1, fueron analizados en el software *Design Expert 5.0.7* (Stat Ease Inc., MN, U.S.). El modelo empírico ajustado a los datos es el siguiente:

$$\%Viabilidad = 0.58 - 0.13[B] + 0.12 [C] - 0.084[A][C] + 0.074[B][C] + 0.074[A]B[C]$$

Con un coeficiente de correlación $R^2 = 83.37\%$

ANEXO E Ejemplo de reproducibilidad de los experimentos

En las Figura A-3 – A5 se muestran la cinéticas de crecimiento de *B. subtilis* 83 en el cultivos en lote: Cultivo A, Cultivo B y Cultivo a TOD mínima de 10%. Se puede notar que, mediante el perfil que muestran las gráficas, los experimentos se comportan de manera similar, por lo que se puede decir que este cultivo fue reproducible.

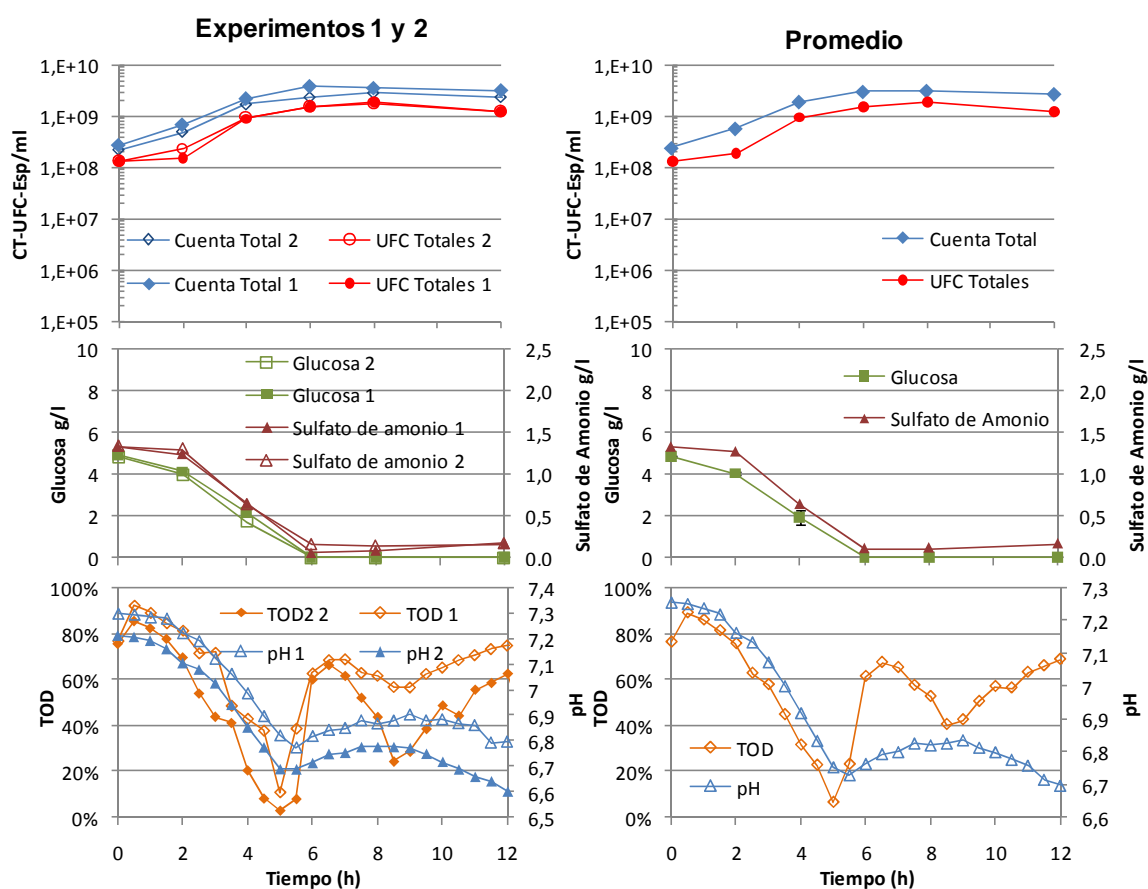


Figura A-3 Cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83. Cultivo A. Dos experimentos por separado.

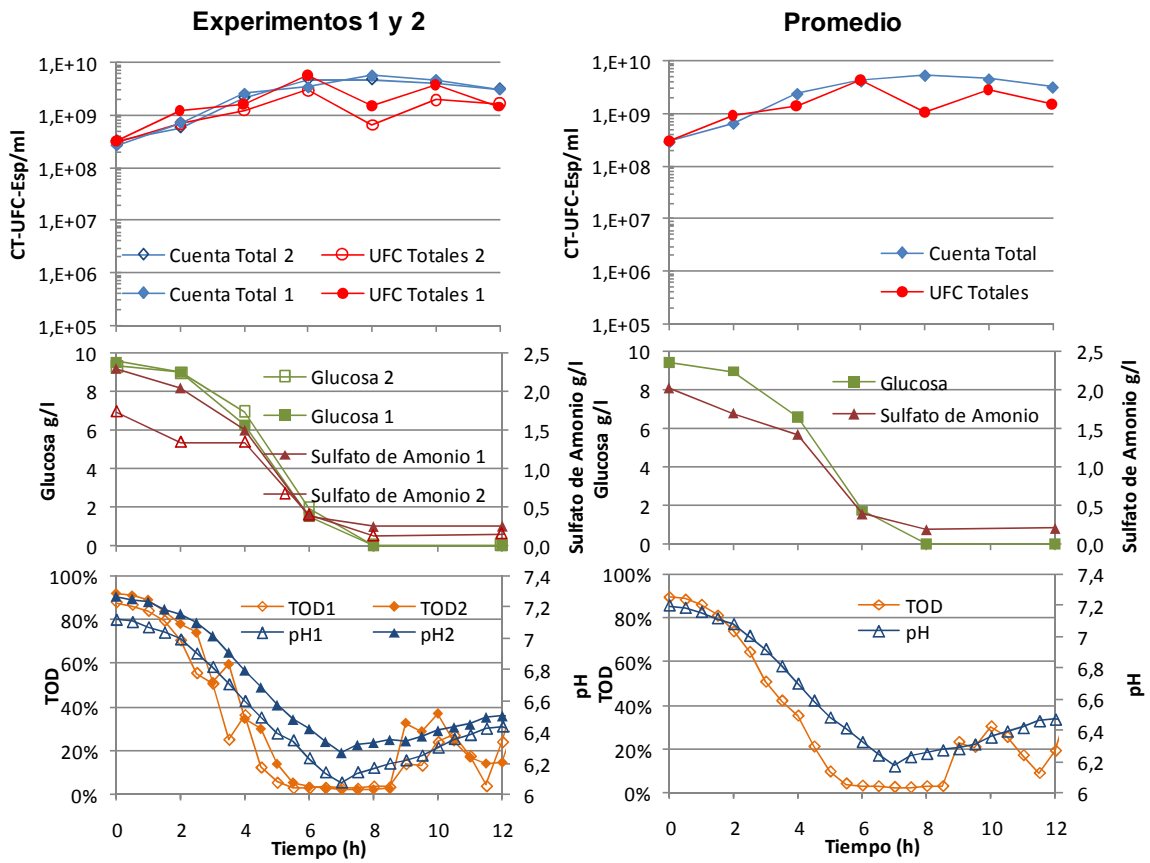


Figura A-4 Cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83. Cultivo B. Dos experimentos por separado.

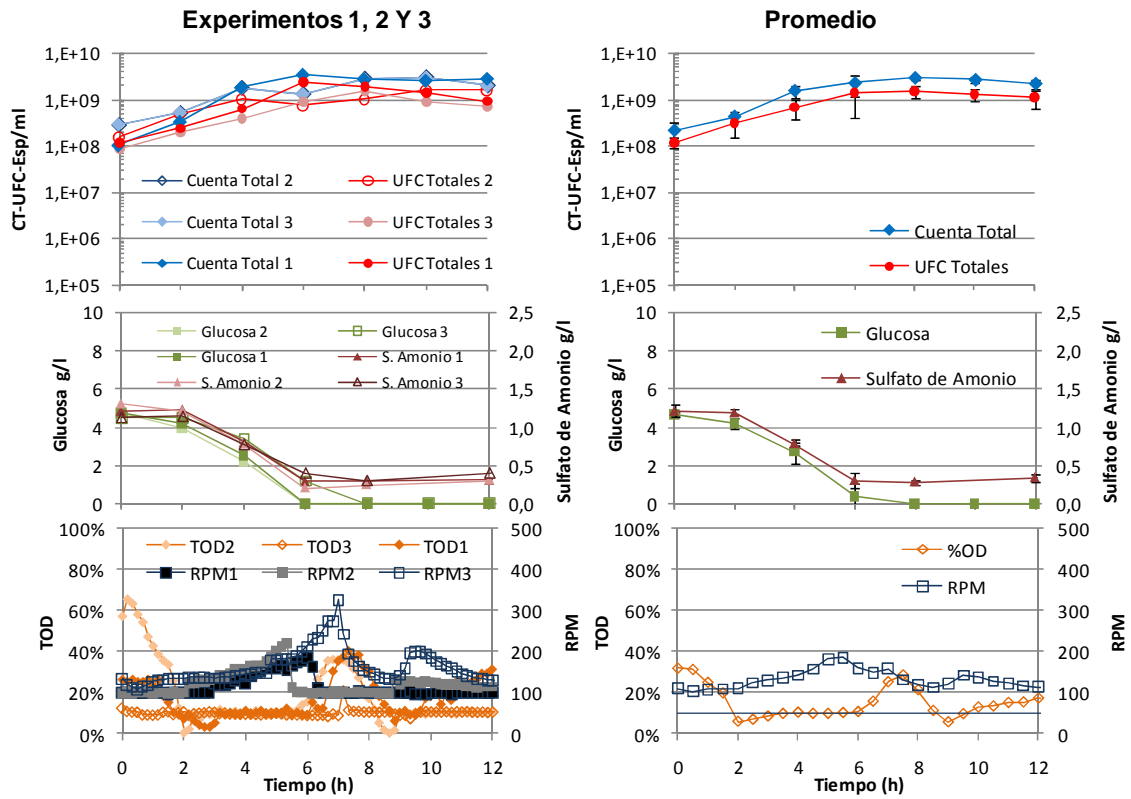


Figura A-5 Cinéticas de crecimiento de *Bacillus subtilis* 83 en cultivo en lote controlando la TOD a 10%. Tres experimentos por separado.

