



Diseño y optimización de un medio de cultivo para producción de esporas de *Bacillus* sp.

Juan David Vargas Mendoza.

Director: Ivonne Gutiérrez Rojas M.Sc., Ph.D

Codirector: Adriana Matiz Villamil M. Sc

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

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución Nº 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 Dios quien puso personas maravillosas en el camino para lograr esta meta.

A mis padres por ser quienes hicieron esto posible, por su ayuda, su comprensión en los momentos difíciles y a su guía para siempre dar lo mejor de si y hacer lo correcto.

A mi directora Ivonne Gutiérrez y codirectora Adriana Matiz por permitirme hacer parte de este proyecto, por su orientación y ayuda en momentos difíciles. Por todas las enseñanzas que me dejan para la vida con este proyecto y por su comprensión que sin ella nada de esto sería posible.

Agradezco a la coordinadora del Laboratorio de Biotecnología Aplicada Balkys Quevedo, ya que con ella también fue posible la realización de este proyecto y a mis compañeros del laboratorio quienes daban su apoyo y sus risas.

Quiero agradecer a mis amigos, en especial a María Camila Quintero por su compañía en los momentos difíciles, por su apoyo y ayuda incondicional.

Gracias a todas las maravillosas personas que trabajan en el área de monitoria de la facultad de ciencias, por su colaboración, paciencia y amistad.

Tabla de contenido

Resumen	
Abstract	
1.Introducción	8
2. Marco teórico	10
2.1. El género_Bacillus	10
2.2. Las esporas	10
2.3. Antecedentes del microorganismo	11
2.4. Medios de cultivo para la producción de esporas	12
2.5. Optimización de medios de cultivo	13
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. Metodología	14
4.1. Ubicación	14
4.2. Cepa microbiana	14
4.3. Selección de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y temperatura	15
4.4. Selección de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno	16
4.5. Condiciones de cultivo	16
4.6. Recuento de esporas	17
4.7. Evaluación de la actividad enzimática	17
4.8. Análisis estadístico	17
5. Resultados y discusión	17
5.1. Selección de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y temperatura	17
5.2. Selección de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno	21
5.3. Evaluación de la actividad enzimática	25
6. Conclusiones	26
7. Recomendaciones	26
8. Referencias	27
Anexos	33
Anexo 1. Composición de Medios de cultivo	33
Anexo 2. Coloración de Gram	36

Lista de Figuras

Figura 1. Gráfico de Interacción de los factores fuente de carbono (A), fuente de nitrógeno (B). Como fuentes de carbono se usaron glucosa y sacarosa, mientras que se usaron extracto de levadura (B1), sulfato de amonio (B2) y una mezcla extracto de levadura/sulfato de amonio (B3) como fuentes de nitrógeno	19
Figura 2. Gráfico de superficie respuesta obtenido para el recuento de esporas de <i>Bacillus</i> sp. 12AP en función de la concentración de fuente de carbono (g/L) y la concentración de fuente de nitrógeno (g/L). El gráfico se obtuvo a partir del diseño central compuesto	22
Figura 3. Gráfico de contornos en el cual se ve el \log_{10} del recuento de esporas de <i>Bacillus</i> sp. 12 AP en respuesta a variar las concentraciones de fuente de carbono y de nitrógeno. Igualmente se ve el efecto que tiene la interacción entre fuente de carbono y fuente de nitrógeno con el recuento de esporas	23

Lista de tablas

Tabla 1. Factores del diseño factorial	15
Tabla 2. Tratamientos del diseño factorial	15
Tabla 3. Diseño Central Compuesto	16
Tabla 4. Tratamientos del Diseño Central Compuesto	16
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) del recuento de esporas del diseño factorial	18
Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) del recuento de esporas para el Diseño Central Compuesto	21
Tabla 7. Punto óptimo fuente de carbono y nitrógeno	25

