



**Diseño de un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus licheniformis*
08AP**

Héctor Javier Guzmán Vargas

Director: Ivonne Gutiérrez R. Bact., M.Sc., Ph.D.

Codirector: Adriana Matiz V. Bact., M.Sc.

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Programa de Microbiología Industrial
Bogotá D.C. 2018

Selección de un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus licheniformis* 08AP

Héctor Javier Guzmán Vargas

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Microbiólogo Industrial

Concepción J. Puerta Bula PhD.
Decana académica
Facultad de Ciencias

Marcela Franco Correa PhD.
Directora de carrera
Microbiología Industrial

Selección de un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus licheniformis* 08AP

Héctor Javier Guzmán Vargas

Ivonne Gutiérrez Rojas, PhD.
Directora

Adriana Matiz Villamil, M. Sc.
Codirectora

Raúl A. Poutou Piñales, Ph.D
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Agradecimientos

A mi familia en especial a mi madre por ser mi apoyo incondicional en todo momento, por creer en mí y por brindarme la oportunidad de estudiar en esta universidad.

A mi directora Ivonne Gutiérrez y codirectora Adriana Matiz por permitirme hacer parte del Laboratorio de Biotecnología Ambiental e Industrial y de este proyecto. También por su paciencia y apoyo en momentos difíciles brindándome conocimiento y servir de guía a través de este proceso.

Quiero agradecer a mis compañeras del laboratorio María Fernanda Alvarado, María Camila Arboleda, Milena Arango y Alejandra Ahumada por brindarme su compañía, apoyo y ayuda en todo momento.

Por último, quiero agradecer al personal que trabaja en el área de monitoria de la facultad de ciencias por su atención y colaboración.

Resumen

El compostaje es una alternativa para el manejo de residuos orgánicos producidos en actividades industriales y urbanas. En el compostaje se emplean microorganismos o consorcios los cuales degradan la materia orgánica hasta su mineralización o generan subproductos que posteriormente pueden ser aprovechados como materia prima o como fuente de nutrientes en el suelo. La adición de estos microorganismos se hace en forma de bioinoculantes. Sin embargo, unos de los problemas principales de estos bioinoculantes es su vida útil, ya que los microorganismos en su forma vegetativa son muy sensibles a cambios ambientales y/o nutricionales. Una alternativa es la formulación de un bioinoculante basado en esporas bacterianas. Entre los microorganismos que tienen la capacidad de formar esporas se encuentra *Bacillus licheniformis* 08AP, el cual fue aislado a partir de la fracción orgánica de pilas de compostaje en la Ciudad de Villavicencio, Meta, Colombia, y posee actividad amilolítica y proteolítica, por lo que posee un gran potencial de aplicación como bioinoculante.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar un medio de cultivo para la producción de esporas en *Bacillus licheniformis* 08AP. Para ello se empleó el medio basal SBM modificado y se evaluaron 9 fuentes de carbono glucosa USP grado alimenticio (22.5 g/L), sacarosa (azúcar morena) (23 g/L), almidón soluble (20 g/L), glicerol (18.42 mL/L), manitol (22.8 g/L), xilosa (22.5 g/L), manosa (22.5 g/L), sorbitol (22.8 g/L) y lactosa (21.4 g/L). Como resultado se obtuvo que la sacarosa (azúcar morena), (23 g/L) fue la mejor fuente con una producción de esporas de 5.3 unidades logarítmicas de (Esporas/mL) y un porcentaje 69,10%, además, es la más económica y la de más fácil acceso. El medio seleccionado quedó compuesto por sacarosa (azúcar morena), (23 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.59 g/L), KH_2PO_4 (6 g/L), extracto de levadura 5 g/L, peptona 5 (g/L), NaCl (0.01 g/L) y una solución stock de sales compuesta por 1.136 mL/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1 M), 300 μ L/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1 M), 9.9 mL/L de $CaCl_2$ (0.1 M), 30 mL/L de $MnSO_4$ (0.1 M).

Tabla de contenido

1. Introducción	9
2. Marco teórico y antecedentes	11
2.1. Género Bacillus.....	11
2.2. Endoespora bacteriana.....	12
2.3. Medios de cultivo para la producción de esporas.....	14
2.4. Microorganismo de estudio.....	15
3. Objetivo	15
4. Metodología	15
4.1. Ubicación.....	16
4.2. Microorganismo.....	16
4.3. Preparación del banco de trabajo.....	16
4.4. Montaje 1.....	16
4.5. Montaje 2.....	17
4.6. Técnicas analíticas.....	18
5. Resultados	18
5.1. Banco de trabajo.....	18
5.2. Montaje 1.....	18
5.3. Montaje 2.....	19
6. Discusión	21
7. Conclusiones	24
8. Recomendaciones	24
9. Bibliografía	25
10. Anexos	28

Lista de figuras

- Figura 1.** Sistema de transferencia de fosfatos en la esporulación de *B. subtilis*.....13
- Figura 2.** Gráfico de producción biomasa, esporas y porcentaje de esporulación en *Bacillus licheniformis* 08AP20

Lista de tablas

- Tabla 1.** Factores del diseño factorial irregular para la selección de fuente de carbono y nitrógeno.....17
- Tabla 2.** Fuentes de carbono y nitrógeno.....17
- Tabla 3.** Producción de biomasa y esporas a 72 h y 120 h en distintas fuentes de carbono.....19

Selección de un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus licheniformis* 08AP

1. Introducción

En las últimas décadas las industrias se han enfocado en la búsqueda de alternativas para producir de manera más eficiente y amigable con el medio ambiente. Debido a lo anterior, gran parte de los residuos industriales y urbanos ahora son empleados en procesos de reciclaje, reutilización y producción orgánica, los cuales mediante un tratamiento adecuado, se convierten en un aporte importante de materia prima y retornan a la cadena productiva (Salamanca, 2012).

El compostaje es una alternativa para el manejo de residuos orgánicos, en este proceso se genera el compost, el cual es el material resultante de la descomposición natural de la materia orgánica por la acción de los microorganismos presentes en el medio, los cuales transforman los residuos orgánicos en otros materiales benéficos que aportan nutrientes al suelo. Durante el proceso de compostaje, los microorganismos emplean enzimas las cuales asimilan primero los componentes más fácilmente degradables; al agotarse estos toman compuestos más complejos como la celulosa, la lignina y la hemicelulosa. Algunos de los microorganismos empleados en el proceso de compostaje son *Pleurotus* sp, *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Serratia* sp y *Bacillus* sp (Torres & Serrano, 2017), estos últimos tienen la capacidad de formar esporas las cuales son estructuras de resistencia que les permite sobrevivir a condiciones extremas fisicoquímicas y nutricionales. También, tienen la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos de las proteínas mediante proteasas; así mismo pueden producir amilasas, las cuales hidrolizan el almidón, polisacáridos y oligosacáridos en azúcares de bajo peso molecular como la glucosa, la fructosa y la maltosa (Panda *et al.*, 2016).

Debido a estas características, *Bacillus* sp., ha sido empleado en la fabricación de inoculantes biológicos, que son suspensiones de un microorganismo o consorcios de varios microorganismos que ayudan a incrementar la disponibilidad de nutrientes en los suelos y mejoran los procesos de degradación de sustratos. Los inoculantes pueden ser clasificados como biofertilizantes, biocontroladores y acelerantes (Berg 2009; Owen *et al.*, 2014). Estos últimos pueden ser empleados en procesos de compostaje, aumentando la tasa de

descomposición de materia orgánica, liberando nutrientes, los cuales pueden ser aprovechados de mejor manera por la microbiota nativa (Owen et al. 2014; Suman et al. 2015). Sin embargo, uno de los problemas principales de estos inoculantes es su vida útil ya que en fase vegetativa los microorganismos son más sensibles a cambios ambientales y/o nutritivos, afectando de esta manera la supervivencia en la formulación seleccionada y su actividad (Calvo et al. 2014); Por esta razón una alternativa es la elaboración de un inoculante basado en esporas, ya que se alargaría el período de expiración del producto; sin embargo, se deben tener en cuenta factores como el pH, la aireación, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes durante la producción de esporas a nivel industrial.

