



## VIABILIDAD DE ESPORAS DE *Bacillus subtilis* 83 PRODUCIDAS EN CULTIVO EN LOTE

Daniela Morales y Enrique Galindo.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología/UNAM, Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. Fax: 052 (777) 3138811.

e-mail: [dmorales@ibt.unam.mx](mailto:dmorales@ibt.unam.mx)

*Palabras clave:* *B. subtilis* 83, Viabilidad, Eficiencia de esporulación.

**Introducción.** *B. subtilis* 83 genera esporas resistentes al calor y a la desecación y presenta características sobresalientes para su uso como agente de control biológico a nivel de laboratorio y de campo (1). Aunque se han desarrollado metodologías para la producción de esporas viables en cultivos lote con un medio mineral (2), no se conoce la eficiencia de esporulación ni la proporción de las esporas viables con respecto a las totales.

En el presente trabajo se estableció una técnica para determinar la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* 83 en cultivos en lote, utilizando un medio mineral.

**Metodología.** Se realizaron cultivos en lote para la producción de esporas viables de *B. subtilis* 83 en biorreactores de 4 L con un medio de cultivo mineral suplementado con glucosa (2). Para el análisis de la viabilidad de las esporas se cuantificaron las diferentes especies celulares presentes en el medio. La totalidad de las células está conformada por células vegetativas (viables y no viables) y esporas (viables y no viables). La viabilidad se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{[\text{esporas viables}]}{[\text{esporas totales}]} \times 100$$

La concentración de las células totales y esporas totales (viables y no viables) se determinó mediante un conteo directo en cámara de Neubauer, utilizando un microscopio acoplado a un sistema de cómputo que permite amplificar y digitalizar la imagen de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Sin este acoplamiento, normalmente las esporas no pueden ser contabilizadas a la magnificación con que se opera la cámara de Neubauer (40x). La concentración de las células viables totales (cél. vegetativas y esporas) se obtuvo mediante cuenta en placa. De la misma manera se determinó la concentración de las esporas viables, aunque previo a la inoculación en placa, las diluciones se sometieron a un tratamiento térmico en baño María a 85 °C durante 15 min. Las células vegetativas viables se obtuvieron mediante la diferencia entre las células viables totales y las esporas viables. La eficiencia de esporulación viable está dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Efic. de esp. (\%)} = \frac{[\text{esporas viables}]}{[\text{cél. vegetativas viables}]} \times 100$$

**Resultados y discusión.** La figura 1 muestra la cinética de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83 y la evolución de las diferentes especies celulares presentes durante la fermentación. La concentración de células totales de *B. subtilis* 83 aumenta dos órdenes de magnitud en 24 h y

corresponde aproximadamente con el aumento en las células viables. Al final del cultivo se obtuvo una concentración de esporas totales de  $1.98 \times 10^9$  esp/ml y de esporas viables de  $7.2 \times 10^8$  esp/ml. Por lo tanto, la viabilidad fue del 36.4 %. Por otro lado, la máxima concentración de células vegetativas viables que se logró fue de  $1.2 \times 10^9$  UFC/ml, por lo que la eficiencia de esporulación viable fue del 58.1 %. Estos valores son relativamente bajos y proporcionan un amplio margen de mejora, lo que traería ventajas, incluyendo la disminución de los volúmenes necesarios de fermentación y sus tiempos de uso, significando menores costos de producción y de inversión.

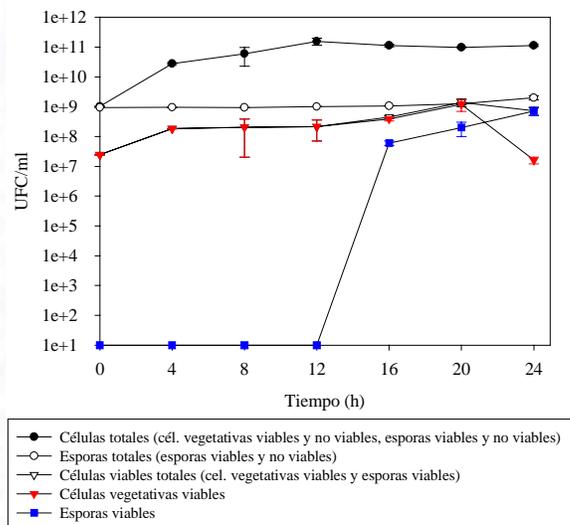


Fig.1 Cinética de crecimiento y esporulación de *B. subtilis* 83.

**Conclusiones.** Se implementó una técnica para determinar la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* 83 y se determinó que bajo las condiciones utilizadas, la viabilidad fue del 36.4 % y la eficiencia de esporulación de 58.1 %.

**Agradecimientos.** Apoyo financiero de los proyectos SAGARPA/CONACyT 741 y DGAPA IN216905.

### Bibliografía

- Carrillo-Fasio, A., Allende-Molar, R., García-Estrada, R., Carrillo-Hurtado, R., Patiño-Vera, M. y Galindo, E. (2005). Control biológico de antracnosis del mango ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1): 24-32.
- 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.