Resumen

El crecimiento de la población junto con el desarrollo industrial ha llevado a un aumento cada vez mayor en la producción de residuos sólidos. Se estima que en la ciudad de Bogotá se producen entre 4000 a 6000 toneladas de estos residuos, los cuales pueden ser utilizados para obtener productos de valor agregado como lo es el abono orgánico (compost). En el proceso de compostaje los microorganismos son los encargados de degradar los sustratos presentes en los residuos orgánicos y pueden ser aplicados por medio de bioinoculantes. Sin embargo, uno de los problemas de los inoculantes es su vida útil, ya que los microorganismos deben ser resistentes a condiciones adversas. Entre los microorganismos que pueden cumplir estas características (degradación de sustratos y resistencia) se encuentra el género *Bacillus*, un grupo de microorganismos capaces de formar esporas, estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir a condiciones extremas de temperatura o de limitación nutricional.

El objetivo de este proyecto fue diseñar y optimizar un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus* sp. 12AP. Para ello se evaluaron las fuentes de carbono glucosa y sacarosa y las fuentes de nitrógeno sulfato de amonio, extracto de levadura, una mezcla de las dos y las temperaturas 37 y 55 °C con un diseño factorial de 2^3 . Los resultados arrojaron un recuento de 3.5×10^7 *Esporas/mL* con sacarosa como fuente de carbono, sulfato de amonio/extracto de levadura como fuente de nitrógeno y temperatura de 55°C. Se optimizó la concentración de estas fuentes de carbono y nitrógeno con un diseño central compuesto, el cual permitió ver que era necesario disminuir la concentración de fuente de carbono y aumentar la de nitrógeno para obtener el medio óptimo para la producción de esporas de *Bacillus* sp. 12 AP. Medio compuesto por: 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*. La actividad enzimática se mantuvo igual en el medio de producción original (halos de $10\text{mm} \pm 3.61$ y halos de $2.3\text{mm} \pm 0.58$ para enzimas proteolíticas y amilolíticas respectivamente) como en el medio optimizado (halos de $10\text{mm} \pm 7.81$ y halos de $2.3\text{mm} \pm 1.15$ para enzimas proteolíticas y amilolíticas respectivamente).

Se concluyó que es necesario disminuir la concentración de la fuente de carbono y aumentar la de nitrógeno para aumentar la producción de esporas; además es importante tener en cuenta las condiciones experimentales como la temperatura (55°C), que es un factor determinante en el proceso de esporulación de *Bacillus* sp. 12 AP y que no se afecta la actividad enzimática del microorganismo al producir las esporas en un medio sin una fuente de almidón o proteína.

Palabras clave: *Bacillus*, esporulación, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, optimización de medios de cultivo.

Abstract

The growth of the population along with the industrial development has led to an increasing increase in the production of solid waste. It is estimated that between 4000 and 6000 tons of this waste are produced in the city of Bogotá, which can be used to obtain value-added products such as organic fertilizer (compost). In the composting process, microorganisms are responsible for degrading the substrates present in organic waste and can be applied by means of bio-inoculants. However, one of the problems of inoculants is their shelf life, since microorganisms must be resistant to adverse conditions. Among the microorganisms that can fulfill these characteristics (substrate degradation and resistance) is the genus *Bacillus*, a group of microorganisms capable of forming spores, structures of resistance that allow it to survive extreme conditions of temperature or nutritional limitation.