Según Posada et al. (2015) el estrés nutricional y la densidad celular son los factores más importantes para inducir la formación de esporas. Es por esto que la limitación intencional de nutrientes ha sido empleada para la producción de altas concentraciones de esporas para uso en investigación y aplicación industrial. Sin embargo, cada microorganismo tiene sus propios requerimientos nutricionales y condiciones óptimas para el crecimiento y la producción de esporas. El diseño y la optimización de un medio de cultivo ayuda a detectar qué fuentes de carbono y nitrógeno deben emplearse para la producción de esporas y la síntesis de metabolitos de uso comercial como las enzimas. Sin embargo, a saber no existe información acerca de un medio de cultivo específico para *Bacillus licheniformis* 08AP para la producción de esporas en altas concentraciones, la mayoría de estudios están enfocados a *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, debido a su potencial biotecnológico y como biocontrolador. Es por esto que se hace necesario seleccionar un medio de cultivo para la producción de esporas en *Bacillus licheniformis* 08AP, en donde se conozcan las distintas fuentes de carbono y de nitrógeno a emplear, de aquí surge la pregunta de investigación del presente trabajo de grado.

¿Cuál es el medio de cultivo que permite la mayor producción de esporas de *Bacillus licheniformis* 08AP?

2. Marco teórico y antecedentes

2.1 Género Bacillus

El género *Bacillus* incluye bacterias Gram positivas, aerobias o anaerobias-facultativas, mesófilas, algunas termófilas como *B. acidocaldarius*, en forma de bastoncillo, habitan diversos ambientes y una de las principales características del género es su habilidad para formar una endospora en respuesta al estrés ambiental y/o nutricional (Checinska *et al.*, 2015). Las bacterias pertenecientes a este género pueden ser empleadas en control biológico de hongos patógenos, debido a que producen sustancias antimicóticas como la iturina (Muis, 2006), también como biopesticidas debido a la producción de proteínas Cry las cuales son altamente tóxicas contra insectos patógenos de plantas (Portela *et al.*, 2013). Otros de sus usos potenciales son como indicadores de esterilidad y antisepsia de productos, empleo en sistemas de tratamiento de aguas residuales y como promotores de crecimiento vegetal como alternativa al uso de agroquímicos. Sin embargo, su mayor potencial es la producción de enzimas de interés industrial como amilasas, proteasas y celulasas, las cuales pueden ser empleadas para procesos de degradación de materia orgánica como en el compost (Schallmeyer *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014).

Bacillus licheniformis es un microorganismo Gram positivo formador de endospora, perteneciente al grupo de *B. subtilis* (grupo II) del género *Bacillus*, que puede ser aislado de suelos o material vegetal alrededor de todo el mundo. Este nunca ha sido reportado ser patógeno ni para animales o plantas, y es usado para la producción industrial a gran escala de exoenzimas debido a que puede secretar altas cantidades de enzimas. Las serín proteasas alcalinas producidas por *B. licheniformis*, se emplean principalmente como aditivo de detergentes domésticos (Hmidet *et al.*, 2009). Además, se han encontrado genes que expresan enzimas con potencial de aplicación biotecnológico tales como, pectato liasas (E.C. 4.2.22) y lipasas (E.C. 3.1.1.3), (Veith *et al.*, 2004). También se ha reportado que las enzimas producidas por *Bacillus licheniformis* poseen una mayor termoestabilidad (Archana & Satyanarayana, 1997), lo que aumenta su estabilidad en procesos de compostaje ya que allí se alcanzan temperaturas de hasta 70°C, es por esto que es un microorganismo que tiene potencial uso como bioinoculante.

2.2 Endospora bacteriana

La endospora o espora bacteriana es una estructura de resistencia que se forma en respuesta a condiciones nutricionales adversas, la cual es el resultado de un proceso de diferenciación celular que tiene lugar en el interior de las bacterias Gram positivas. Las esporas son células con baja actividad metabólica, resistentes al medio ambiente, sobreviven en medios con pocos nutrientes, exposición a rayos UV, químicos y agentes oxidativos (Checinska *et al.*, 2015). Además, esta puede ocupar distintas posiciones en su proceso de formación (central, terminal y subterminal) dependiendo de la especie y es característica de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

La esporulación es el proceso mediante el cual se da origen a la espora. *Bacillus* spp., emplea un sistema de “*Quorum-Sensing*” para iniciar su proceso de esporulación el cual ocurre en poblaciones con alta densidad celular y sólo si la célula está en condición de estrés (Rao *et al.*, 2007). Además, durante la fase de crecimiento estacionaria, cuando los nutrientes están agotados, el cultivo inicia la esporulación en una densidad alrededor de 10^8 células/mL (Sonenshein, 2000). Una vez la célula detecta estas señales ocurren una serie de fosforilaciones que activan el proceso de esporulación el cual es irreversible.

Bacillus subtilis es el organismo modelo para el estudio de la esporulación, este esporula integrando un amplio rango de señales ambientales y fisiológicas, las cuales culminan activando la proteína de regulación transcripcional clave, Spo0A. Estas señales se originan del agotamiento de nutrientes, densidad celular, el ciclo de Krebs, síntesis de ADN y daño en el ADN. Al menos tres proteínas histidina quinasa (E.C. 2.7.13.3) transfieren el grupo fosfato a la proteína de relevo Spo0F, luego a Spo0B y finalmente a Spo0A. La acumulación de Spo0A-P activa la transcripción uniéndose a los promotores de al menos siete genes que rigen la entrada hacia la esporulación y la transición a un esporangio de dos compartimentos en el cual la transcripción de genes está regulada diferencialmente (**Figura 1**), (Stragier *et al.*, 2000).

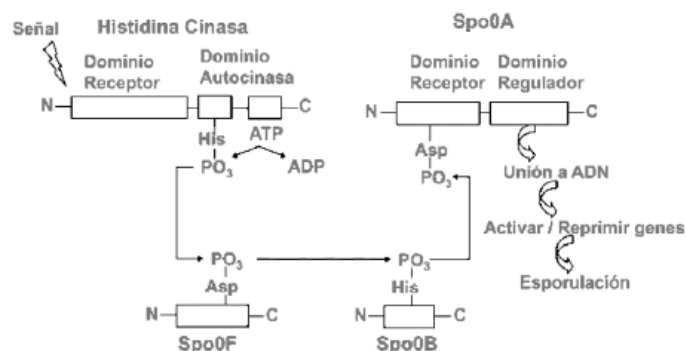


Figura 1. Sistema de transferencia de fosfatos en la esporulación de *B. subtilis*. (Modificado de Stephenson & Hoch, 2002).

El centro de la espora contiene un núcleo deshidratado, el cual equivale al protoplasto de una célula, este contiene ADN, ribosomas y un mínimo de proteínas necesarias para la germinación. El núcleo también contiene compuestos específicos de la espora como ácido piridin-2-6-dicarboxílico (DPA), SASPs (del inglés Small Acid Soluble Proteins) y iones de metales divalentes (Checinska *et al.*, 2015). Las SASPs representan entre el 8% y el 20% del peso seco y protegen al ADN del daño UV; también, son degradadas en la germinación de la espora aportando aminoácidos esenciales para el proceso. El DPA (ácido piridin-2-6-dicarboxílico) es otra molécula abundante en el núcleo de la espora, esta forma complejos quelados con Ca^{2+} y otros cationes divalentes. El DPA constituye hasta el 15% del peso seco de la espora (Checinska *et al.*, 2015).

