

Evaluación de medios de cultivo y condiciones operacionales de fermentación para la producción masiva de *Bacillus subtilis* en cultivo sumergido

Ivia Montaña¹; Mayra Claros²; Noel Ortuño²

¹ Estudiante de Ingeniería Agroindustrial FCAyP-UMSS; ² Fundación PROINPA

E mail: n.ortuno@umss.edu.bo

Resumen. En el presente trabajo se evaluaron diferentes medios de cultivo líquidos en dos etapas y las condiciones operacionales de fermentación para la producción masiva de *Bacillus subtilis*. En la *etapa I*, la concentración de esporas viables (UFC/ml), fue mayor para el agua proveniente de la extracción del almidón de papa (AP). En la *etapa II*, al evaluar flujos volumétricos constantes de aire, se obtuvo mayor concentración de esporas viables con 1,5 y 1,0 vvm, $3,33 \cdot 10^8$ UFC/ml al sexto día y $2,04 \cdot 10^8$ UFC/ml al octavo día. Todas las velocidades de agitación presentaron un rendimiento significativamente menor comparado con el obtenido por 1,5 vvm, siendo la mejor 150 rpm con $2,54 \cdot 10^4$ UFC/ml al décimo día. Cuando se evaluó 1,0 vvm con las velocidades de agitación, de manera combinada, el mejor tratamiento fue 1,0 vvm - 200 rpm, con una concentración de esporas viables de $2,83 \cdot 10^8$ UFC/ml al octavo día.

Palabras clave: Biotecnología; Esporas; Bacterias; Bio inoculantes

Summary: Evaluation of growth media and operational ferment conditions for mass production of *Bacillus subtilis* in submerged crop. In the present work, different liquid growth media were evaluated in two stages as well as the operational ferment conditions for mass production of *Bacillus subtilis*. In stage I, the concentration of viable spores (CFU / mL) was higher for water obtained from potato starch extraction (AP). In stage II, when evaluating constant volumetric flows of air, a higher concentration of viable spores was obtained with 1,5 and 1,0 vvm, $3,33 \cdot 10^8$ CFU/ ml on the sixth day and $2,04 \cdot 10^8$ CFU/ ml on the eighth day. All stirring speeds showed a significantly lower performance compared to that obtained by 1,5 vvm, being 150 rpm the best one with $2,54 \cdot 10^4$ CFU/ ml on the tenth day. When 1,0 vvm was evaluated with stirring speeds, combined manner, the best treatment was 1,0 vvm - 200 rpm, with a viable spore concentration of $2,83 \cdot 10^8$ CFU / ml on the eighth day.

Keywords: Biotechnology; Spores; Bacteria; Bio inoculants

Introducción

En los últimos años, en la mayoría de los países latinoamericanos, se ha optado por el uso de insumos biológicos como una alternativa amigable al medio ambiente; de esta manera se ha seguido un protocolo desde el aislamiento de los microorganismos hasta la estandarización del pro-

ceso productivo a nivel de laboratorio y posteriormente su producción en masa.

En muchos de estos países la producción industrial de estos bioinoculantes está estandarizada y tecnificada en todos sus procesos involucrados. En Bolivia, solo algunas empresas ofrecen este tipo de productos; es así que Biotop SRL en

cooperación con la Fundación PROINPA, vienen produciendo una variedad de insumos biológicos en base a bacterias y/o hongos benéficos, y aunque se han evaluado diferentes medios de cultivo para producir estos microorganismos, se han enfrentado a una serie de problemas en la producción masiva, debido a diferentes restricciones por el volumen y condiciones de producción, relacionados esencialmente con la transferencia de oxígeno, ocasionando variaciones en la tasa de multiplicación de los mismos.

Brock y Madigan (1993), sostienen que en fermentaciones industriales aeróbicas, es indispensable una transferencia efectiva de oxígeno, y que si se reduce la aeración, aún durante un período corto, el cultivo puede experimentar una anaerobiosis parcial con serias consecuencias en términos del rendimiento del producto.

Bacillus subtilis es un microorganismo inocuo utilizado en la producción comercial, ya que posee una reconocida actividad antimicrobiana, lo cual ha permitido emplearlo como un agente de control biológico (Ojeda, 2007).