The objective of this project was to design and optimize a culture medium to produce spores of *Bacillus* sp. 12AP. To this end, the sources of carbon glucose and sucrose and the sources of nitrogen, ammonium sulfate, yeast extract, a mixture of the two and temperatures 37 and 55 °C with a factorial design of 2^3 were evaluated. The results yielded a count of 3.5×10^7 *Esporas/mL* with sucrose as carbon source, ammonium sulfate / yeast extract as nitrogen source and temperature of 55 °C. The concentration of these carbon and nitrogen sources were optimized with a central composite design, which allowed to see that it was necessary to reduce the concentration of carbon source and increase the nitrogen concentration to obtain the optimum medium for the production of *Bacillus* sp. 12 AP spores. Medium composed of: Brown sugar (11 g/L), Yeast extract (6.4 g/L), Ammonium sulfate (3 g/L), Calcium chloride (0.5 g/L), Sodium monobasic phosphate (0.5 g/L) and sodium dibasic phosphate (0.5 g/L), with a count of 1×10^8 *Esporas/mL*. Enzymatic activity remained the same in the original production medium (halos of 10mm \pm 3.61 and halos of 2.3mm \pm 0.58 for proteolytic and amylolytic enzymes respectively) as in the optimized medium (halos of 10mm \pm 7.81 and halos of 2.3mm \pm 1.15 for proteolytic and amylolytic enzymes respectively).

It was concluded that it is necessary to decrease the concentration of the carbon source and increase the concentration of nitrogen to increase the production of spores; It is also important to consider the experimental conditions such as temperature (55°C), which is a determining factor in the sporulation process of *Bacillus* sp. 12 AP and that the enzymatic activity of the microorganism is not affected by producing the spores in a medium without a source of starch or protein.

Key words: *Bacillus*, carbon source, nitrogen source, optimization of culture media, sporulation.

1. Introducción

El crecimiento de la población junto con el desarrollo industrial ha llevado a un aumento cada vez mayor en la producción de residuos sólidos. En la ciudad de Bogotá, se estima que a diario se producen entre 4000 a 6500 toneladas de estos residuos (Bogota *et al.*, 2008; Hermida 2014), donde la mayor cantidad de los mismos se producen en las denominadas “plazas de mercado”. La central mayorista (Corabastos) aporta aproximadamente 350 toneladas diarias y en general una plaza de mercado en la ciudad de Bogotá, genera un aproximado de 7.1 toneladas de residuos sólidos en una semana (Hermida 2014). Muchos de estos desechos se eliminan sin tener en cuenta que pueden ser reutilizados y se llevan directamente a relleno sanitario, lo cual puede representar un riesgo tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Hermida 2014; Srivastava *et al.*, 2016).

Estos residuos pueden ser utilizados como fuente de recursos renovables ya que contienen una fracción orgánica (C:N), que permite la obtención de diversos productos con valor agregado (Srivastava *et al.*, 2016). Una de las alternativas para disponer de estos residuos es el compostaje, el cual se considera uno de los métodos más adecuados para eliminación de estos desechos (Gill *et al.*, 2014). Este es un proceso que involucra la descomposición biológica y estabilización de sustratos orgánicos a través de la actividad y multiplicación de microorganismos termófilos y mesófilos; lo cual permite obtener un producto estable, con mayor cantidad de materia orgánica utilizable, libre de patógenos, plagas y pesticidas, que puede ser utilizado como abono en agricultura (Gill *et al.*, 2014).

Uno de los factores más importantes en el proceso de compostaje son los microorganismos, los cuales son los encargados de producir una amplia gama de enzimas, las cuales están encargadas de degradar las macromoléculas de estos desechos orgánicos como lignocelulosa, proteínas, lípidos, entre otros (Gill *et al.*, 2014). Dichos microorganismos pueden ser aplicados al proceso de compostaje en los llamados inoculantes biológicos (Ngampimol & Kunathigan 2008; Herrmann & Lesueur 2013). Estos inoculantes pueden mejorar la degradación de compuestos orgánicos, aumentar la población microbiana y también acelerar el proceso de compostaje, permitiendo que el proceso ocurra en menos tiempo y que se obtenga un producto de mejor calidad (mayor cantidad de nutrientes disponible), (Karnchanawong & Nissaikla 2014; Serrano & Torres 2017). En este aspecto, el laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana, ha venido trabajando en la producción de inoculantes para acelerar procesos de compostaje (Suárez & Ramírez 2015; Serrano & Torres 2017). Sin embargo, uno de los problemas de los inoculantes es su vida útil o también llamada vida en anaquel, la cual debe ser prolongada y se alcanza generalmente proporcionando microorganismos resistentes a condiciones adversas o

microorganismos bien protegidos para sobrevivir condiciones adversas (Herrmann & Lesueur; 2013).