Al formarse el complejo DPA- Ca^{2+} se genera un gradiente de concentraciones de iones Ca^{+} el cual deshidrata el núcleo, este proceso aumenta la resistencia de la espora al calor, protegiendo las proteínas del núcleo de la inactivación o de la denaturación (Huang *et al.*, 2007). Durante la germinación el DPA es liberado permitiendo la hidratación del núcleo. La tolerancia al calor de la endospora depende de factores como la temperatura de esporulación, deshidratación del núcleo, la presencia de minerales y de proteínas pequeñas solubles ácidas (SASPs) en el núcleo (Checinska *et al.*, 2015). Por último, cuando los nutrientes (aminoácidos, carbohidratos, nucleosidos de purinas) están disponibles y ocurren eventos no fisiológicos (alta presión, dipicolinato de calcio o tratamientos alcalinos) la espora germina e inicia el crecimiento vegetativo.

2.3 Medios de cultivo para la producción de esporas

Un medio de cultivo adecuado debe promover el crecimiento de células vegetativas y también la producción de esporas (Lallo *et al.*, 2009). Para el desarrollo de medios de cultivos que permitan la obtención de esporas se deben tener en cuenta varios factores como el agotamiento de fuentes nutricionales como el carbono, el nitrógeno, el fósforo y micronutrientes esenciales, y de factores físico y químicos como el pH, agitación, aireación y temperatura (Lallo *et al.*, 2009); sin embargo, las fuentes de carbono y nitrógeno que se emplean son importantes en el crecimiento celular, en la producción de esporas y en la producción de metabolitos, ya que cada microorganismo posee un metabolismo distinto y por consiguiente prefiere distintos sustratos (Lallo *et al.*, 2009). Los medios de cultivo químicamente definidos permiten controlar parámetros como el crecimiento y la esporulación, a nivel industrial, permitiendo la obtención de lotes homogéneos y reproducibles y reducir los costos de producción. La optimización de estos medios tiene como objetivo obtener un máximo rendimiento de esporas por gramo de sustrato consumido (Sreekumar & Krishnan, 2010).

Diferentes medios de cultivos óptimos y condiciones de cultivo han sido reportados para bacterias aerobias formadoras de endosporas empleando distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Cho *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2005; Florez *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2005). En un estudio llevado a cabo por Khardziani *et al.*, (2017) para la producción de esporas en *B. subtilis* se empleó un medio basal compuesto de KH_2PO_4 (1 g/L), MgSO_4 (0.5 g/L), extracto de levadura (3 g/L), peptona (3 g/L), y como fuente de carbono se emplearon xilosa, glucosa, sacarosa y glicerol cada a una concentración de 5 g/L. Se encontró que la glucosa (2 g/L) y la peptona (40mM) permitieron una producción máxima de 2.3×10^9 Esporas/mL. Por otro lado Posada *et al.*, (2015) para la producción de esporas en *B. subtilis* EA-CB0575 empleó el medio SBM compuesto de glucosa (1.04 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.59 g/L), KH_2PO_4 (6 g/L), extracto de levadura 5 g/L, peptona 3 (g/L), NaCl (0.01 g/L) y una solución stock de sales compuesta por $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M), 300 $\mu\text{L/L}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M), 9.9 mL/L de CaCl_2 (0.1 M), 30 mL/L de MnSO_4 (0.1 M), se encontró que la glucosa y el MgSO_4 eran los factores que más afectaban la esporulación y a una concentración de 2 g/L y 0.5 g/L respectivamente, se logró una esporulación de 8.78×10^9 Esporas/mL. Por otro lado Lallo *et al.*, (2009) en un estudio para la producción de esporas de *B. cereus* emplearon un medio basal con macronutrientes compuesto por ácido cítrico (0.01 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.06 g/L), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.00472 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03 g/L), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.0004 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.00032 g/L), KCl (0.02 g/L) y H_3PO_4 (0.025 g/L) y empleando licor de maíz fermentado (60 g/L) como suplemento nutricional lograron una esporulación máxima de 1.56×10^{11} Esporas/g.

Por último, en el estudio llevado a cabo por Vargas (2018) en la Pontificia Universidad Javeriana en el cual se optimizó un medio de cultivo para la esporulación de *Bacillus* sp. 12 AP, empleando un diseño factorial irregular para seleccionar la mejor combinación de fuente de carbono (glucosa y sacarosa) y de nitrógeno (sulfato de amonio y extracto de levadura) y un diseño central compuesto para seleccionar las concentraciones en la cual se producen más esporas. A unas condiciones de cultivo de 55°C por 72 horas se obtuvo como resultado que azúcar morena (11 g/L), extracto de levadura (6.4 g/L), sulfato de amonio (3 g/L), cloruro de calcio (0.5 g/L), fosfato monobásico de sodio (0.5 g/L) y fosfato dibásico de sodio (0.5 g/L), con un recuento de 1×10^8 Esporas/mL. Estas condiciones de cultivo fueron empleadas en el estudio de *Bacillus licheniformis* 08AP para la selección de un medio de cultivo para la producción de esporas.

2.4 Microorganismo de estudio

En la Pontificia Universidad Javeriana en un estudio llevado a cabo por Galindo & Londoño (2005) se obtuvieron 12 aislamientos de *Bacillus spp.*, a partir de pilas de compostaje de residuos en la ciudad de Villavicencio, Meta. Se determinó que estas bacterias eran termófilas y productoras de enzimas amilolíticas y proteolíticas. Dentro de este grupo se encuentra el aislamiento *Bacillus licheniformis* 08AP el cual fue el que mostró mayor actividad amilolítica, adicionalmente no ejerció antagonismo sobre ningún otro de los aislamientos, ni fue inhibido por estos, por lo que podría ser empleado como inoculante en un consorcio microbiano. Este aislamiento también fue empleado por Suarez & Ramirez (2015) y Serrano & Torres (2017) como bioinoculante en fase vegetativa en procesos de compostaje. Suarez & Ramirez (2015) lograron reducir el tiempo de compostaje de mortalidades porcícolas de 12 a 8 semanas empleando un consorcio bacteriano entre los cuales se encontraba *Bacillus licheniformis* 08AP.

3. Objetivo

Diseñar un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus licheniformis* 08AP.

4. Metodología

4.1 Ubicación

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana, ubicado en la Facultad de Ciencias en el Edificio 50 laboratorio 120, en la ciudad de Bogotá D.C., Colombia.

4.2 Microorganismo

Se empleó *Bacillus licheniformis* 08AP, aislado y utilizado en estudios previos de la Pontificia Universidad Javeriana (Galindo & Londoño 2005; Serrano & Torres 2017).

4.3 Preparación del banco de trabajo

Se inocularon 2 viales *Bacillus licheniformis* 08AP conservados en glicerol (60%(v/v)) en 4 cajas de agar combinado compuesto por Maizena[®] 1.2 % (p/v), leche descremada en polvo 1.2 % (p/v), glucosa (1 g/L), extracto de levadura (2.5 g/L), sulfato de amonio (1 g/L), cloruro de calcio (0.5 g/L), fosfato monobásico de sodio (0.5 g/L), fosfato dibásico de sodio (0.5 g/L), agar (15 g/L), y se incubaron a 55°C por 5 días. A partir de las cajas se realizó una suspensión en 5 mL de caldo combinado (misma composición que el anterior sin adición de agar) y se incubó por 21 horas. Posteriormente se inocularon los 5 mL en 45 mL de caldo combinado y se incubó a 55°C por 18 horas. Por último, los 50 mL de medio con microorganismos se mezclaron con 50 mL de caldo combinado con glicerol (60%(v/v)) para obtener una mezcla con volumen final de 100 mL de medio con concentración final de glicerol al 30% (v/v), este se distribuyó en 50 tubos eppendorf y se almacenó a -20°C.

4.4 Montaje 1

Se empleó un diseño factorial irregular (**Tabla 1**) para seleccionar la mejor combinación de fuente de carbono y de nitrógeno que permitiera la mayor producción de esporas. Cada ensayo se realizó por triplicado para un total de 18 experimentos. Se buscó un aporte de carbono de 9 g/L y se usaron como fuentes de carbono, glucosa USP grado alimenticio (22.5 g/L) y azúcar morena (23 g/L). Para el nitrógeno se buscó un aporte de 1 g/L y se emplearon como fuentes de nitrógeno, extracto de levadura (9 g/L) y sulfato de amonio (5 g/L) y la combinación de estas dos. Los experimentos evaluados se incubaron a 55°C por 72 horas. Como sales basales se emplearon cloruro de calcio (0.5 g/L), fosfato monobásico de sodio (0.5 g/L), fosfato dibásico de sodio (0.5 g/L) (Vargas, 2018).