Cristiano *et al.* (s/f) mencionan que el uso de *B. subtilis* se basa preferentemente en su capacidad de formar esporas, ideales para la formulación de agentes de control biológico, de tal manera que puedan prolongar su viabilidad durante largos períodos de tiempo y actuar efectivamente luego de su aplicación en campo.

En este trabajo se evaluaron diferentes medios de cultivo y condiciones operacionales de fermentación en un sistema discontinuo, para la producción de *B. subtilis* en cultivo sumergido.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el *Laboratorio de Microbiología Agrícola* de la Fundación PROINPA, ubicada en la zona de “El Paso”, a 15 km al Noroeste de la ciudad de Cochabamba, dentro del valle central de la provincia de Quillacollo.

La zona reporta una temperatura media anual de 17.4°C, mínima de 1°C en el mes de junio y máxima de 27°C en el mes de octubre (Cáceres y Ortuño, 2009).

El trabajo se realizó en dos etapas, en la etapa I se evaluaron varios medios de cultivo y en la etapa II, diferentes condiciones operacionales de fermentación.

Se utilizó el diseño experimental de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones. En ambas etapas se realizaron comparaciones de medias de rango múltiple a través de la prueba de Tukey ($P = 0.005$) y análisis de tendencias en los tratamientos cuantitativos. Cada unidad experimental estuvo constituida por un biorreactor.

En la etapa I, se evaluaron nueve medios de cultivo líquidos, distribuidos en tres ensayos.

En el primer ensayo se evaluó el agua proveniente del proceso de extracción del almidón de papa (AP), del jugo de alfalfa (Alfalfa), de la harina de soya (Soya) y del hervido de papa (Testigo).

En el segundo ensayo, se probó nuevamente AP, Alfalfa, además del agua resultante del almidón (Alm) y de la fibra de papa (Fibra).

Finalmente, se evaluaron las aguas provenientes del proceso de extracción del almidón de papa (AP) y del almidón de maíz (AM), los medios preparados en base a melaza-soya (MS) y melaza-leche de soya (MLS).

La etapa II, se dividió a su vez en dos fases, en la primera fase se evaluaron tres flujos volumétricos constantes de aire: 0.5, 1.0 y 1.5 vvm (volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto) y cuatro velocidades de agitación: 100, 150, 200 y 250 rpm (revoluciones por minuto); además de un testigo negativo (sin aeración ni agitación); en la segunda fase se evaluó 1.0 vvm con cuatro velocidades de agitación: 100, 150, 200 y 250 rpm.

Los bio reactores de la etapa I tenían una configuración sencilla, constaban de un difusor y dos orificios, uno para la entrada del aire estéril y otro para la salida de los diferentes gases, formados como producto del metabolismo de la bacteria.

Los bio reactores de la primera fase de la etapa II, además de lo anterior, tenían flujómetros con el propósito de controlar de forma precisa los diferentes flujos volumétricos de aire. Cada uno de los bio reactores utilizados para evaluar las diferentes velocidades de agitación, tenía cuatro deflectores (accesorio en forma de aletas laterales internas del biodigestor), utilizados para generar mayor turbulencia y producir un mejor mezclado; un agitador provisto de un rodete tipo turbina Rushton y un motor paso a paso, cuya velocidad constante en el tiempo fue controlada por un micro controlador. Finalmente, los bio reactores de la segunda fase de esta etapa, eran una combinación de los dos prototipos utilizados en la primera fase.

Los medios de cultivo, después de ser preparados, fueron esterilizados en un autoclave a 1 atmósfera de presión durante 30 minutos a 121°C. Cuando se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con la cepa de *B. subtilis*, del cepario de la Fundación PROINPA.

Se dejó incubando durante 10-13 días, realizando muestreos periódicos para hacer seguimiento al crecimiento de la bacteria. Trascurrido este tiempo, los caldos fueron formulados con calcita (medio inerte), en relación 1:1.6 v/v (caldo bacteriano:calcita).

