



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



CRECIMIENTO VEGETATIVO Y ESPORULACIÓN DE *Bacillus subtilis* 83 EN MEDIO MINERAL EN CULTIVOS SUMERGIDOS EN LOTE Y LOTE ALIMENTADO

Sergio Andrés Cristiano Fajardo, Leobardo Serrano Carreón, Enrique Galindo Fentanes

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, Morelos. C. P 62250 México. Fax (52) (777) 313-8811 sacristi@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Bacillus subtilis* 83, lote alimentado, esporulación.

Introducción. La bacteria gram positiva *Bacillus subtilis*, es conocida por su capacidad antagónica frente al patógeno causante de la antracnosis en el mango (1). Su uso preferente se basa en la capacidad de formar esporas, ideales para la formulación de agentes de control biológico, de tal manera que puedan prolongar su viabilidad durante largos periodos de tiempo y actuar efectivamente luego de su aplicación en campo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el proceso de producción de esporas de la cepa *B. subtilis* 83 por cultivos en lote y lote alimentado. Se evaluó el crecimiento de la cepa en un medio de cultivo mineral suplementado con glucosa bajo una tensión de oxígeno disuelto mínima a mantener durante el cultivo en la etapa de lote y lote alimentado.

Metodología. La bacteria se desarrolló en un medio de cultivo mineral suplementado con glucosa y con las sales del medio de esporulación de Schaeffer (2). Los cultivos se llevaron a cabo en fermentadores de 10L a velocidad de agitación constante de 230 rpm (TOD>20%) y en fermentadores de 30L con control retroalimentado de oxígeno disuelto por variación de la velocidad de agitación (lote C y lote alimentado). La solución de alimentación estuvo compuesta por glucosa y sulfato de amonio a 500g/L y 85 g/L, respectivamente y se efectuaron pulsos de las demás sales del medio en dos ocasiones durante la alimentación. En cada ensayo se determinaron glucosa y amonio residual, así como la concentración de células totales (en cámara de Neubauer), unidades formadoras de colonia (UFC) y esporas viables (por cuenta en placa, en medio YPG).

Resultados. En la tabla 1 se presenta un resumen de los cultivos en lote y del lote alimentado. En los lotes A y B, se varió la concentración inicial de glucosa y la relación carbono/nitrógeno con el fin de obtener los mayores rendimientos de células vegetativas. El cultivo B presentó un incremento en el rendimiento de glucosa en UFC de 3 veces con respecto al cultivo A. El lote C mantuvo las concentraciones iniciales de sustrato del lote B pero se controló la TOD a un valor mínimo de 10% durante gran parte de la fermentación. No se observó limitación por oxígeno y se mejoró el gasto energético ya que la velocidad de agitación de este cultivo se mantuvo entre 100 y 190 rpm, frente a las 230 rpm constantes del cultivo B. Los resultados del lote C son similares al lote B, por lo cual se escogió la TOD al 10% como criterio operativo mínimo en el lote alimentado (y su

escalamiento a 30L), con el fin de suplir completamente la demanda de oxígeno durante el cultivo a una potencia menor. Todos los cultivos en lote fueron limitados por glucosa, la fase de crecimiento vegetativo se extendió durante las primeras 8 horas, y posteriormente se dio la etapa de esporulación que tomó en promedio 16 horas.

Tabla 1. Datos cultivos en lote y lote alimentado de *Bacillus subtilis*

VARIABLE	LOTE A	LOTE B	LOTE C	ALIMENTADO
Características	10 g/l glucosa, 4g/l sulfato amonio	5 g/L glucosa, 1 g/L sulfato de amonio		Limitación glucosa, pH - 6.3. TOD>10%
		230 rpm, TOD>20%	[100-190] rpm TOD>10%	
Esporas Viables(spo/ml) $\times 10^{10}$	0.05	0.03	0.02	3.13
UFC(ce/ml) $\times 10^{10}$	0.10	0.19	0.16	5.40
Y (spo/gglug) $\times 10^{12}$	0.05	0.07	0.04	0.37
Y (UFC/ggluc) $\times 10^{12}$	0.10	0.38	0.32	0.63
Tiempo de Proceso (h)	24	24	24	48
Productividad esporas (spo/Lh) $\times 10^{10}$	1.9	1.4	0.8	65.2

En el cultivo alimentado la fase lote se llevó a cabo durante las primeras 4 horas, seguidos de la alimentación por 30 horas. La fase de esporulación se llevó a cabo en 16 horas posterior al fin de la alimentación. Las máximas concentraciones alcanzadas en este trabajo corresponden al cultivo en lote alimentado y fueron de 5.4×10^{10} UFC/ml y 3.13×10^{10} spo/ml. Estos resultados son mayores a los valores máximos reportados en la literatura para la concentración de esporas producidas por diferentes cepas de *B. subtilis* (3).

Conclusiones. El cultivo en lote alimentado es una opción factible para lograr altas concentraciones celulares y de esporas. El proceso desarrollado en este trabajo incrementa con respecto al lote el rendimiento de glucosa en esporas en un orden de magnitud y la productividad del proceso se mejora en 34 veces.

Agradecimiento. Proyecto financiado por la DGAPA-UNAM IN222010.

Bibliografía

- Serrano, L. y Galindo, E. (2007). *Ciencia*, 58: 77-88.
- Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J.-P. (1965). *PNAS USA*, 54:704-711.
- Chen, Z.M, Li,Q., Liu H.M., Yu, N., Xie, T.J., Yang, M.Y., Shen, P. and Chen, X.D. (2009). *App Microbio Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-009-2162-x.