Tabla 1. Factores del diseño factorial irregular

Factor 1 (Fuente de carbono)	Factor 2 (Fuente de Nitrógeno)
Glucosa y azúcar morena	Extracto de levadura, Sulfato de amonio y (Extracto de levadura + Sulfato de amonio)

4.5 Montaje 2

Se empleó como medio basal el SBM modificado (Posada *et al*, 2015) compuesto de MgSO₄.7H₂O (0.59 g/L), KH₂PO₄ (6 g/L), extracto de levadura 5 g/L, peptona 5 (g/L), NaCl (0.01 g/L) y una solución stock de sales compuesta por FeSO₄.7H₂O (0.1 M), 300 µL/L de ZnSO₄.7H₂O (0.1 M), 9,9 mL/L de CaCl₂ (0.1 M), 30 mL/L de MnSO₄ (0.1 M) y para el aporte de carbono se emplearon 9 fuentes (**Tabla 2**) para seleccionar la que permita la mayor producción de esporas. Cada ensayo se realizó por triplicado para un total de 27 experimentos. Se buscó un aporte de carbono de 9 g/L y se usaron como fuentes de carbono, glucosa USP grado alimenticio (22.5 g/L), sacarosa (azúcar morena) (23 g/L), almidón soluble (20 g/L), glicerol (18.42 mL/L), manitol (22.8 g/L), xilosa (22.5 g/L), manosa (22.5 g/L), sorbitol (22.8 g/L) y lactosa (21.4 g/L). Los experimentos evaluados se incubaron a 55°C por 72 horas y 120 horas.

Tabla 2. Fuentes de carbono y nitrógeno

Tto	Fuente de carbono	Fuente de Nitrógeno
T1	Glucosa	
T2	Azúcar morena	
T3	Almidón	
T4	Glicerol	Extracto de levadura
T5	Manitol	+
T6	Xilosa	Peptona
T7	Manosa	
T8	Sorbitol	
T9	Lactosa	

4.6 Técnicas analíticas

La cuantificación de biomasa se realizó mediante la técnica de recuento en placa, para para lo cual se usó 1 mL de muestra de cada medio y se realizaron diluciones seriadas desde 10⁻¹

hasta 10^{-6} , para luego sembrar 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-6} en agar nutritivo compuesto por extracto de levadura (2 g/L), peptona (5 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), Agar (15 g/L), y se incubaron a 55°C por 48 horas. La biomasa se reportó en UFC/mL.

La evaluación de presencia de esporas se realizó por la técnica de choque térmico, en el cual se inactivan las células vegetativas para dejar en el medio de cultivo sólo las esporas (Monteiro *et al.*, 2014; Khardziani *et al.*, 2017). A las 72 y 120 horas de incubación de cada medio se tomaron 5 mL del medio de cultivo y se transfirieron a un tubo tapa rosca de 16x150 mm. Dicho tubo se calentó a 80°C (esta temperatura de choque se cambió a 70°C en el segundo montaje) por 15 minutos luego se enfrió en hielo por 5 minutos. A partir de esta suspensión se realizó una siembra directa tomando 0.1 mL de los tubos y sembrando en cajas de agar nutritivo. Se incubaron a 55°C por 48 horas y se reportó en Esporas/mL.

5. Resultados

5.1 Banco de trabajo

Al llevar a cabo una prueba de pureza a los viales del aislamiento *Bacillus licheniformis* 08AP del banco realizado por Galindo & Londoño, se encontraron dos morfotipos, los cuales se denominaron como Morfotipo 1 (M1) el cual era un bacilo Gram positivo alargado, y Morfotipo 2 (M2) el cual era un bacilo corto Gram positivo (**Anexo 1**). Posteriormente se hicieron aislamientos de cada morfotipo en los mismos agares para evidenciar actividad amilolítica y proteolítica, y se seleccionó el morfotipo M2 el cual presentaba las características macroscópicas, microscópicas y la actividad amilolítica y proteolítica (**Anexo 1**) reportadas por Galindo & Londoño. A partir las colonias del M2 se realizó el nuevo banco de trabajo el cual se empleó posteriormente en la selección de fuente de carbono y nitrógeno.

5.2 Montaje 1

A fin de establecer las fuentes de carbono y nitrógeno en las que se produce mayor cantidad de esporas de *Bacillus licheniformis* 08AP se empleó un diseño factorial irregular **Tabla 1** en donde se evaluó glucosa y sacarosa como fuentes de carbono, y extracto de levadura, sulfato de amonio y la combinación de estas dos como fuente de nitrógeno. Se emplearon estas fuentes teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada por Vargas (2018) para *Bacillus* sp. en donde se estableció que estas fuentes eran las más empleadas en diferentes ensayos con una alta producción de esporas $>10^9$ esporas/mL. Como resultado se obtuvo que a las 72

y 120 horas de incubación no hubo producción de esporas en un recuento menor a 1×10^4 UFC/mL. Un segundo montaje se realizó para descartar el pH como factor que podría afectar la esporulación, se ajustó el pH de 7.8 a 6.8; sin embargo, se obtuvieron los mismos resultados.

5.3 Montaje 2

Previo a esto se realizó un montaje en el cual se prepararon dos suspensiones celulares del microorganismo reactivado en cajas de agar combinado, estas se ajustaron a una absorbancia de 0.6 a 540 nm y se sometieron a dos temperaturas de choques una a 70°C y otra a 80°C por 15 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones desde 10^0 hasta 10^{-1} y se sembraron en cajas de agar nutritivo. Como resultado se observó que a una temperatura de choque de 80°C no se evidenció crecimiento de esporas en ninguna dilución, pero a 70°C si hubo crecimiento en la dilución 10^0 con un recuento de 11×10^1 UFC/mL, es por esto que se decidió cambiar la temperatura de choque térmico a 70°C.

Teniendo en cuenta que no hubo crecimiento en el Montaje 1 en las fuentes de carbono glucosa y sacarosa en las condiciones establecidas por Vargas (2018) se realizó el Montaje 2 en donde se implementó un screening de distintas fuentes carbono (**Tabla 2**) para evaluar la esporulación de *Bacillus licheniformis* 08AP, empleando el medio SBM modificado como medio base con el objetivo de evaluar la producción de biomasa y esporas. A diferencia del **Montaje 1**, el medio SBM modificado empleó sales basales distintas tales como $MgSO_4$, KH_2PO_4 , NaCl, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ y $MnSO_4$. Los resultados de biomasa \log_{10} (UFC/mL) y esporas \log_{10} (UFC/mL) en los tiempos 72 horas y 120 horas se observan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Producción de biomasa y esporas a 72 h y 120 h en distintas fuentes de C.

Tto	Fuente de C	72 h			120 h		
		Biomasa Log (UFC/mL)	Esporas Log (UFC/mL)	% Esporulación	Biomasa Log (UFC/mL)	Esporas Log (UFC/mL)	% Esporulación
T1	Glucosa	0	0	0	0	0	0
T2	Sacarosa	8.08	0	0	7.61	5.3	69.10
T3	Almidón	7.2	1.89	26.21	7.1	4.71	66.53
T4	Glicerol	0	0	0	0	0	0
T5	Manitol	7.26	1.23	16.96	7.26	4.70	64.85
T6	Xilosa	0	0	0	0	0	0

T7	Manosa	0	0	0	0	0	0
T8	Sorbitol	7.54	0	0	7.54	4.11	54.59
T9	Lactosa	8.11	1.26	15.50	8.09	4.12	50.93

A partir de los datos de la Tabla 3 se elaboraron las gráficas de producción de biomasa, producción de esporas y porcentaje de esporulación de cada tratamiento en el tiempo 72 h y 120 h.