La concentración de células viables totales de *B. subtilis* se determinó de acuerdo a la técnica de recuento de bacterias en placa (Gautier y Julien, 2008), la cual consiste en realizar diluciones seriadas de cada una de las muestras y sembrar la dilución deseada sobre la superficie de una placa Petri, con medio Triptona Soya Agar (TSA), después de 24 horas de incubado a 37°C se procedió a contar el número de colonias y a partir de este dato se calculó el número de unidades formadoras de colonia (UFC), utilizando un factor de dilución que es el inverso de la dilución; debido a que se hizo una siembra por extensión, se introdujo un factor de dilución adicional de 10.

La concentración de esporas viables se determinó de la misma manera, con la única diferencia de que la dilución deseada de cada muestra se sometió a shock térmico, que consiste en someter la muestra a baño maría a una temperatura de 80°C durante 10 minutos, antes de sembrarla en placa (Espinosa de los Montes, 2005). El pH se midió con instrumentos específicos digitales de mesa.

Resultados y discusión

En el Cuadro 1 se detalla los valores medios de las variables concentración de células viables totales (UFC/ml), esporas viables en el producto formulado (UFC/g) de *Bacillus subtilis* y pH; para todos los medios de cultivo evaluados.

Como se observa, el medio AP (agua proveniente de la extracción del almidón de papa) fue el que presentó las mayores ($P = 0.05$) concentraciones de células viables totales, seguido de Alfalfa, en el primer ensayo; Fibra, en el segundo y AM (agua proveniente de la extracción del almidón de maíz) en el tercer ensayo.

La razón por la que estos resultados se presentan separándolos por ensayos, se debe a que las condiciones de manejo variaron entre los mismos.

En cuanto a la concentración de esporas viables de *B. subtilis*, en el producto formulado, se observa que AP tiene las mayores poblaciones en los dos últimos ensayos, solo en el primer ensayo destaca más Alfalfa, debido a que el día que se formuló (treceavo), el medio AP presentaba una concentración de células viables totales menor al de Alfalfa, puesto que su máxima concentración se registró al décimo día.

B. subtilis es un microorganismo del cual se conoce su habilidad para metabolizar una amplia variedad de azúcares (Hernández, 2003), produce enzimas hidrolíticas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo utilice estos como fuentes de carbono y donadores de electrones (Cuervo, 2010).

Cuadro 1. Concentración de células viables totales, pH y concentración de esporas viables de *Bacillus subtilis*, para diferentes medios de cultivo ($\alpha = 0.01$)

Nro. de ensayo	Medios de cultivo	Concentración de células viables totales de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/ml)	pH	Concentración de esporas viables de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/g)
Primero	AP	5.79 * 10 ⁷ a	7.0 a	3.0 * 10 ⁷ b
	Alfalfa	2.26 * 10 ⁷ b	6.5 b	4.6 * 10 ⁷ a
	Soya	1.90 * 10 ⁷ c	6.6 b	2.7 * 10 ⁷ c
	Testigo	1.02 * 10 ³ d	6.3 b	3.0 * 10 ⁷ d
Segundo	Alfalfa	8.7 * 10 ⁶ c	6.3 b	1.9 * 10 ⁷ c
	Alm	3.2 * 10 ⁴ d	6.6 b	7.1 * 10 ⁴ d
	Fibra	3.2 * 10 ⁷ b	6.5 b	2.7 * 10 ⁷ b
	AP	6.3 * 10 ⁷ a	7.2 a	1.2 * 10 ⁸ a
Tercero	AM	1.8 * 10 ⁸ b	7.2 a	5.2 * 10 ⁷ b
	AP	2.2 * 10 ⁸ a	7.6 a	9.7 * 10 ⁷ a
	MS	1.0 * 10 ⁸ c	6.5 b	4.9 * 10 ⁷ c
	MLS	9.6 * 10 ⁷ d	5.8 c	2.8 * 10 ⁷ d

Valores seguidos por la misma letra (en cada columna y para cada uno de los tres ensayos), no difieren significativamente según la prueba de rango múltiple de Tukey ($P = 0.005$)

Se sabe que las características que un determinado microorganismo adopte durante su crecimiento, depende en gran medida del lugar de aislamiento. Al respecto, Prescott *et al.* (2004), sostienen que el conocimiento del hábitat normal de un microorganismo es a menudo útil para elegir un medio de cultivo apropiado, porque sus necesidades de nutrientes, reflejan su ambiente natural.