ANEXO F Flujos de alimentación

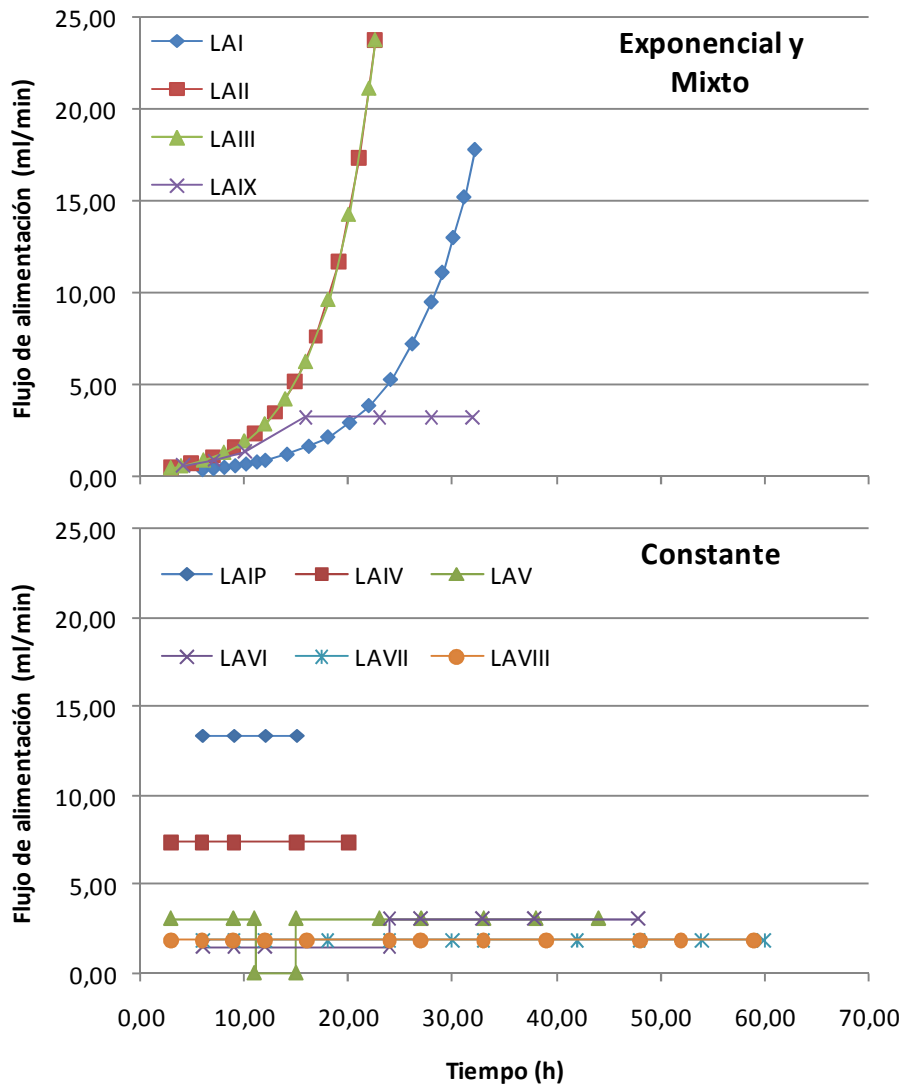


Figura A-6 Flujos de alimentación en cultivos alimentados

ANEXO G Cinéticas de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados

Lote Alimentado LAI

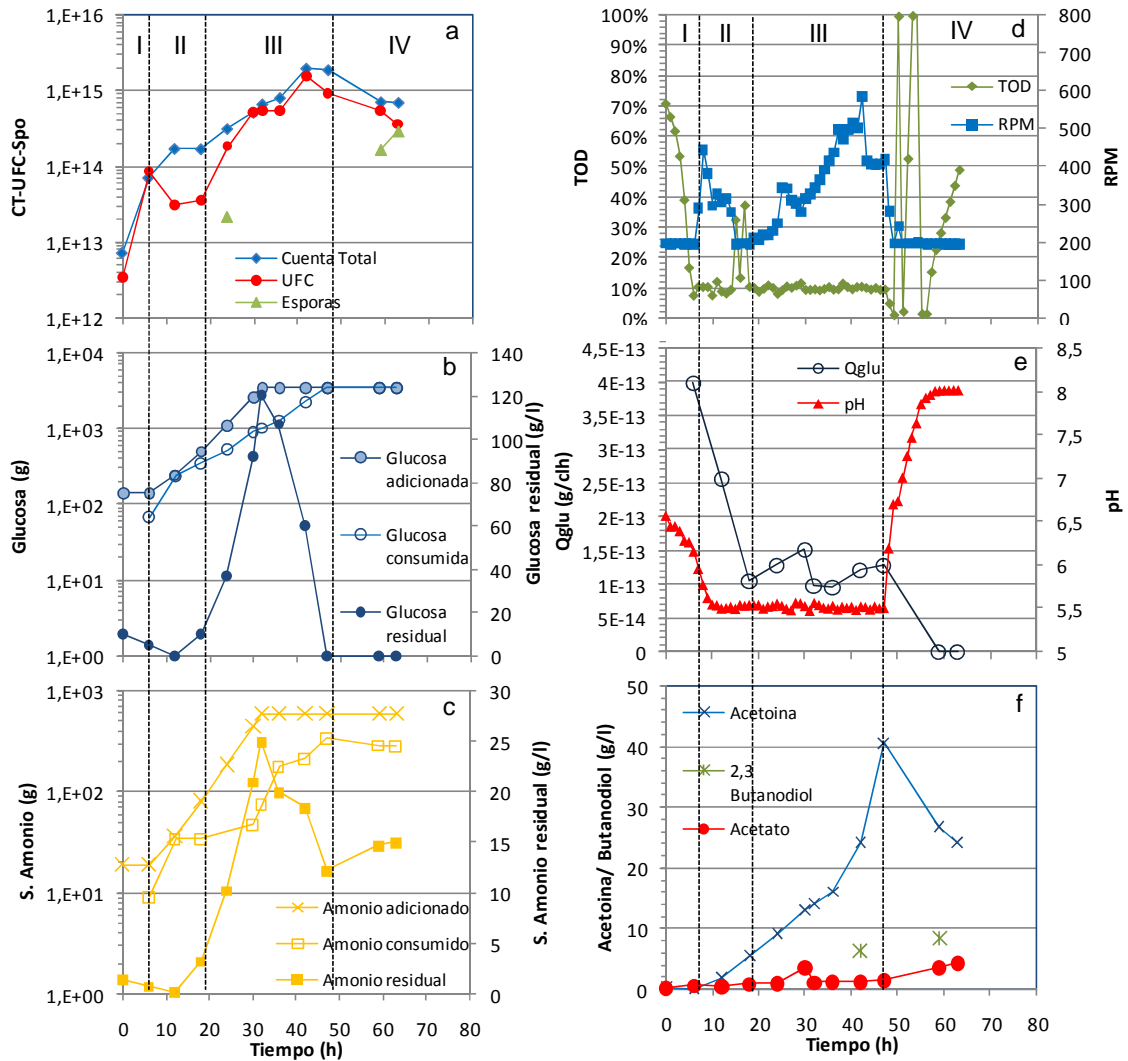


Figura A-7 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAI. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAII

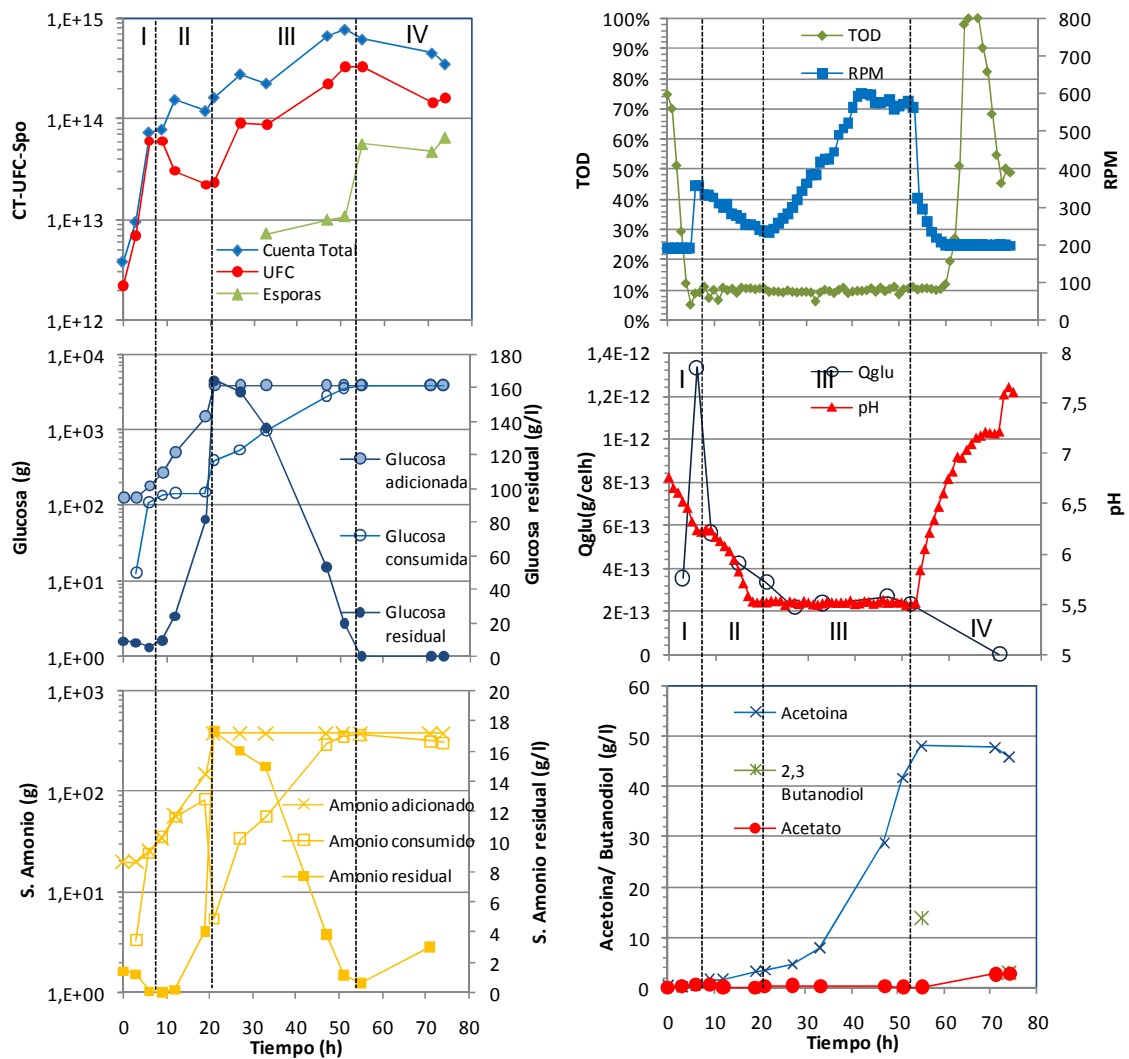


Figura A-8 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAIII

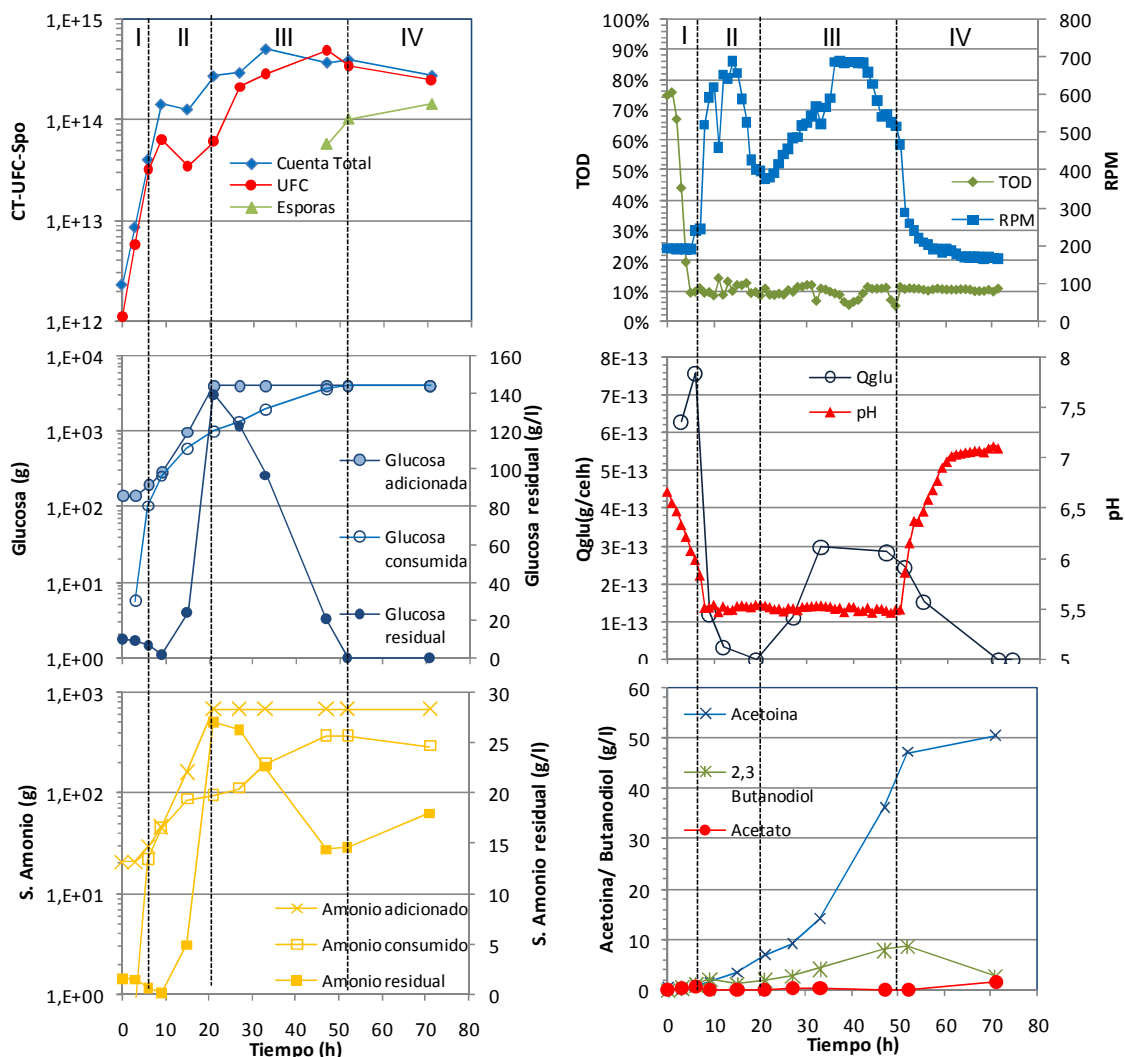


Figura A-9 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAIII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAIV

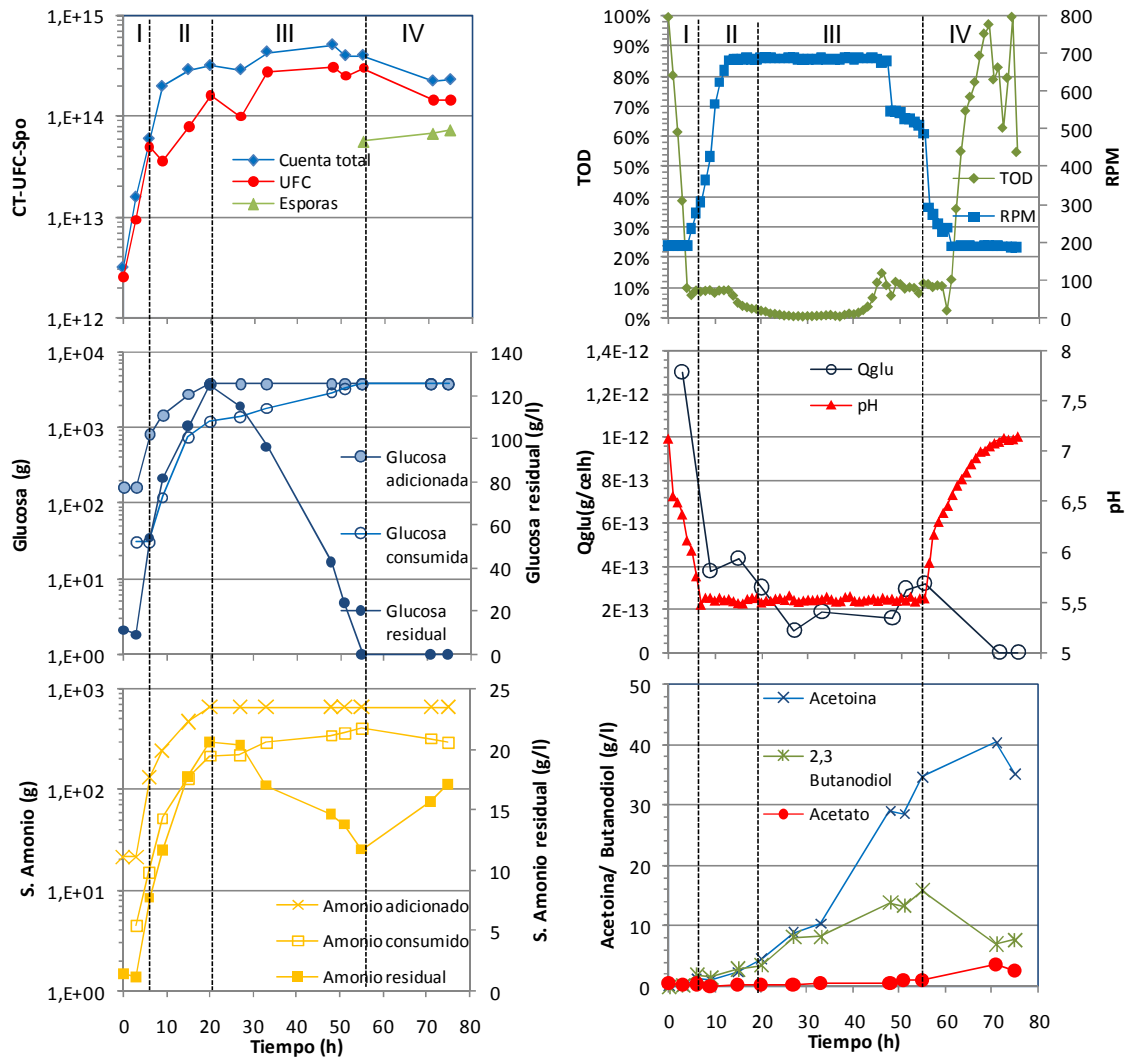


Figura A-10 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAIV. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAV

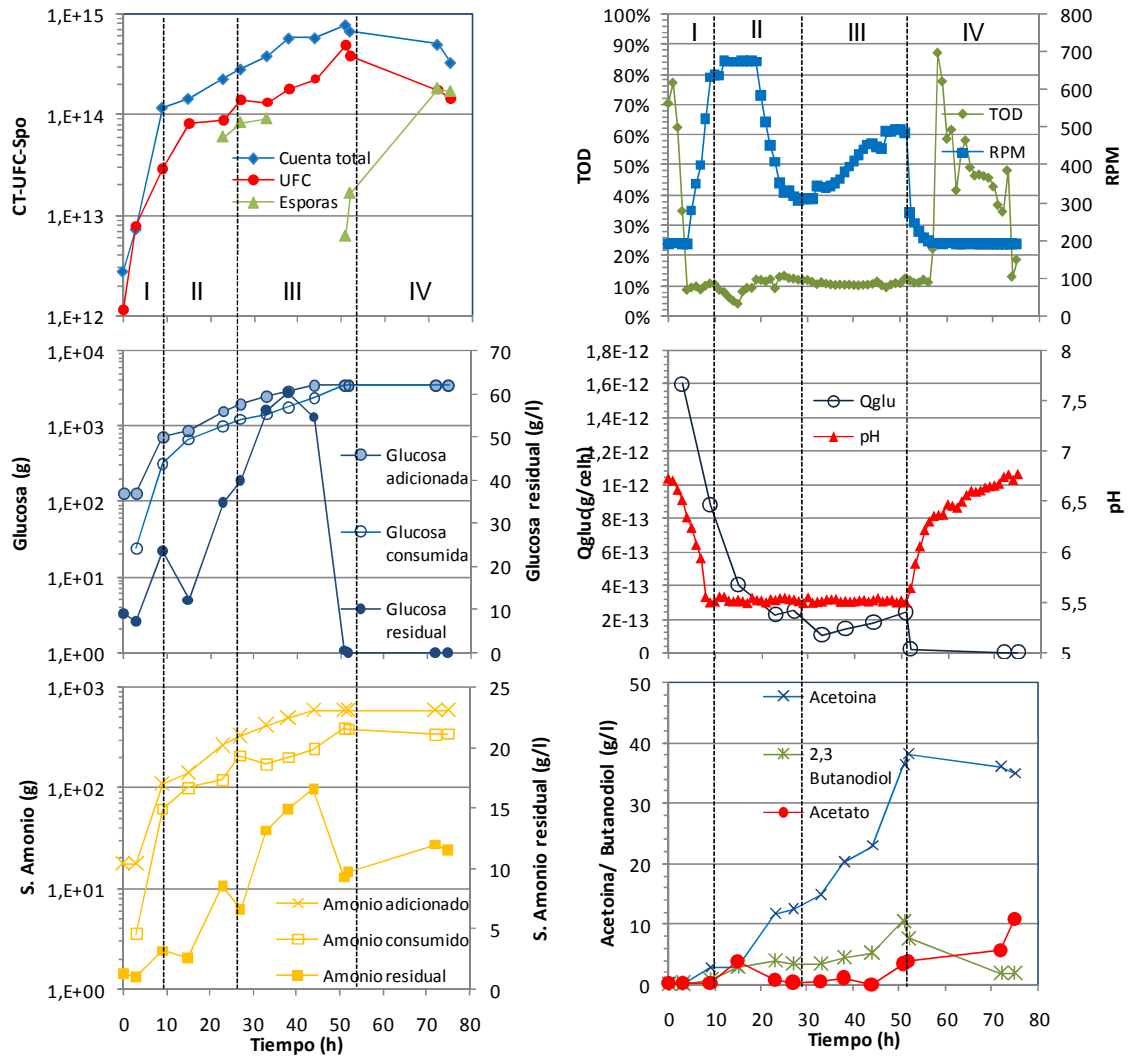


Figura A-11 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAV. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final..

Lote Alimentado LAVI

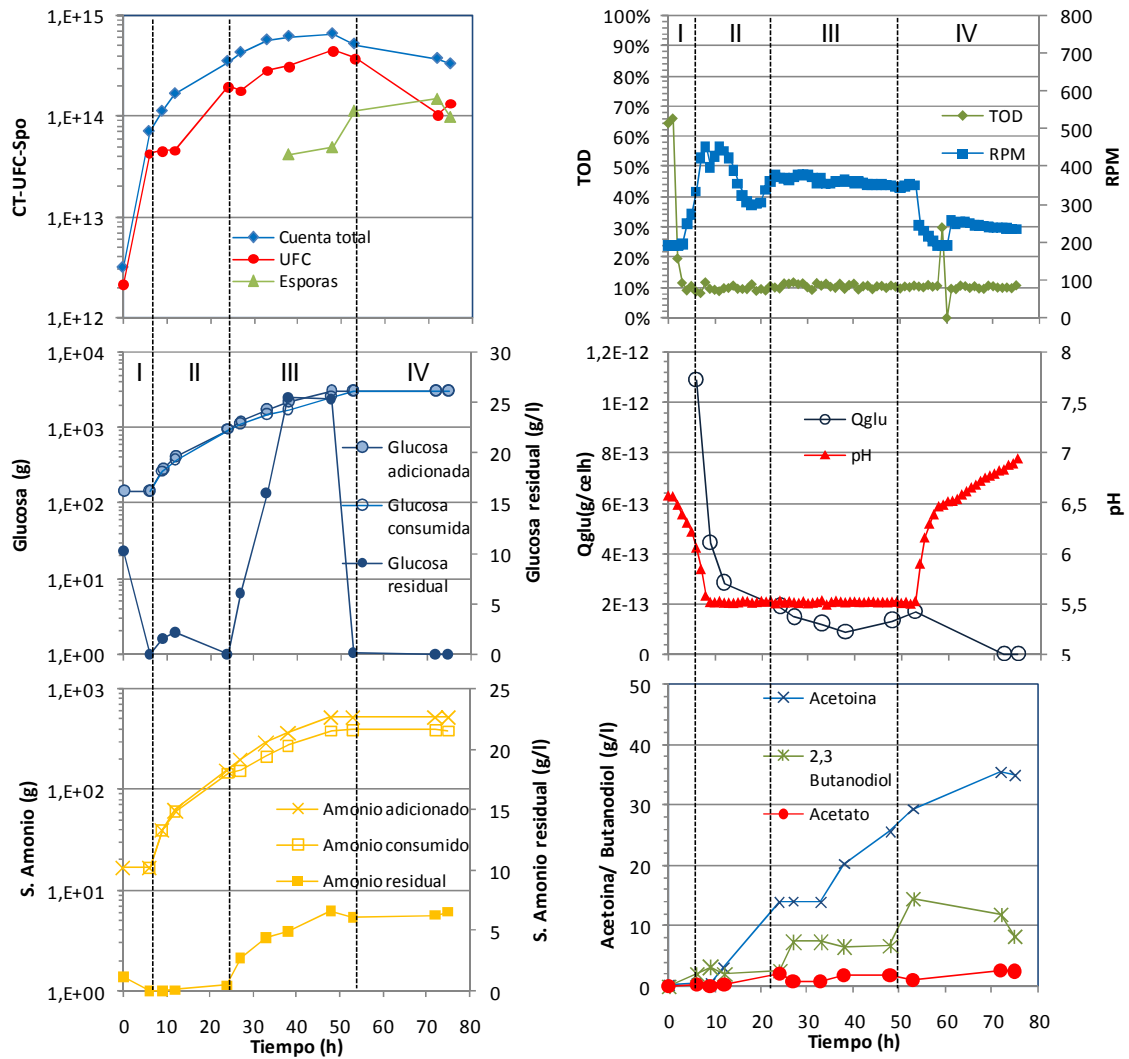


Figura A-12 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAVI. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAVII

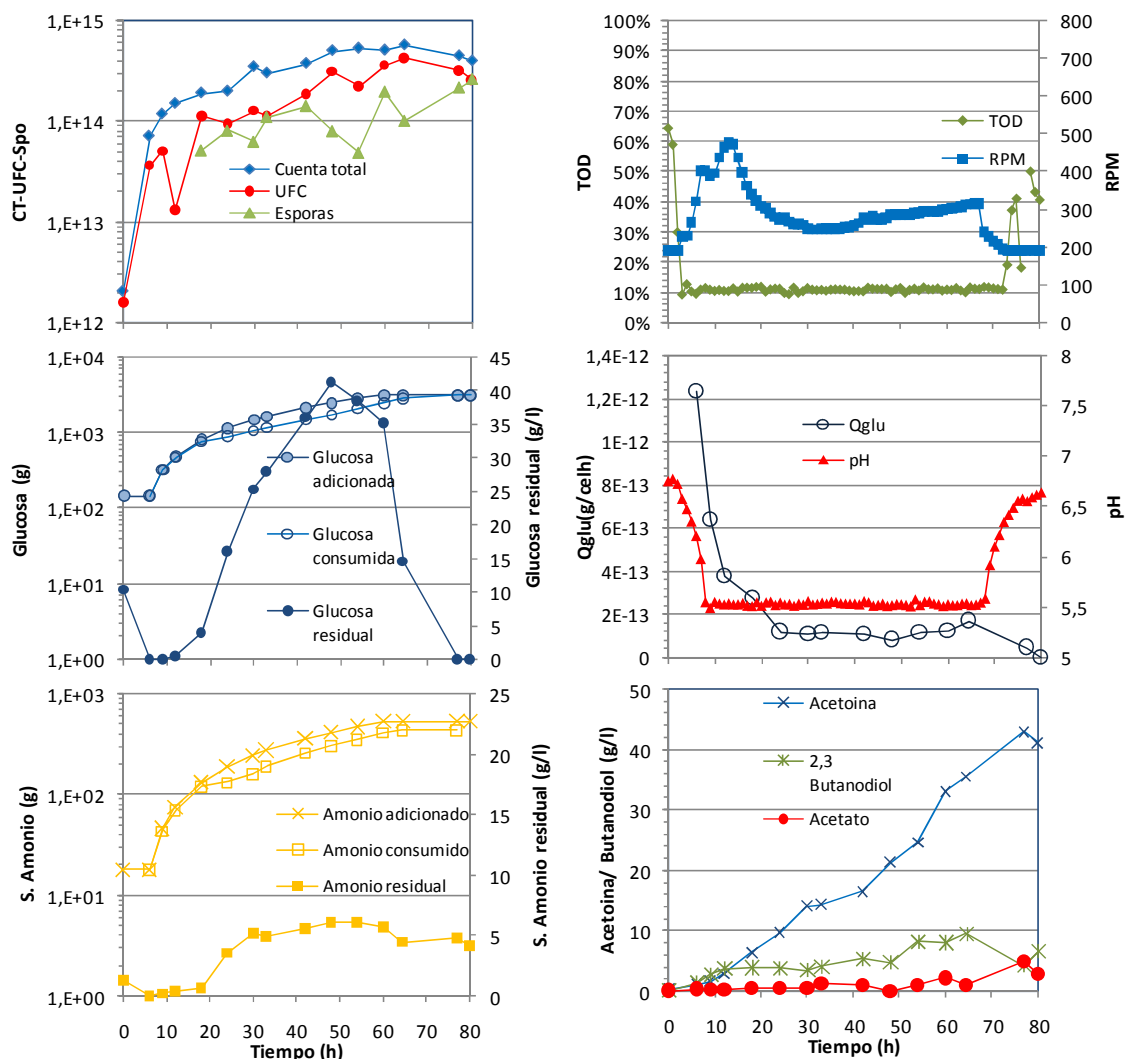


Figura A-13 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAVII. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAIX

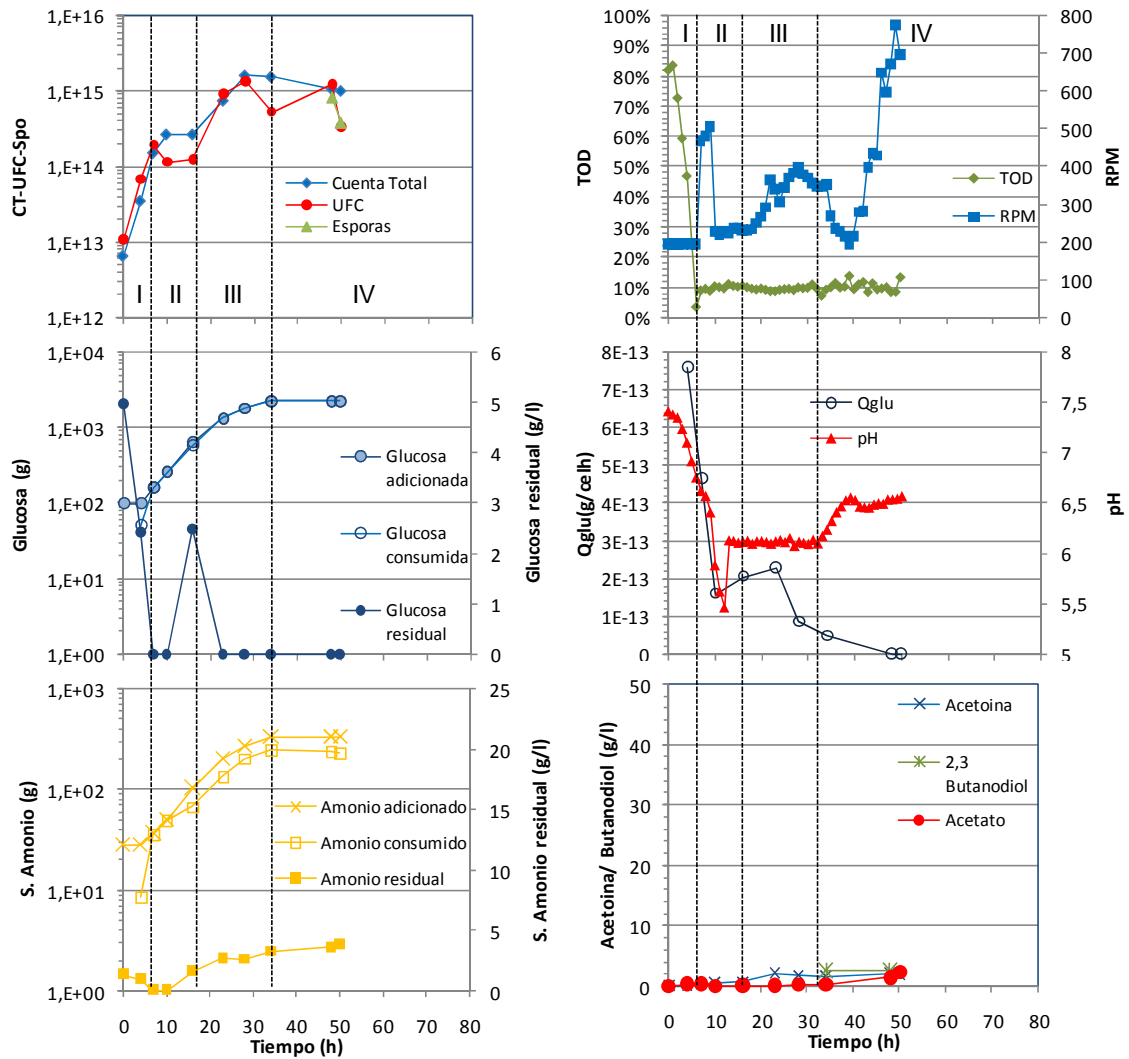


Figura A-14 Cinética de crecimiento y esporulación en cultivos alimentados LAXI. Fase I: Crecimiento vegetativo; Fase II: Estado de transición y primera esporulación; Fase III: Reanudación del crecimiento vegetativo; Fase IV: Fase estacionaria y esporulación final.

Lote Alimentado LAI

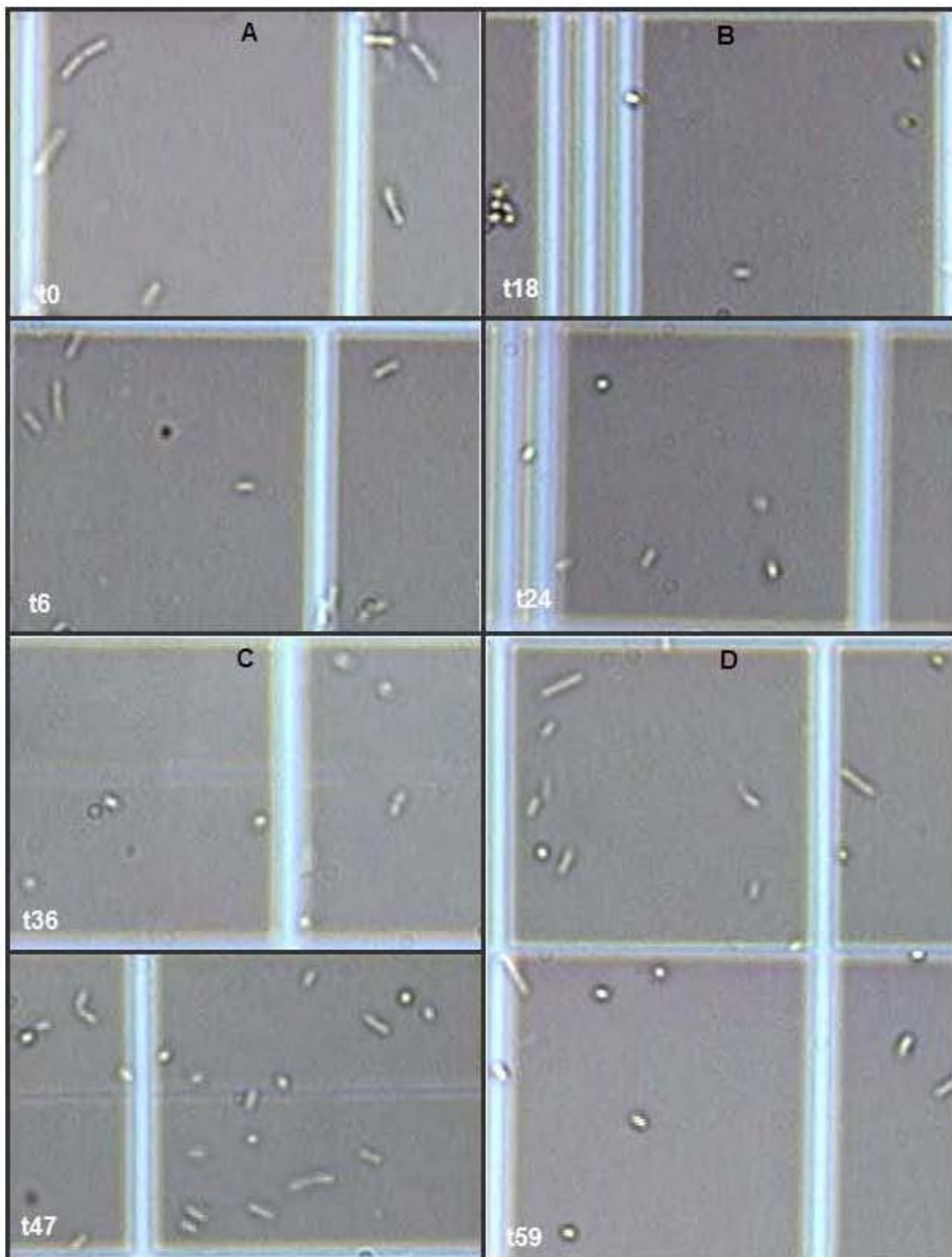


Figura A-15 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAI. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAII

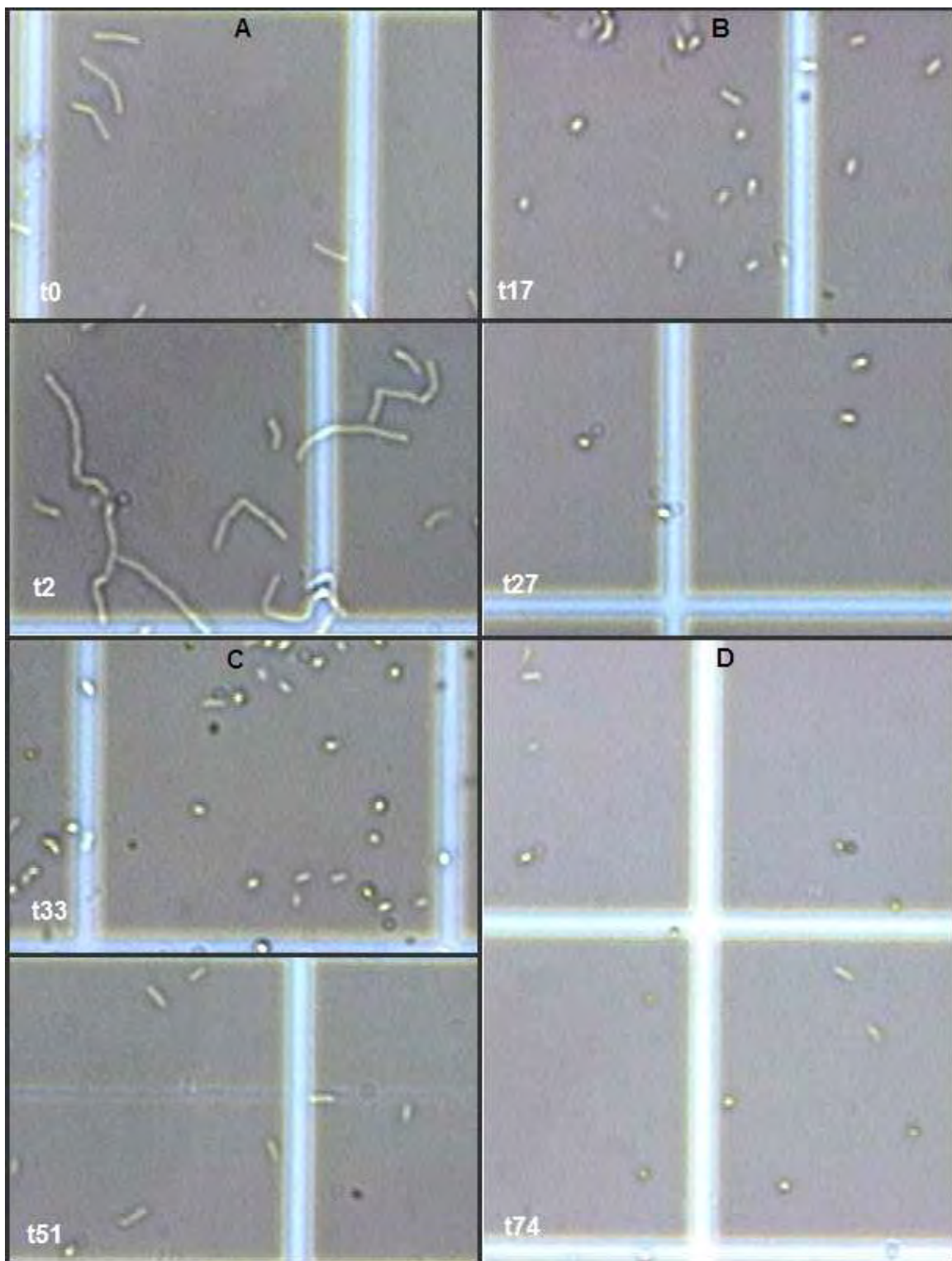


Figura A-16 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAII. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAIII

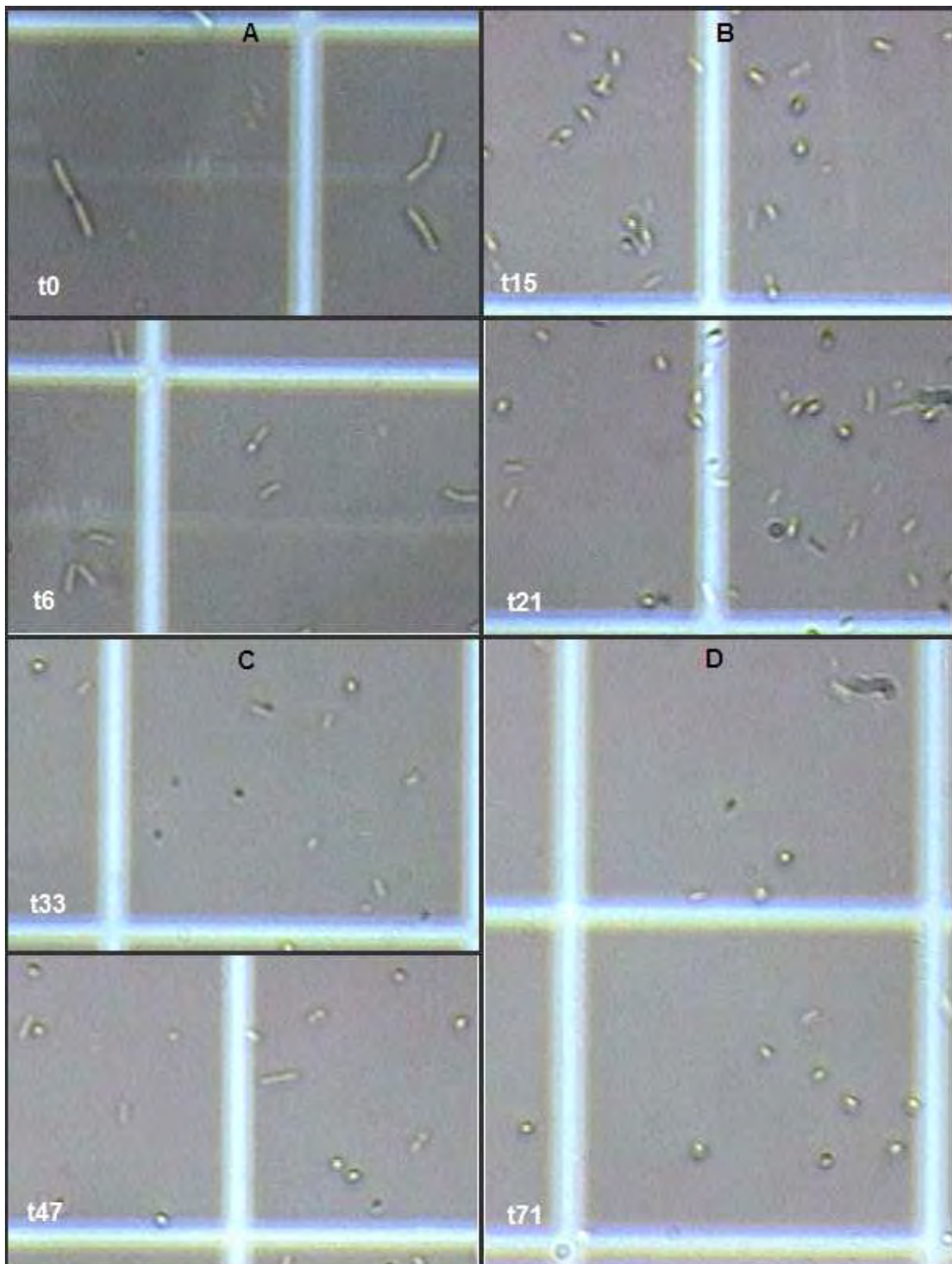


Figura A-17 Micrográficas 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAIII. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAIV

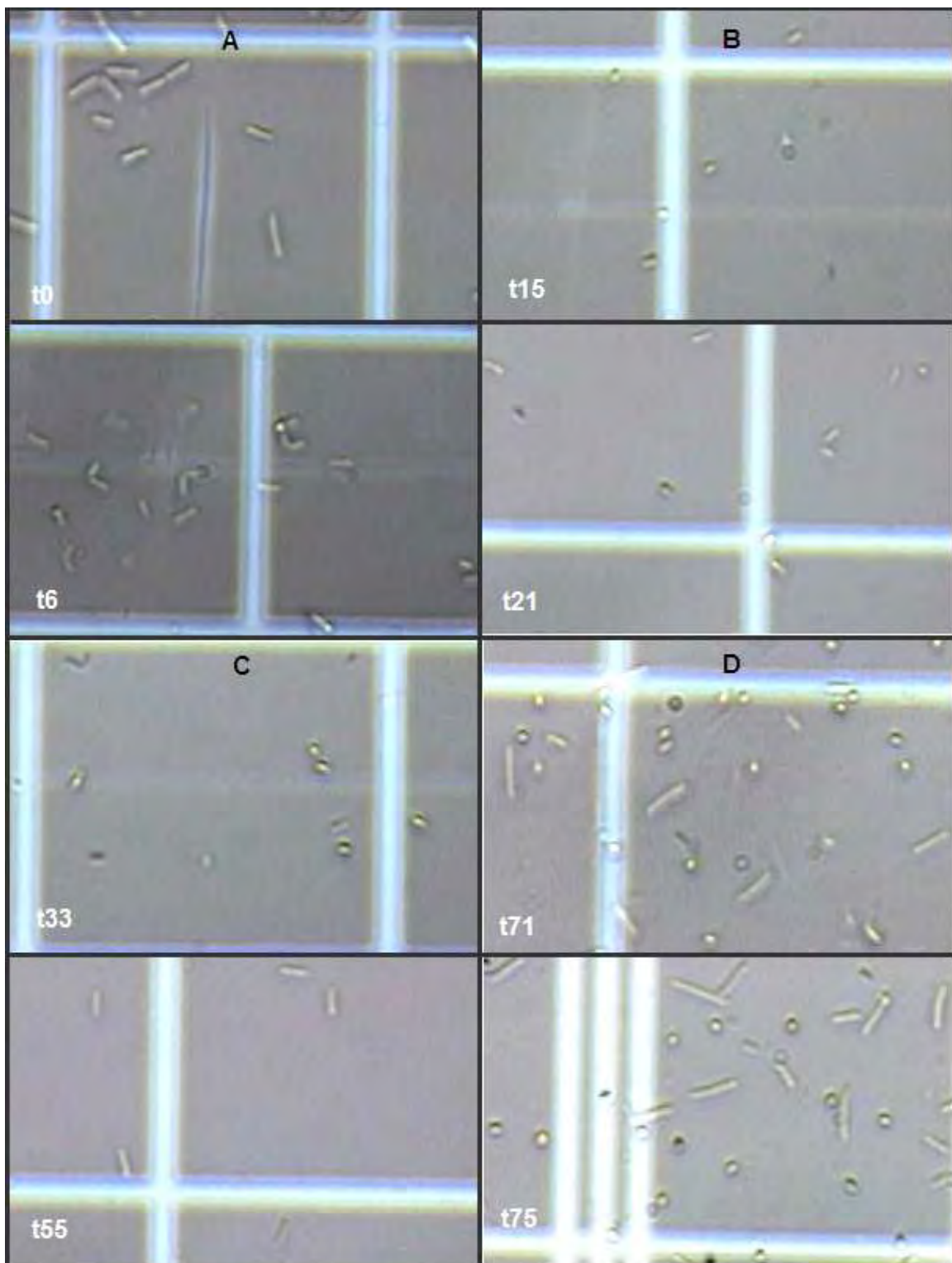


Figura A-18 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAIV. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAV

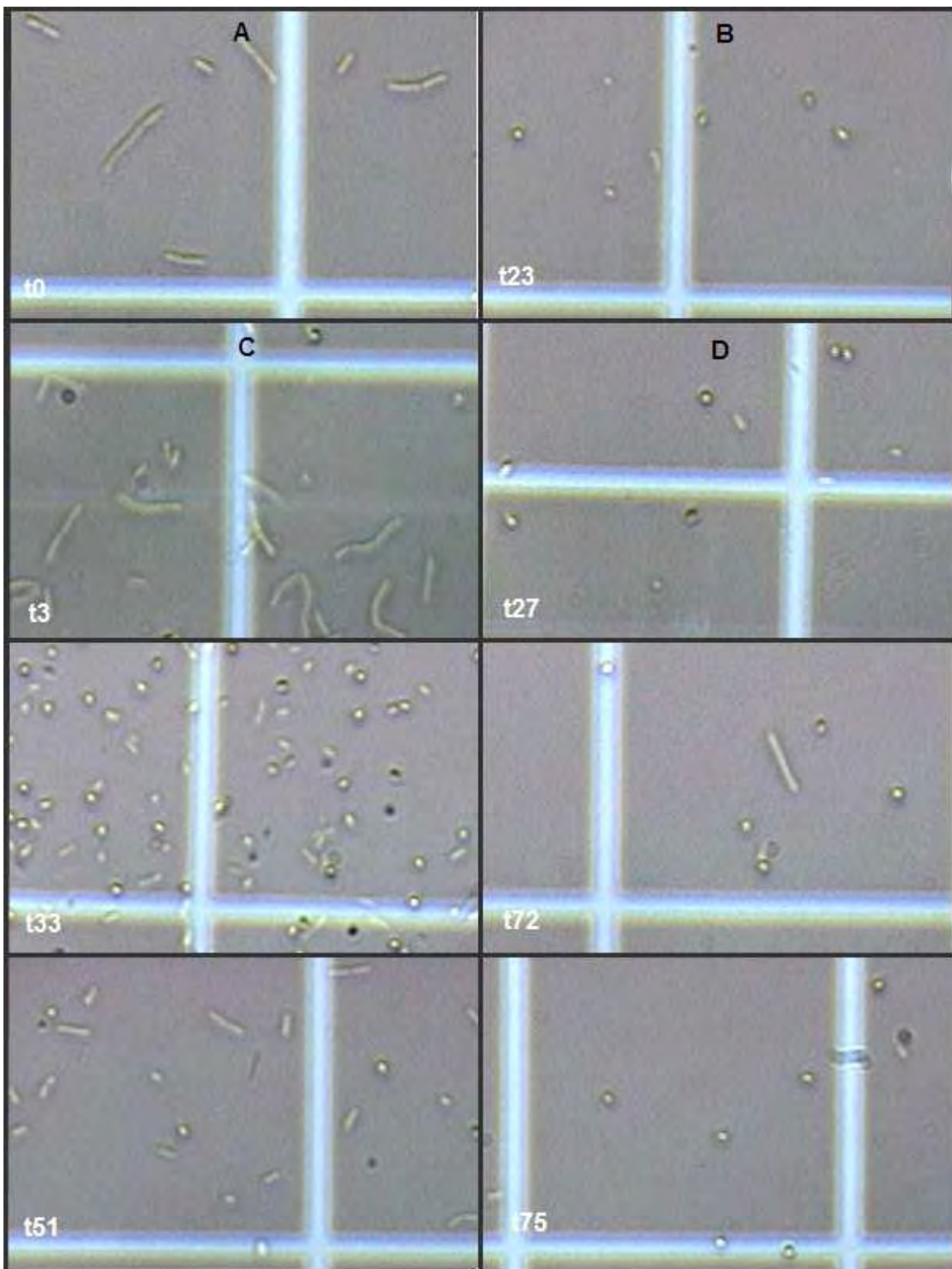


Figura A-19 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAV. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAVI

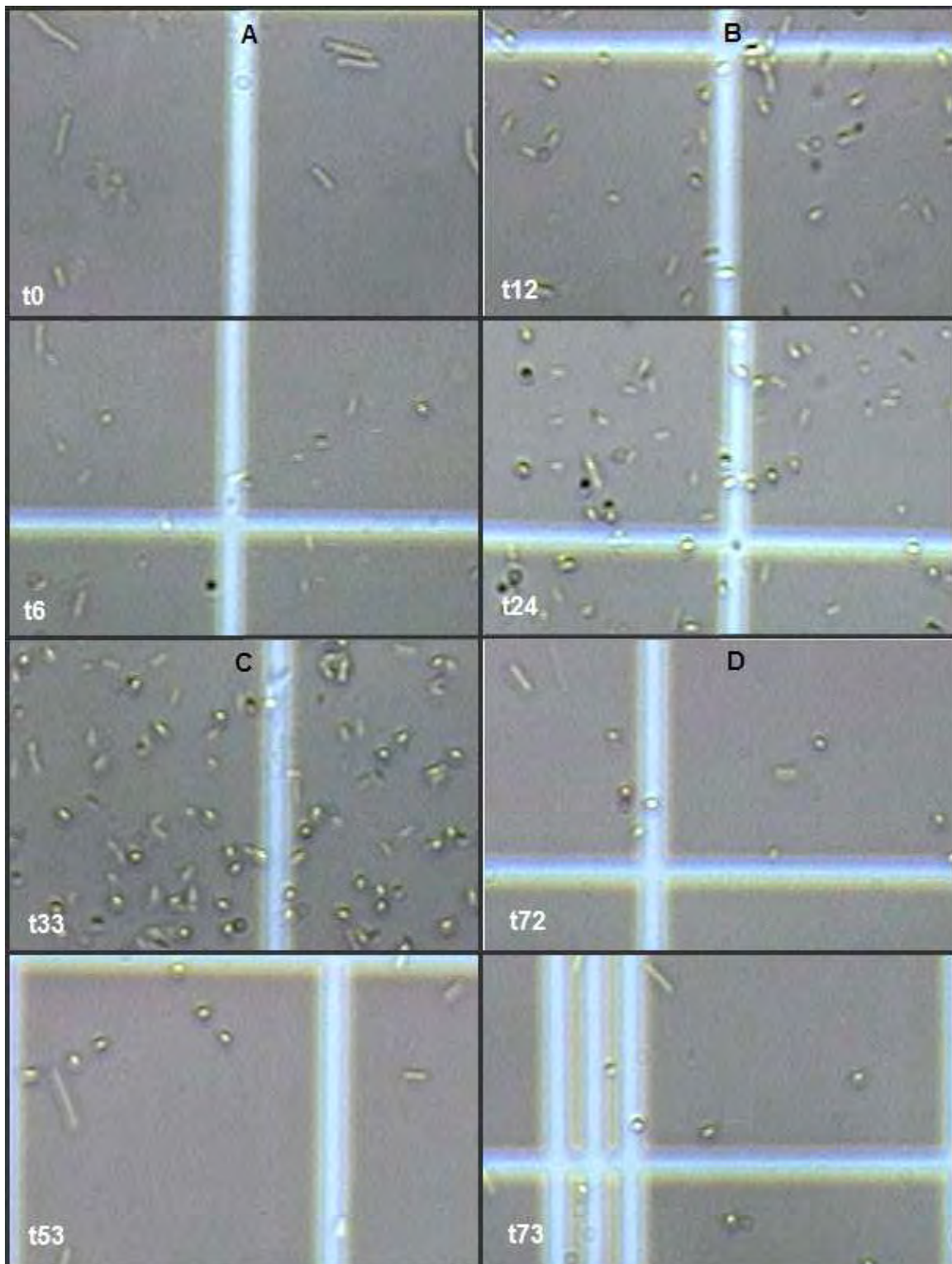


Figura A-20 Micrográficas 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAVI. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAVII

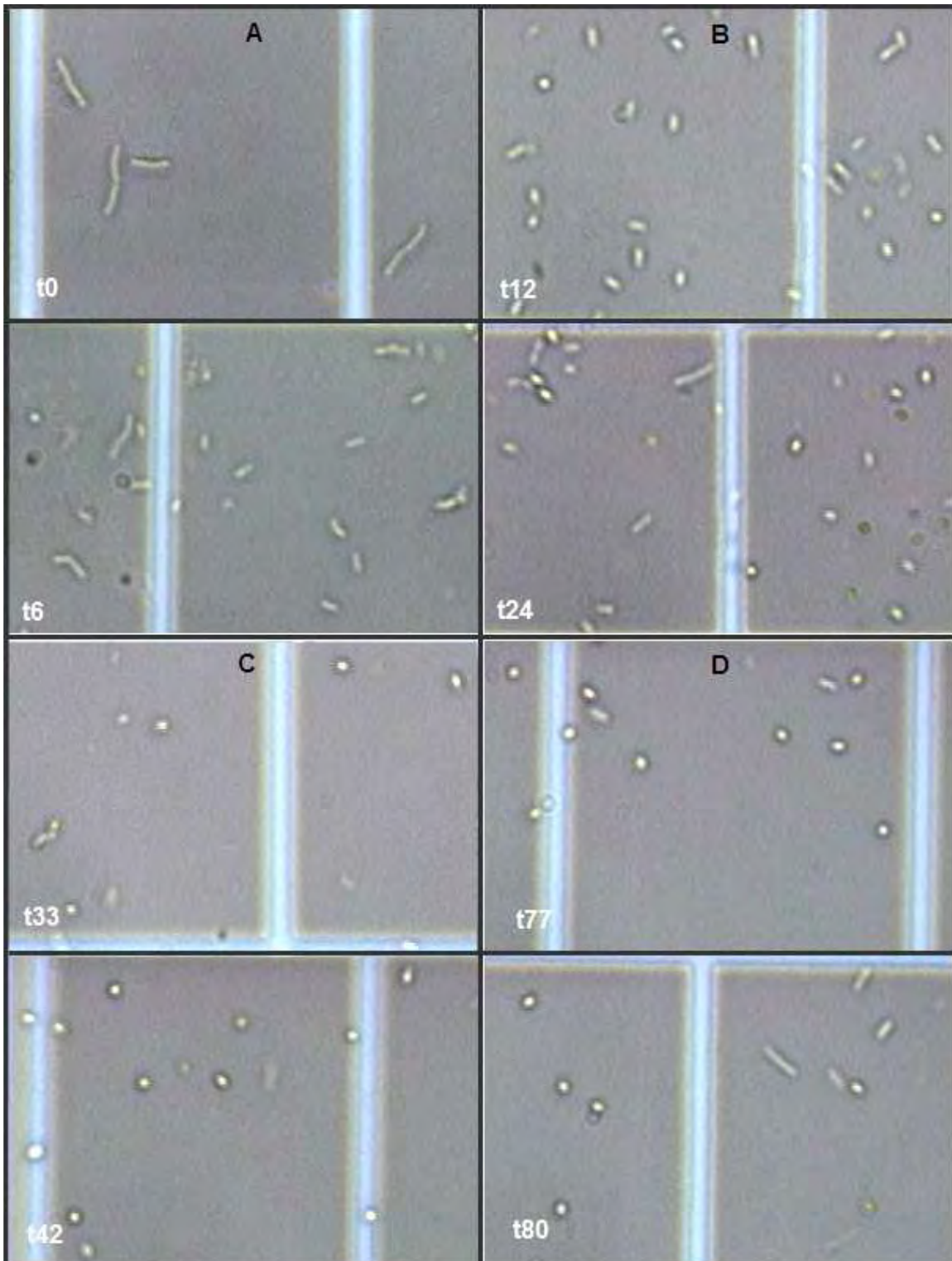


Figura A-21 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAVII. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

Lote Alimentado LAIX

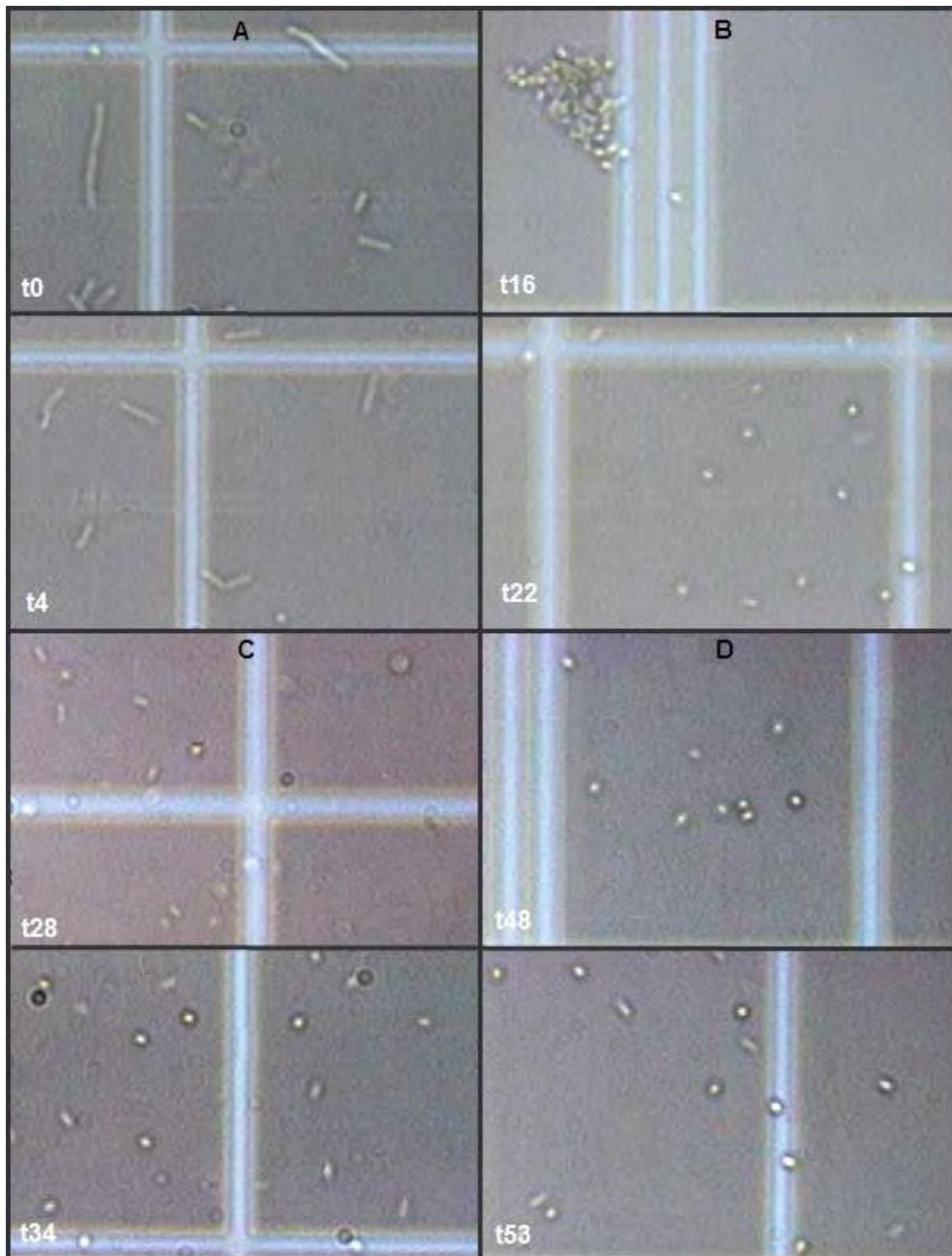


Figura A-22 Micrografías 40x al caldo del cultivo del lote alimentado LAIX. A) Fase I: células vegetativas largas; B) Fase II: disminución de tamaño y aparición de esporas; C) Fase III: población heterogénea; D) Fase IV: población heterogénea.

ANEXO I. Incremento de la viscosidad del caldo de cultivo y de la velocidad de agitación.

En los cultivos alimentados LAIV, LAV y LAIP, el incremento en la velocidad de agitación, fue correspondiente con el incremento en la viscosidad del medio. Los valores están medidos a una velocidad de corte de entre 200 s^{-1} .

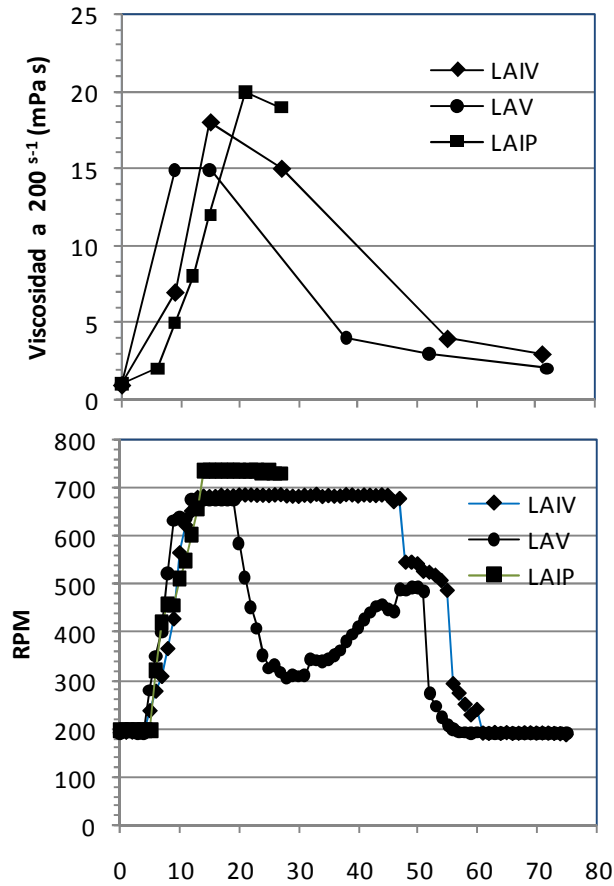


Figura A-23 Incremento de la viscosidad y la velocidad de agitación en cultivos alimentados