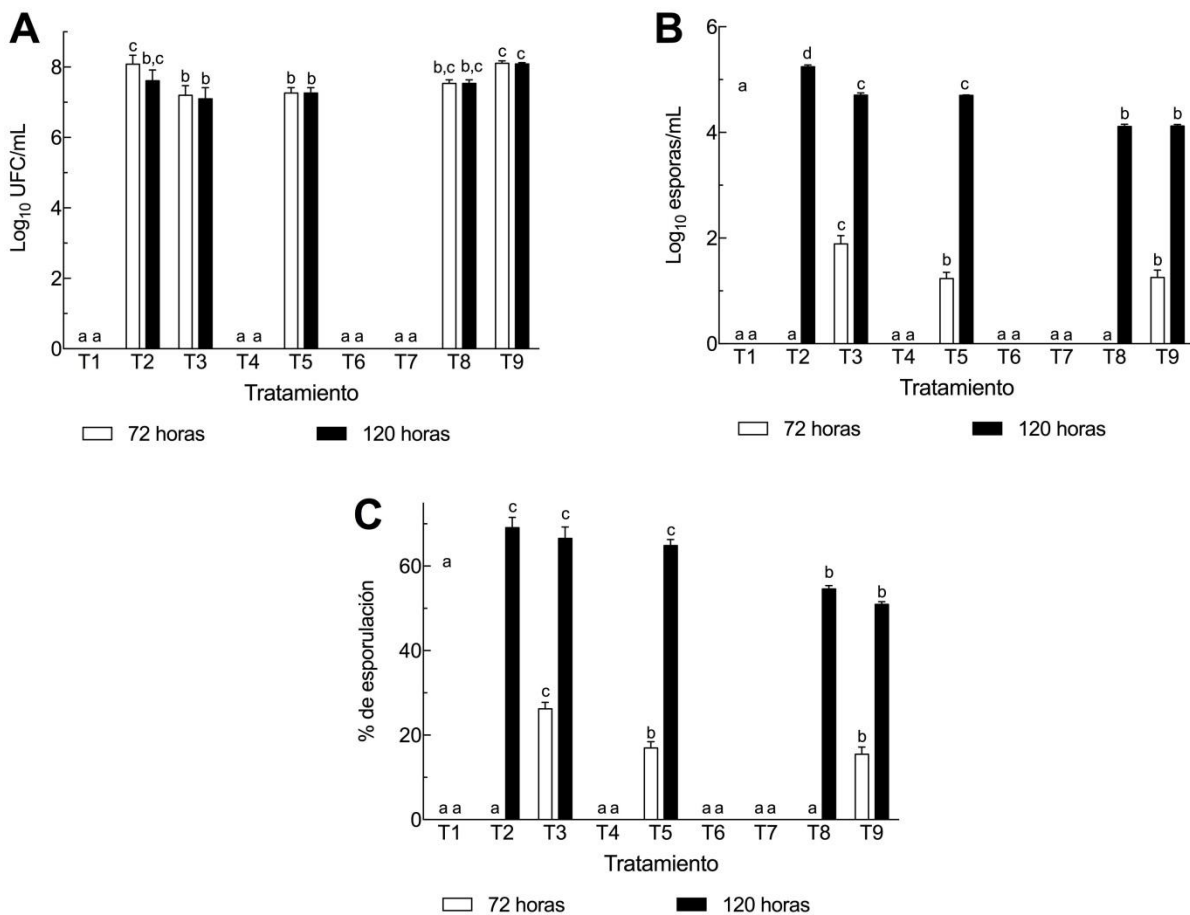


Figura 2. Producción de biomasa **(A)**, esporas **(B)**, y porcentaje de esporulación **(C)** de *Bacillus licheniformis* 08AP a 72 h (color blanco) y 120 h (color negro) en distintas fuentes de carbono **Tabla 2**. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Respecto a las fuentes de carbono empleadas en el montaje 1 y 2, en la glucosa USP grado alimenticio (T1) no hubo formación de biomasa ni de esporas en ninguno de los dos montajes a pesar de que se cambiaron las sales basales, a diferencia de la sacarosa (T2) que si

produjo biomasa con un máximo de 8.08 unidades logarítmicas a 72 h; sin embargo, a este tiempo no produjo esporas pero si a 120 h con un valor de 5.3 unidades logarítmicas para un valor final de % esporulación de 69,10%, esto quiere decir que sí hubo una influencia en el cambio de sales basales a las empleadas en el montaje 1 y en la adición de peptona como fuente de nitrógeno, esto se evidencia en la producción de biomasa y esporas.

La influencia de las fuentes de carbono en la producción de biomasa y esporas obtenidas en los distintos tratamientos pueden ser observadas en la Figura 2. La producción de biomasa fue similar entre el almidón (T3) y manitol (T5) a 72 h (7.2 y 7.26) y 120 h (7.1 y 7.26), al igual que la producción de esporas en los tiempos 72 h (1.89 y 1.23) y 120 h (4.71 y 4.70) **Figura 2**. A su vez, el sorbitol (T8) en el tiempo 72 h y 120 h tuvo una producción de biomasa de 7.54, similar a la del T3, T5 y T9, sin embargo al tiempo 72 h no hubo producción de esporas pero si a las 120 h (4.11) similar al T9 (4.12) **Figura 2**. Por otro lado, la lactosa (T9) fue la que produjo más biomasa en los dos tiempos (8.11 y 8.09); sin embargo, su producción de esporas fue menor que la de sacarosa la cual obtuvo un valor máximo de 5.3 unidades logarítmicas y el porcentaje de esporulación más alto con un valor de 69,10% a 120 h **Tabla 3**. Por último, de las nuevas fuentes de carbono empleadas en el montaje 2 se encontró que en glicerol (T4), xilosa (T6) y Manosa (T7) no hubo producción de biomasa ni de esporas en ninguno de los tiempos.

6. Discusión

El aporte de carbono y nitrógeno son necesarios para la formación de biomasa y productos en un cultivo microbiano. La naturaleza y características de esos sustratos juegan un rol importante en el metabolismo de los microorganismos el cual varía entre especies. También se ha encontrado que tiene una alta influencia en la inducción del proceso de esporulación (Anderson & Jayaraman, 2003). Al evaluar las distintas fuentes de carbono se encontró que *B. licheniformis* 08AP crece en sustratos como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol y lactosa, sin embargo, la producción de esporas varía entre cada uno de estos. Se sabe que en microorganismos del género *Bacillus* es necesario un proceso de “*Quorum-Sensing*” para iniciar su proceso de esporulación el cual ocurre en poblaciones con alta densidad celular, según Posada *et al.*, (2015) en *B. subtilis* en densidades mayores a 8 unidades logarítmicas (UFC/mL) y sólo si la célula está en condición de estrés (Rao *et al.*, 2007). Esto concuerda con las unidades logarítmicas de biomasa máximas alcanzadas en sacarosa y lactosa (8,08 y 8,11) y la producción de esporas. Sin embargo, en las fuentes almidón, manitol y sorbitol no se alcanzó este valor, pero debido la producción de esporas en el tiempo 120 h **Tabla 3** surge

la hipótesis de que sí pudo haber alcanzado biomasa iguales o mayores a 8 unidades logarítmicas entre el tiempo 72 h y 120 h ya que esta densidad es un requisito según Posada *et al.*, (2015) para inducir la esporulación.

El medio de cultivo que permitió la mayor producción de esporas fue el tratamiento T2 el cual está por compuesto de sacarosa (azúcar morena), (23 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.59 g/L), KH_2PO_4 (6 g/L), extracto de levadura 5 g/L, peptona 5 (g/L), NaCl (0.01 g/L) y una solución stock de sales compuesta por $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1 M), 300 μ L/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1 M), 9.9 mL/L de $CaCl_2$ (0.1 M), 30 mL/L de $MnSO_4$ (0.1 M). Esta misma fuente de carbono fue empleada en el montaje 1 en la misma concentración pero con distintas sales tales como cloruro de calcio (0.5 g/L), fosfato monobásico de sodio (0.5 g/L), fosfato dibásico de sodio (0.5 g/L), sin embargo no hubo producción ni de biomasa ni de esporas.