El pH del medio de cultivo AP, fue igual o mayor a 7 en todos los ensayos, siendo el mayor registrado de todos los medios de cultivo, solo AM es estadísticamente igual a este. Si se relaciona estos resultados con las concentraciones de células viables totales y esporas viables, se verá que los medios de cultivo que presentan los valores más altos de pH, tienen las mejores concentraciones. Al respecto, Calvo y Zuñiga (2010) indican que el género *Bacillus* está muy asociado a pH neutros; sin embargo ha sido reportado por varios autores, la capacidad del género *Bacillus* de adaptación a pH bajo, pero mostrando diferentes tasas de crecimiento.

En base a la elaboración de curvas de formación de esporas, para las tres condiciones operacionales de fermentación previstas en el trabajo, además de la variación del pH en el tiempo, se evidencia que con 1.5 vvm, se presentó la mayor concentración de esporas viables ($3,33 \cdot 10^8$ UFC/ml) al sexto día; seguido de 1,0 vvm, registrándose concentraciones muy similares entre el octavo y décimo día, $2,04 \cdot 10^8$ y $2 \cdot 10^8$ UFC/ml, respectivamente.

Para 0.5 vvm, la concentración de esporas viables incrementó lentamente, alcanzando $1,02 \cdot 10^7$ UFC/ml al décimo día. El tratamiento Testigo (sin aeración) mantuvo concentraciones del orden de

10^2 entre el segundo y octavo día, y al décimo día presentó una concentración de $2,26 \cdot 10^3$ UFC/ml.

Las poblaciones, al segundo día, fueron del orden de 10^2 para todas las velocidades de agitación. Para el Testigo (sin agitación), la concentración de esporas viables descendió hasta el sexto día, empezando a subir lentamente hasta el octavo día y al último día de cultivo, la concentración fue del orden 10^3 .

Para las velocidades 100, 150 y 200 rpm, la población de esporas viables descendió al cuarto día y después incrementó hasta el décimo día, obteniéndose concentraciones de $3,88 \cdot 10^3$, $2,5 \cdot 10^4$ y $8,59 \cdot 10^3$ UFC/ml, respectivamente.

La población de esporas con 250 rpm, se incrementó durante todo el ciclo de cultivo, pero manteniendo concentraciones del orden de 10^2 , de manera que al décimo día presentó una concentración de $8,98 \cdot 10^2$ UFC/ml. Se obtuvo concentraciones del orden de 10^8 al cuarto día, para 1,0-200 y 1,0-250 vvm-rpm; al sexto para 1,0-100 y 1,0-150 vvm-rpm. Sin embargo, la máxima concentración se obtiene al octavo día con 1,0 vvm-200 rpm ($2,83 \cdot 10^8$ UFC/ml).

Observando la variación del pH, para las diferentes condiciones de estudio, se evidencia que la alimentación de aire, es decir el oxígeno, tiene efecto directo sobre el pH, ya que para flujos volumétricos de aire de 1,0 y 1,5 vvm; y la combinación de 1,0 vvm con todas las velocidades de agitación, este incrementa en el tiempo, encontrándose al último día de cultivo en aproximadamente 9, mientras que para 0.5 vvm y todas las velocidades de agitación, el pH disminuye, hasta un determinado día, a partir del cual tiende a subir.

Finalmente, para el tratamiento Testigo, el pH disminuye gradualmente hasta el último día de cultivo. Evidentemente bajo limitación de oxígeno, la bacteria se ve obligada a seguir otras rutas metabólicas, que al parecer no son favorables para su crecimiento y esporulación, sino para la formación de ácidos orgánicos, lo cual pudo haber causado el descenso del pH, bajo estas condiciones.

Al respecto, Espinosa de los Monteros (2005), menciona que al parecer la fermentación láctica es el último recurso que tiene *B. subtilis* para reciclar el poder reductor ($\text{NADH}+\text{H}^+$) generado en la glucólisis al metabolizar la glucosa.