De acuerdo con lo anterior, se hace importante la búsqueda de un microorganismo que sea capaz de sobrevivir en condiciones adversas y que sea capaz de degradar los residuos orgánicos contenidos en los desechos de las ya mencionadas plazas de mercado. Para ello se propone a los microorganismos del género *Bacillus*, los cuales comprenden a un grupo de bacterias Gram positivas conocidas por su capacidad de producir metabolitos como, enzimas amilolíticas o proteolíticas (Schallmey *et al.*, 2004; Božić *et al.*, 2014; Godinho *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016) y que son capaces de formar esporas, estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir a condiciones extremas de temperatura o de limitación nutricional (Higgins & Dworkin 2012; Checinska *et al.*, 2015). Dentro de los estudios del laboratorio de Biotecnología Aplicada, se destaca la cepa de *Bacillus* 12 AP, la cual presenta una alta actividad enzimática (amilolítica y proteolítica) y fue utilizada en inoculantes de estudios previos (Suarez & Ramírez 2015, Serrano & Torres 2017).

Para aprovechar industrialmente las esporas, se requiere una alta densidad celular y una alta eficiencia de esporulación, teniendo en cuenta que para obtener esa eficiencia de esporulación, se requiere una alta densidad poblacional de células vegetativas (biomasa), (Monteiro *et al.*, 2005; Khardziani *et al.*, 2017), lo cual se puede conseguir con el diseño y optimización de un medio de cultivo (Laloo *et al.*, 2009). El diseño y optimización del medio de cultivo es clave en el desarrollo de un bioproceso para obtener una alta densidad de esporas, ya que se ha demostrado que las fuentes nutricionales (como fuente de carbono o nitrógeno) influyen en el crecimiento del microorganismo, en la producción de esporas y en la síntesis de metabolitos de uso comercial como las enzimas (Monteiro *et al.*, 2005; Laloo *et al.*, 2009; Khardziani *et al.*, 2017). Sin embargo, existen otros factores, como el pH, la aireación o la temperatura que también pueden tener un efecto en el crecimiento del microorganismo, ya que cada cepa particular tiene sus propios requerimientos y condiciones óptimas (Posada-Uribe *et al.*, 2015) y por ende en la producción de esporas (Malarkodi *et al.*, 2013; Posada-Uribe *et al.*, 2015).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, es pertinente diseñar y optimizar un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus* sp. 12 AP, debido a su capacidad metabólica para llevar a cabo el proceso de degradación de desechos orgánicos y la posibilidad de usarlas en un bioinoculante con vida útil prolongada; por ello, surge la pregunta ¿Cuál es el medio de cultivo y temperatura óptima para producir esporas de *Bacillus* sp., cepa 12AP?

2. Marco teórico

2.1 El género *Bacillus*

El género *Bacillus* comprende una serie de microorganismos bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, que pueden vivir en gran diversidad de ambientes, como suelo, agua, aire y residuos de plantas en descomposición (Muis 2006; Checinska *et al.*, 2015). Los microorganismos de este género se caracterizan por tener una amplia gama de aplicaciones, como lo es colonizar raíces de plantas, para así protegerlas de diversos hongos patógenos debido a la producción de sustancias antibióticas como la iturina (Muis, 2006), también se conocen como biopesticidas, ya que son capaces de controlar plagas de mosquitos y larvas (Poopathi & Archana, 2012). Mientras que en otros campos se ha visto que pueden ser utilizados como indicadores biológicos de esterilidad y antisepsia, en productos o procesos, así como en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Sella *et al.*, 2013) y se han estudiado sus aplicaciones como microorganismos probióticos (Zhang *et al.*, 2014).