La sacarosa es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa unidos por un enlace O-glucosídico. La sacarosa empleada como fuente de carbono viene en forma de azúcar morena (sacarosa) la cual tiene un 98% de pureza, es decir, 98% corresponde a sacarosa y un 2% a elementos traza los cuales tienen un alto contenido de calcio, hierro y fósforo (Muis, 2006). *Bacillus licheniformis* capta la sacarosa extracelular empleando la proteína EII^{scr} mediante un sistema de fosfotransferasas dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) mediante la enzima sacarosa fosfotransferasa (E.C 2.7.1.211) generando sacarosa-6-P, esta a su vez es hidrolizada mediante la enzima beta-fructofuranosidasa (E.C 3.2.1.26) para producir D-glucosa-6-P la cual ingresa a la vía glucolítica o de las pentosas fosfato, y D-fructosa la cual es fosforilada por la enzima fructoquinasa (E.C 2.7.1.4) para producir D-fructosa-6-P, esta a su vez es convertida a D-glucosa-6-P la cual ingresa a las mismas rutas para la obtención de ATP (Kaenhisa Laboratories, 2017). Una molécula de sacarosa posee un rendimiento energético mayor que una de glucosa (36 ATP y 72 ATP), esto quiere decir que si se emplea sacarosa como fuente de carbono en condiciones aerobias, *Bacillus licheniformis* 08AP obtendrá más energía para la producción de biomasa y por consiguiente se obtendrá mayor cantidad de esporas, sin embargo esto es una desventaja ya que para que se inicie la esporulación debe haber un estrés nutricional el cual tardaría más tiempo en generarse en presencia de sacarosa. Según el metabolismo de *B. licheniformis*, al hidrolizar la sacarosa este metabolizaría primero la D-glucosa-6-P y al agotarse esta el microorganismo sintetizaría enzimas para degradar la D-fructosa-6-P, esto explicaría el por qué para sacarosa (T2) en la hora 72 no se produjo esporas pero si a 120 h. Por último, debido la ausencia de crecimiento del microorganismo en presencia de glucosa, se plantea la hipótesis de que este no posee los mecanismos de captación de esta molécula, ya que como se explicó anteriormente en el metabolismo de la sacarosa, *Bacillus licheniformis* sí posee las enzimas necesarias para

llevar a cabo la metabolización de la D-glucosa. Se sabe que las bacterias emplean un sistema cotransportador Na^+ /glucosa (SGLT), en el cual mediante un gradiente de concentración extracelular de Na^+ la D-glucosa es transportada a favor de su gradiente de concentración junto con el movimiento del ion Na^+ . Es necesario ATP para mantener la concentración extracelular de Na^+ , es por esto que una disminución de la concentración celular de ATP, o la inhibición de la ATPasa intercambiadora de Na^+/K^+ , produce una disminución del gradiente de concentración de Na^+ lo cual impide la captación de glucosa (Devlin, 2006).

B. licheniformis es un microorganismo que tiene la capacidad de producir enzimas extracelulares como amilasas, proteasas y celulasas (Veith *et al.*, 2004). Las amilasas tienen la capacidad de hidrolizar el almidón, el cual es una macromolécula compuesta por amilosa y amilopectina. Mediante la enzima amilopectina fosforilasa (E.C 3.2.1 .1) *B. licheniformis* transforma el almidón en alfa-D-Glucosa-1-P, también puede hidrolizar el almidón mediante la enzima 4-alfa-D-glucanglucanohidrolasa para producir dextrina la cual posteriormente se transforma en D-Glucosa (Kaenhisa Laboratories, 2017). Es por esto que al emplear el almidón como fuente de carbono se obtuvo formación de biomasa y la segunda mejor producción de esporas después de la sacarosa en el tiempo 120 h. Por otro lado también se ha identificado que *B. licheniformis* tiene la capacidad de metabolizar el sorbitol y el manitol (Kaenhisa Laboratories, 2017) esto se evidenció en la formación de biomasa y también se logró producir esporas en el tiempo 120 h.

El nitrógeno es un elemento esencial para todos los organismos, este hace parte de proteínas, ácidos nucleicos y compuestos metabólicos de alto valor energético. En medios de cultivo, el nitrógeno se incorpora empleando fuentes inorgánicas como el sulfato de amonio y fuentes orgánicas como el extracto de levadura y la peptona. Neogen (2005) reporta que el extracto de levadura es la porción soluble en agua, de levadura lisada que contiene un complejo de vitamina B. Este es un excelente estimulador del crecimiento bacteriano. Además, de proveer vitaminas y nitrógeno, también provee aminoácidos y carbono en cultivos microbiológicos (Muis, 2006). El extracto de levadura y la peptona, también proveen proteínas las cuales son un factor clave en la esporulación ya que protegen el ADN y forman una capa multiproteica por fuera de la corteza de la espora (Lallo *et al.*, 2009).

Al emplear sacarosa con las nuevas sales añadidas en el montaje 2 respecto a las del montaje 1 (MgSO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , FeSO_4 , ZnSO_4 y MnSO_4), se observó que hubo alta producción de biomasa y esporas. Se ha reportado que cuando se añaden sales a los medios se promueve la esporulación, pero si se adicionan en altas cantidades también se incrementa

la concentración de metales que contienen esas sales lo cual puede inhibir el crecimiento. Sin embargo elementos como Ca, Mn, Mg, Fe y Zn en apropiadas concentraciones son esenciales en la esporulación (Posada *et al.*, 2015), ya que están presentes en las capas de las esporas lo cual le permiten resistir a altas temperaturas (Nguyen *et al.*, 2011), esto explicaría el por qué la poca termotolerancia (70°C) de las esporas obtenidas en el medio combinado después del choque térmico en el montaje 1. También se ha reportado que elementos como Fe y Zn aceleran el proceso de esporulación (Hageman *et al.*, 1984). Por último Posada *et al* (2015) también encontraron que MgSO₄ tiene un efecto positivo (P= 0,041) sobre la densidad celular en *Bacillus subtilis* EA-CB0575, es por esto que se recomienda incrementar su valor para aumentar la formación de biomasa.

7. Conclusiones

La azúcar morena (sacarosa) fue la mejor fuente de carbono para el medio de cultivo para producción de esporas de *Bacillus licheniformis* 08 AP, debido a que proporciona un aporte extra de energía en forma de ATP y de elementos traza como calcio, hierro y fósforo. También, la adición de sales que contienen elementos como Ca, Mn, Mg, Fe y Zn favorece la producción de biomasa y esporas. Sustratos como almidón, manitol, sorbitol y lactosa también pueden ser optimizados como fuente de carbono para la producción de esporas, sin embargo su costo es más elevado, es por esto se recomienda el uso de azúcar morena la cual es más económica y es de fácil acceso.

8. Recomendaciones

Es necesario realizar una cinética de crecimiento y de consumo de sacarosa para identificar el inicio de la fase de latencia y la concentración de sustrato en la cual *Bacillus licheniformis* 08AP inicia su proceso de esporulación, esto permitiría optimizar el tiempo de cultivo y la concentración de sustrato inicial a emplear.

Se recomienda realizar un diseño Plackett-Burman para encontrar cuales componentes son más significativos y tienen efecto en la esporulación, para así poder optimizar sus concentraciones.

Una vez optimizado el medio, se recomienda optimizar la temperatura de choque para de esta manera evaluar la termotolerancia de las esporas producidas por este medio, al aumentar la

temperatura permitiría descartar la presencia de células que hayan resistido al choque térmico a 70°C.

También se recomienda volver a evaluar la fuente glucosa disminuyendo la concentración empleada (22.5 g/L), es permitiría descartar una represión generada por una alta concentración del sustrato.