En este sentido, la disminución en la velocidad de crecimiento (y la biomasa generada), se puede atribuir a que en esta vía no se genera tanta energía en comparación, por ejemplo, con el ATP generado al catabolizar el piruvato a acetato, así mismo se sugiere que la limitación energética no es capaz de sustentar la producción de β -galactosidasa y formación de esporas durante la fase estacionaria.

La transcripción de las enzimas del ciclo de Krebs se induce durante la esporulación y son requeridas ya que permiten obtener la energía necesaria y los intermediarios esenciales para la esporulación. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el ciclo de Krebs generador de coenzimas reducidas, es regulado por la disponibilidad de oxígeno (Espinosa de los Monteros, 2005). El mismo autor añade, que mediante un estudio de microarreglos, recientemente se ha determinado que varios cientos de genes son inducidos o reprimidos a diferentes niveles de expresión en *B. subtilis*, con el cambio gradual hacia condiciones menores en oxígeno.

Por su parte, Hernández (2003), sostiene que la razón por la que se forma poca biomasa en condiciones fermentativas, es que la mayor parte de los azúcares se canalizan a la formación de L-lactato, con rendimientos mayores al 80% del teórico.

Por todo lo expuesto anteriormente y considerando que Gonzáles (2008) indica que la esporulación es un proceso muy complejo que requiere un elevado consumo energético y necesita varias horas para completarse, es posible suponer que la baja concentración de esporas viables que se obtuvo con las diferentes velocidades de agitación y Testigo, se debió a la falta de energía y/o los intermediarios esenciales para la formación de las mismas. Además cabe recalcar que este comportamiento se observó con mayor claridad en los bio reactores que carecían de aeración.

Los mejores rendimientos no se lograron con las mayores velocidades de agitación. Trujillo y Valdez (2006), mencionan que el estrés hidrodinámico afecta en forma negativa a la esporulación de *B. subtilis*.

Si bien estos autores no mencionan el límite de la velocidad de agitación sobre el cual se observa este comportamiento, y aunque lo hicieran, no necesariamente tendría que replicarse en este trabajo, puesto que el comportamiento de un cultivo bacteriano depende de muchos factores intrínsecos de la cepa involucrada y extrínsecos o relacionados al medio ambiente de la misma; es posible que la disminución de la concentración de esporas viables para las velocidades de agitación mayores al óptimo registrado en el presente trabajo, se deba a lo indicado por estos autores.

Finalmente, muchos autores mencionan que además de la aeración, la agitación es muy ventajosa en el bioprocesado, puesto que permite que todos los nutrientes, incluidos el oxígeno, estén más disponibles para el aprovechamiento por parte de la célula; además, el rodete rompe las burbujas de aire generadas en el difusor, formando burbujas más pequeñas y distribuyéndolas por todo el líquido, mejorando de esta manera el área interfacial de transferencia de oxígeno.

Al respecto, Espinosa de los Monteros (2005), sostiene que la cantidad de protones translocados a través de la membrana y por lo tanto la eficiencia en la generación de ATP está regulada por la transferencia de oxígeno y no por la concentración de éste.

Por su parte, Guevara (2004), menciona que en los reactores agitados mecánicamente se busca aumentar la transferencia de oxígeno con la agitación mecánica.

Conclusiones

- La concentración de células viables totales y de esporas viables de *B. subtilis*, es diferente para los medios de cultivo evaluados en los tres ensayos, y a pesar de que las condiciones de cultivo fueron diferentes entre ensayos, el agua proveniente de la extracción del almidón de papa (AP) fue el que presentó mejores resultados en todos los ensayos.
- Los flujos volumétricos de aire con los cuales se obtuvieron las mejores concentraciones de esporas viables fueron: 1,5 y 1,0 vvm, con $3,33 \cdot 10^8$ UFC/ml al sexto día y $2,04 \cdot 10^8$ UFC/ml al octavo día. Todas las velocidades de agitación presentaron una

baja concentración de esporas viables, siendo la mejor 150 rpm con $2.54 \cdot 10^4$ UFC/ml al décimo día.