Sin embargo, el mayor potencial biotecnológico de estos microorganismos se encuentra en la producción de metabolitos como lo son las enzimas amilasas, proteasas o celulasas, (Schallmeyer *et al.*, 2004; Božić *et al.*, 2014; Godinho *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016) y que, junto a su alta tasa de crecimiento, los ha puesto entre los productores de enzimas industriales más importantes (Schallmeyer *et al.*, 2004). Esta producción de diversas enzimas los hace candidatos para participar en la degradación de desechos orgánicos, ya que las enzimas hidrolíticas extracelulares son las que van a permitir la degradación de las macromoléculas contenidas en esos desechos (Gill *et al.*, 2014).

2.2 Las esporas

Los microorganismos del género *Bacillus* son capaces de responder a limitaciones nutricionales al formar unas estructuras de resistencia llamadas esporas o endosporas; las cuales son morfológicamente diferentes a una célula vegetativa y se caracterizan por ser células con baja actividad metabólica, resistentes al medio ambiente, capaces de sobrevivir a condiciones extremas de temperatura, o en respuesta a la falta de nutrientes (Higgins & Dworkin 2012; Checinska *et al.*, 2015; Posada-Uribe *et al.*, 2015). La formación de una espora, se debe al proceso llamado esporulación (Sella *et al.*, 2014), *Bacillus* sp. usa el sistema de “*Quorum Sensing*” para iniciar dicho proceso, que ocurre sólo cuando hay una alta densidad celular y dicha población se encuentra en condiciones de estrés (Posada-Uribe *et al.*, 2015).

Cuando empieza este proceso ocurre una división celular asimétrica lo cual permite la formación de una célula pequeña, la espora precoz, y una célula más grande denominada célula madre. Durante este proceso se forma un septo que divide a ambas células y en donde eventualmente la espora precoz queda contenida dentro de la célula madre (Higgins & Dworkin, 2012). Luego la célula madre es la que permite la formación de la espora madura al formar dos capas, una interna compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano y dipicolinato de calcio, mientras que la externa está compuesta por aproximadamente 80 proteínas dispuestas en capas internas y externas, y un núcleo de ácido dipicolínico, lo cual le otorga la capacidad de resistencia (Sella *et al.*, 2014; Setlow 2014), al final del proceso una serie de enzimas líticas destruyen la célula madre liberando a la espora madura (Sella *et al.*, 2014).

Las esporas pueden mantenerse en estado latente por largos períodos de tiempo y tienen una extraordinaria resistencia no sólo a daños ambientales o calor, sino también a radiación, compuestos tóxicos y pH extremos (Sella *et al.*, 2014). Aunque una vez las condiciones ambientales son favorables ocurre el proceso de germinación, en donde inicia una serie de pasos en respuesta a la reposición nutricional; se rehidrata el núcleo de la espora reactivando los procesos bioquímicos y finalmente ocurre la hidrólisis de la cubierta en donde emerge una nueva célula vegetativa (Sella *et al.*, 2014).

La producción de estas estructuras ha llamado la atención de los investigadores por su alta aplicación biotecnológica (Tavares *et al.*, 2013). En años recientes ha habido un interés en usar las esporas de *Bacillus subtilis* en productos probióticos, agentes biocontroladores, en agricultura como biopesticidas, biofertilizantes o bioinoculantes (Chen *et al.*, 2010; Posada-Uribe *et al.*, 2015). y como se ha venido mencionando, aplicación en la degradación de residuos orgánicos por la producción de diversas enzimas como proteasas, lipasas y celulasas (Lalloo *et al.*, 2009; Khardziani *et al.*, 2017).