Por último, se recomienda cuantificar la actividad amilolítica y proteolítica de las esporas germinadas producidas a partir del medio optimizado.

9. Bibliografía

Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganism in agriculture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1): 11-18, 2009.

Calvo P, Nelson L, Kloepper J. Agricultural uses of plant bioestimulants, *Plant and Soil*, 383: 3-41, 2015

Checinska A, Paszczynski A, Burbank M. Bacillus and other spore-forming genera: Variations in responses and mechanism for survival, *Annual Review Food Science Technology*, 6: 351-369, 2015.

Devlin, T. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas, Barcelona, España, *Editorial reverte*, S.A, p.p 526, 2006.

Florez E, Perez F, De la Torre M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83: 561-564.

Gu X, Zheng Z, Yu H, Wang J, Liang F, Liu R. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method, *Process Biochemistry*, 40: 3196-3201, 2005.

Hageman J, Shankweiler G, Wall P, Franich K, Mccowan G, Cauble S, Grajeda J, Quinones G. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation and extracellular protease production, *Journal of Bacteriology*, 160: 438-441.

Hmidet N, Ali N, Haddar A, Kanoun S, Alya S, Nasri M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive, *Biochemical Engineering Journal*, 47(1): 71-79, 2009.

Huang S, Chen D, Pelczar P, Vepachedu, R. Setlow, P. Li, Y. 2007. Levels of Ca^{2+} -Dipicolinic Acid in Individual *Bacillus* Spores Determined Using Microfluidic Raman Tweezers, *Journal of Bacteriology*, 189(13): 4681-4687.

Kaenhisa Laboratories. Ruta metabólica del almidón y la sacarosa en *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, 2017. Disponible en: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=bli&mapno=00500&mapscale=&show_description=hide.

Kaenhisa Laboratories. Ruta metabólica de la fructosa y la manosa en *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, 2017. Disponible en: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bli00051+BL00700

Khardziani T, Kachlishvili E, Sokhadze K, Elisashvili V, Weeks R, Chikindas M, Chistyakov V. Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for Spore Production in Submerged Fermentation of Plant Raw Material, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(4): 233-286, 2013.

Lallo R, Maharajd D, Görgens J, Gardiner N. High-density spore production of a *B. cereus* aquaculture biological agent by nutrient supplementation, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83:59-66, 2009.

Monteiro S, Clemente J, Henriques A, Gomez R, Carrondo M, Cunha A. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*, *Biotechnology Progress*, 21: 1026-1031, 2005.

Monteiro S, Clemente J, Carrondo D, Cunha A. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium, *Advances in Microbiology*. 4:444-454, 2014.

Muis A. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control, *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 7(2): 51-56, 2006.

Neogen. 2005. Media ingredients, peptones and hydrolysates. <http://www.neogen.com>

Nguyen H, Durand A, Loison P, Pierrer J, Gervais P. Effect on sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure, *Applied Microbiology and Cell Physiology*, 90:1409-1417, 2011.

Owen D, Williams A, Griffith G, Withers P. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition, *Applied Soil Ecology*, 86:41-54, 2014.

Portela D, Chaparro A, Lopez S. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura, *NOVA*, 11:87-96, 2013.

Posada L, Romero M, Villegas V. Effect on medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38:1879-1888, 2015.

Rao Y, Tsay K, Wu W, Tzeng Y. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefanciens* B128 using response surface methodology, *Process Biochemical*, 42: 535-541, 2007.

Salamanca S. Compostaje de residuos industriales en Colombia, *Revista Técnicaña*, 28, 2012.

Schallmeyer M. Singh A, Ward O, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, 50:1–17, 2004.

Serrano A, Torres A. Evaluación del efecto de un bioinoculante, en el proceso de compostaje de mortalidades porcícolas, *Trabajo de Grado de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias*. 16, 2017.

Sonenshein A. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*, *Current Opinion in Microbiology*, 3:561-566, 2000.

Stephenson K, Hoch J. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay, *Molecular Microbiology*, 46:297-304, 2002.

Stragier P, Losick R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 30:297-341, 2000.

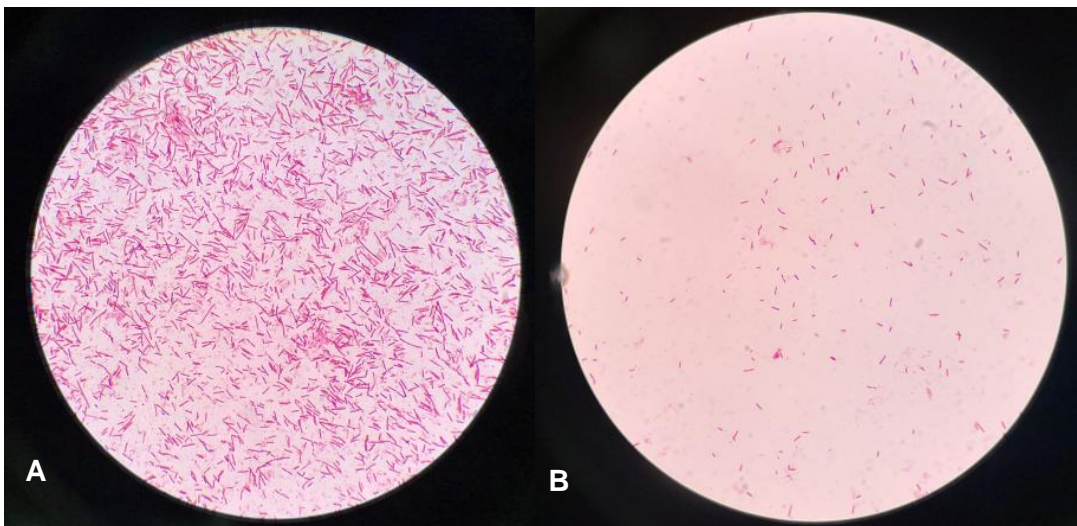
Suarez L, Ramírez S. Evaluación de condiciones de aplicación de un bioinoculante termofílico en un proceso de compostaje, *Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias*. 1-39, 2015.

Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer K, Ehrenreich P, Bäumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A, Gottschalk G. The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7:204-211, 2004.

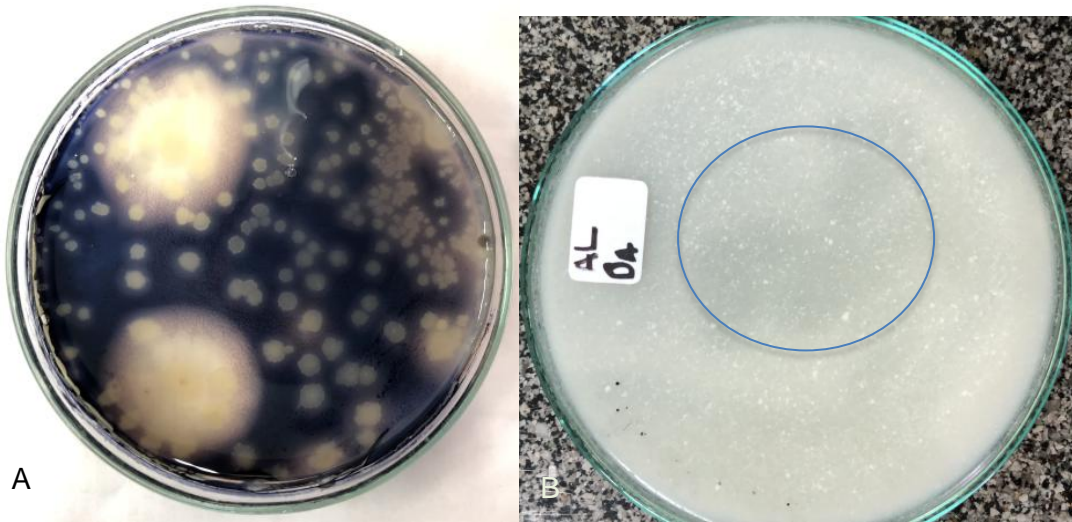
Zhang Y, Xiong H, Guo X. Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis*, *Folia Microbiologica*, 59:31-36, 2014.