- En cuanto al sistema combinado aeración-agitación, el mejor en rendimiento fue 1,0 vvm - 200 rpm, presentando concentraciones del orden de 10^8 en esporas viables a partir del cuarto día, y registrando su máxima producción de esporas al octavo día, con $2.83 \cdot 10^8$ UFC/ml.
- Se observó diferente comportamiento del pH para los medios de cultivo evaluados; así para el medio AP, el pH cuando hubo buena alimentación de aire al sistema, se incrementó en el tiempo, describiendo un comportamiento variable al disminuir la concentración de este.

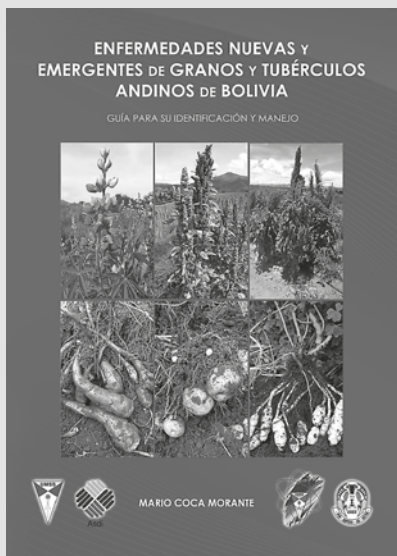
Referencias citadas

- Brock T.; Madigan M. 1993. Microbiología. Sexta edición. México.
- Cáceres M.; Ortuño N. 2009. Estudio comparativo y efecto de diferentes cepas de micorrizas (MA) nativas sobre las plantas de lechuga (*Lactuca sativa*), haba (*Vicia faba*) y cebada (*Hordeum vulgare*).
- Calvo P.; Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Universidad Nacional Agraria La Molina. Ecología Aplicada 9(1). Lima, Perú. 36 p.
- Cristiano S.; Serrano L.; Galindo E. s/f. Crecimiento vegetativo y esporulación de *Bacillus subtilis* 83 en medio mineral en cultivos sumergidos en lote y lote alimentado. Universidad Nacional Autónoma de México. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelos, México.

- Cuervo J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. 8 p.
- Espinosa de los Monteros J. 2005. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, México. pp. 13-48.
- Gautier C.; Julien M. 2008, *Protocoles du laboratorio de Microbiologie générale*, Université Laval.
- González J. 2008. Canibalismo en poblaciones de *Bacillus subtilis*. Centro de Astrobiología (CSIC-INTA). Madrid, España. 22 p.
- Guevara E. 2004. Diseño, construcción y caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad Tecnológica de La Mixteca. Oaxaca, México. pp. 16.
- Hernández C. 2003. Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Zacatepec. Morelos, México. pp. 6-51.
- Ojeda C. 2007. Formulación de un biocontrolador de *Erwinia caratovora* en polvo, a partir de una cepa de *Bacillus subtilis* utilizando secado spray. Tesis de Licenciatura en Ciencia de los Alimentos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp. 19.
- Prescott L.; Harley J.; Klein D. 2004. Microbiología. Quinta Edición. Ed. McGraw-Hill - Interamericana. 110 p.
- Trujillo M.; Valdez N. 2006. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(3-4): 273.

Trabajo recibido el 10 de junio de 2016 - Trabajo aceptado el 20 de agosto de 2016

PUBLICACIÓN DESTACADA:



Autor: Mario Coca Morante (Docente FCAyP-UMSS). Libro publicado en noviembre de 2015, con apoyo del Programa Horizontal ASDI-DICYT-UMSS.

Libro donde se describe, en forma clara y didáctica, las principales enfermedades, su manejo y control integrado, de especies relevantes de la zona andina: *Quinoa, Millmi, Tarhui, Papa, Papalisa, Oca e Isaño*, alimentos que son producto de años de trabajo denodado del agricultor andino (fitomejorador), quien generó dentro de cada especie, una gama de variedades adaptadas a diferentes sitios, suelos, clima, vegetación y necesidades propias del habitante de esta vasta, importante y productiva región de nuestro país.

Mayor información: m.cocamorante@umss.edu.bo