2.3 Antecedentes del microorganismo en estudio

En el laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana, se tienen 12 aislamientos de *Bacillus* spp. obtenidos a partir de residuos sólidos urbanos (Galindo & Londoño 2005), dichos aislamientos se caracterizan por ser termófilos, ya que crecen a temperaturas de entre 55 y 65°C con un tiempo de incubación de entre 48-72 horas y son productores de enzimas tanto amilolíticas como proteolíticas (Galindo & Londoño 2005; Serrano & Torres 2017). Dentro de estos aislamientos se destaca el denominado *Bacillus* sp. 12AP, el cual presenta una alta actividad enzimática (amilolítica y proteolítica) por lo que fue utilizado en inoculantes para la degradación de residuos orgánicos en estudios posteriores (Suarez & Ramírez 2015; Serrano & Torres 2017).

En cuanto a la producción de inoculantes para acelerar procesos de compostaje, en uno de los estudios se produjo un inoculante bacteriano con bacilos Gram positivos (donde se encontraba el aislamiento *Bacillus* sp. 12 AP) y una actinobacteria. En este estudio se logró reducir el tiempo de compostaje de 12 a 8 semanas (Suarez & Ramírez 2015), aunque más recientemente Serrano & Torres (2017) produjeron un inoculante compuesto por un consorcio bacteriano de *Bacillus* sp., y *Penicillium* sp. HC1, el cual permitió reducir el tiempo del proceso de compostaje en unos cuantos días.

2.4 Medios de cultivo para la producción de esporas

Previamente se mencionó que el desarrollo de las esporas depende de varios factores; entre los factores nutricionales puede ocurrir, el agotamiento de fuente de carbono, nitrógeno, fósforo o micronutrientes esenciales (Lalloo *et al.*, 2009), los sustratos limitantes como fuente de carbono o fuente de nitrógeno son los factores principales que influyen en el crecimiento celular, en la producción de esporas y síntesis de metabolitos útiles (Lalloo *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2014). De igual forma, el medio de cultivo influye sobre el ambiente nutricional y fisicoquímico, lo cual afecta directamente la productividad y economía del proceso (Lalloo *et al.*, 2009).

En ese mismo sentido, varios autores señalan diferentes condiciones óptimas para producir esporas; por ejemplo, para *Bacillus subtilis* subsp. KATMIRA 1933. Khardziani *et al.*, (2017) demuestran que la concentración de glucosa (2 g/L) y peptona (40mM) son los nutrientes fundamentales para la producción de esporas, ya que lograron producir 7×10^{10} esporas/mL. De forma similar Monteiro *et al.*, (2014) encontraron para *Bacillus subtilis*, que la glucosa (20 g/L) y sulfato de amonio (0.4 g/L) permitían la producción de 6.3×10^{12} esporas/mL. Sin embargo, Chen *et al.*, (2010) encontraron que para *Bacillus subtilis* (WHK-Z12) el licor de maíz (16.18g/L) junto con la harina de soya (17.53g/L) permitió producir 1.52×10^{10} esporas/mL y al combinar el licor de maíz con extracto levadura (8.14g/L) lograron obtener 1.56×10^{10} esporas/mL. Es evidente entonces, que cada cepa de *Bacillus subtilis* tiene sus propios requerimientos y condiciones óptimas para producir esporas (Posada-Urbe *et al.*, 2015).

El uso de un único medio de cultivo químicamente definido que permita tanto el crecimiento rápido como la esporulación completa, sería ventajoso ya que se podrían regular estos parámetros para así obtener lotes homogéneos y reproducibles (Monteiro *et al.*, 2014). Un medio de cultivo químicamente definido se caracteriza por contener cantidades conocidas de los denominados “ingredientes químicamente definidos”, compuestos a los cuales se les conoce su estructura química, como la glucosa o el sulfato de amonio, y no incluye los llamados “ingredientes complejos”, compuestos que tienen una composición desconocida, como

proteínas o hidrolizados (Monteiro *et al.*, 2014). Por ello, conocer la estructura química de los “ingredientes químicamente definidos” es lo que permite un crecimiento consistente del microorganismo y con ello la homogeneidad y la reproducibilidad (Monteiro *et al.*, 2014). Sin embargo, el uso de un medio de cultivo químicamente definido que permita un alto rendimiento de esporas, es relativamente costoso y muy difícil de adaptar para producciones en masa (Shi & Zhu 2007).