Anexos

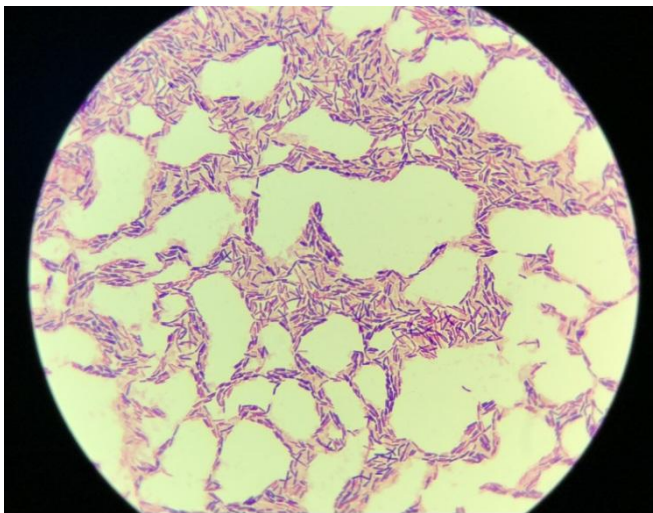
1. Coloración Gram



A. Coloración de Gram Morfotipo 1. B. Coloración de Gram Morfotipo 2.

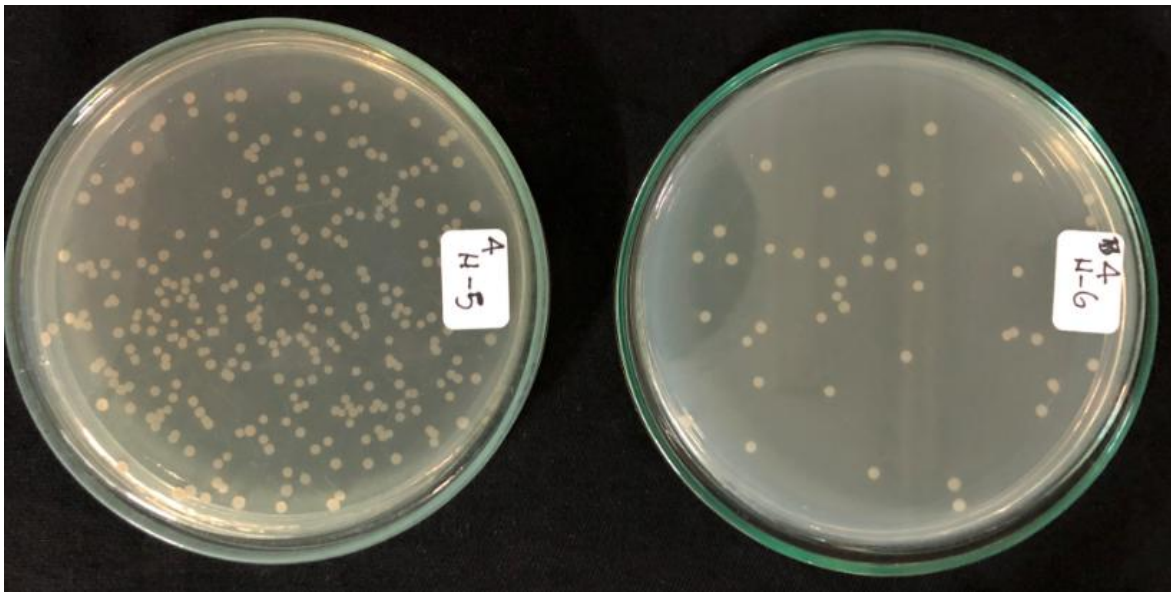


A. Revelación de halos de hidrolisis con lugol en agar almidón del Morfotipo 2 indicando actividad amilolítica. **B.** Halos de hidrolisis de Morfotipo 2 en agar leche.

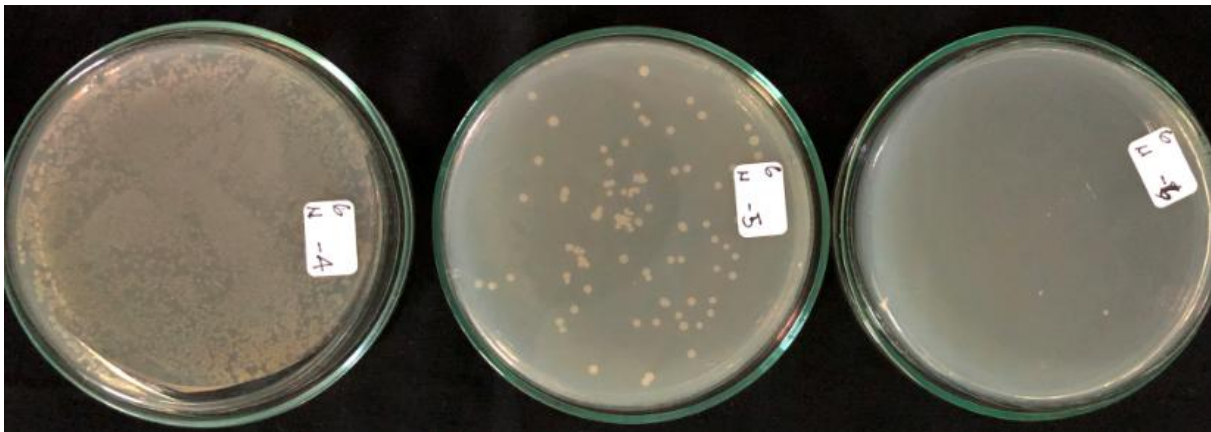


Coloración Gram de esporas germinadas en agar nutritivo

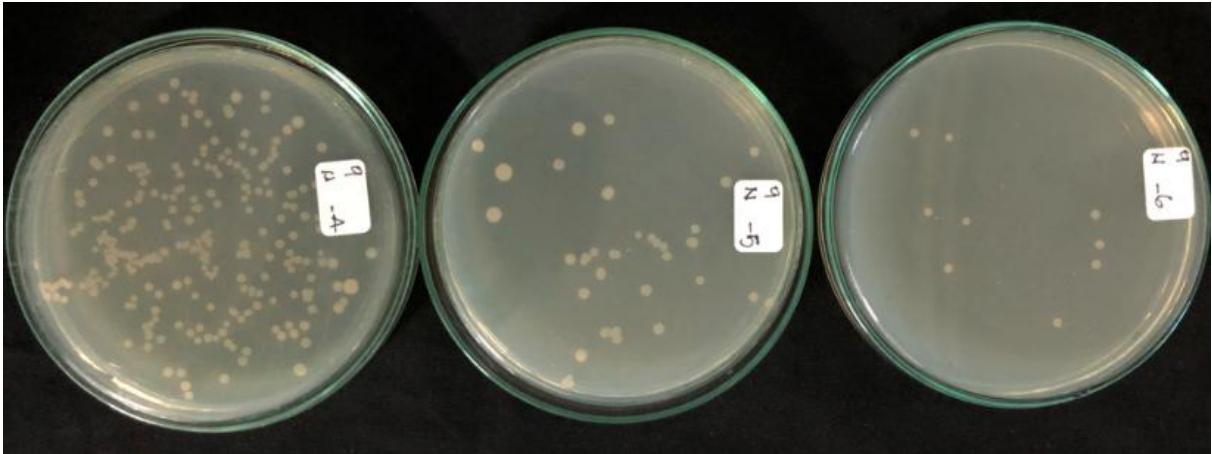
2. Recuentos esporas



Esporas germinadas del T2 (sacarosa) en tiempo 72h en agar nutritivo en las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} .



Esporas germinadas del T3 (almidón) en tiempo 72h en agar nutritivo en las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-6} .



Esporas germinadas del T5 (Manitol) en tiempo 72h en agar nutritivo en las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-6} .