2.5 Optimización de medios de cultivo

Para obtener un medio de cultivo que permita un alto crecimiento junto con la esporulación, se debe tener en cuenta que la formulación y optimización son claves en el proceso (Laloo *et al.*, 2009). La optimización es la mejor manera de realizar una actividad y tiene como fin obtener el máximo rendimiento de producto por gramo de sustrato consumido (Sreekumar & Krishnan 2010).

Se ha estudiado la optimización de medios de cultivo para mejorar el crecimiento microbiano utilizando diferentes estrategias y dependiendo de la aplicación del mismo (Mosquera *et al.*, 2014). La optimización de medios se había hecho normalmente con el método de una variable a la vez, el cual lleva mucho tiempo, no considera la interacción entre dos o más factores, es extremadamente laborioso y no garantiza que se hayan determinado las condiciones óptimas (Rao *et al.*, 2007; Shi & Zhu 2007). Aunque actualmente se usan otro tipo de técnicas que comprenden estadística y matemática, redes neurales artificiales, lógica borrosa y algoritmos genéticos (Chen *et al.*, 2010); es importante resaltar que en los procesos de optimización estadísticos se puede minimizar el error y aumentar la probabilidad de encontrar las condiciones óptimas al detectar la relación entre los factores y la mejor respuesta (Sreekumar & Krishnan, 2010).

Dentro de las herramientas estadísticas y matemáticas para el screening se encuentra la metodología Plackett-Burman, la cual se puede usar para encontrar las variables significativas de un sistema, organizarlas en orden de importancia y decidir cual se va a investigar más a fondo, para así determinar los valores óptimos (Sreekumar & Krishnan 2010). De hecho, esta técnica es efectiva para seleccionar componentes significativos del medio, permitiendo que los factores insignificantes sean eliminados y así se obtenga un conjunto más pequeño de variables fáciles de manejar (Chen *et al.*, 2010).

La otra metodología más utilizada en el proceso de optimización de medios de cultivo es la de Superficie Respuesta (Chen *et al.*, 2010), la cual consiste en un grupo de procedimientos matemáticos y estadísticos que pueden ser usados para estudiar la relación entre una o más

respuestas y un número independiente de variables, que también permite obtener la mayor cantidad de información con pocos experimentos (Sreekumar & Krishnan 2010) y también permite ahorrar tanto tiempo como trabajo (Zhong *et al.*, 2014). Las técnicas de Superficie de Respuesta más usadas son la de Diseño Central Compuesto (DCC) y el diseño Box-Behnken (DBB), las cuales se caracterizan por tener 5 y 3 factores respectivamente (Zhong *et al.*, 2014). Finalmente cabe destacar que esta herramienta se ha venido utilizando cada vez más y su aplicación ha sido exitosa en el proceso de optimización de componentes de medios de cultivo para *Bacillus sp.*, (Mosquera *et al.*, 2014).

3. Objetivos

3.1 General

Diseñar y optimizar un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus sp.*, 12AP

3.2 Específicos

- Determinar la fuente de carbono, nitrógeno y la temperatura a la que se produce la mayor cantidad de esporas de *Bacillus sp.*, 12AP
- Determinar la concentración óptima de la fuente de carbono y de fuente de nitrógeno por medio de métodos de optimización.
- Evaluar la actividad proteolítica y amilolítica del microorganismo obtenido en el medio optimizado.

4. Metodología

4.1 Ubicación

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

4.2 Cepa microbiana

Se trabajó con el aislamiento de *Bacillus sp.*, 12AP, aislado y utilizado en estudios previos en la Pontificia Universidad Javeriana (Galindo & Londoño 2005; Serrano & Torres 2017).

4.3 Selección de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y temperatura

Se hizo un diseño factorial de 2^3 (**Tabla 1**) para seleccionar la combinación de carbono, nitrógeno y temperatura que permitiera la mayor producción de esporas. Se hicieron 12 tratamientos (**Tabla 2**) cada uno por triplicado para un total de 36 experimentos. Se buscó un aporte de carbono de 9 g/L y se usaron como fuentes de carbono glucosa grado químico (23 g/L) y azúcar morena (22 g/L). Para el nitrógeno se buscó un aporte de 1 g/L y se usaron como fuentes de nitrógeno extracto de levadura (12 g/L) y sulfato de amonio (5 g/L) (composición de los medios en anexo 1). En cuanto a la temperatura, los medios evaluados se incubaron a 37 y 55°C por 48 horas.

Tabla 1. Factores del diseño factorial.

Factor 1 (fuente de carbono)	Factor 2 (fuente de nitrógeno)	Factor 3 (temperatura)
Glucosa y Azúcar morena	Extracto de levadura y Sulfato de amonio	37°C y 55°C

Tabla2. Tratamientos del diseño factorial.

Tratamiento	Código	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Temperatura (°C)
1	G1	Glucosa	Extracto de levadura	37
2	G2	Glucosa	Sulfato de amonio	37
3	G3	Glucosa	Mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura	37
4	S1	Azúcar morena	Extracto de levadura	37
5	S2	Azúcar morena	Sulfato de amonio	37
6	S3	Azúcar morena	Mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura	37
7	G1	Glucosa	Extracto de levadura	55
8	G2	Glucosa	Sulfato de amonio	55
9	G3	Glucosa	Mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura	55
10	S1	Azúcar morena	Extracto de levadura	55
11	S2	Azúcar morena	Sulfato de amonio	55
12	S3	Azúcar morena	Mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura	55

4.4 Selección de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno

Se realizó un Diseño Central Compuesto (**Tabla 3**), donde se tomaron 9 g/L de carbono y 1 g/L de nitrógeno como los puntos centrales del diseño. Se evaluaron 9 tratamientos (**Tabla 4**) cada uno por triplicado para un total de 27 experimentos (Composición de los medios en anexo 1).

Tabla 3. Diseño central compuesto.

	-1.5	-1	0	+1	+1.5
Carbono seleccionado (g/L)	2.6	4.5	9	13.5	15.3
Nitrógeno seleccionado (g/L)	0.2	0.5	1	1.5	1.7

Tabla 4. Tratamientos del Diseño Central Compuesto.

Tratamiento	Código	Concentración fuente de carbono (g/L)	Concentración fuente de nitrógeno (g/L)
1	Medio 1	2.6	1
2	Medio 2	4.5	0.5
3	Medio 3	4.5	1.5
4	Medio 4	9	0.3
5	Medio 5	9	1
6	Medio 6	9	1.7
7	Medio 7	13.5	0.5
8	Medio 8	13.5	1.5
9	Medio 9	15.36	1

4.5 Condiciones de cultivo

Para la preparación de todos los experimentos, primero se reactivó el microorganismo *Bacillus* sp. 12 AP en medio combinado (Anexo 1) y se incubó a 55°C por 72 horas. Posteriormente se hizo una suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85% (p/v) (ajustando la concentración al tubo número 3 de MacFarland 9×10^8 cel/mL) (Serrano & Torres 2017) y de esta suspensión se añadieron 2 mL a un Erlenmeyer de 100 mL con 18 mL del medio a evaluar para llegar a 20 mL de volumen efectivo de trabajo. El medio de cultivo contenía las fuentes de carbono y nitrógeno a las concentraciones previamente mencionadas; mientras que se mantuvo como medio base las sales del medio combinado (Anexo 1) y se dejó a pH de 7.0 ± 0.2 , tiempo de incubación de 48 horas y agitación a 150 rpm.

4.6 Recuento de esporas

El recuento de esporas se hizo por la técnica de choque térmico, en el cual se busca inactivar las células vegetativas y dejar en el medio de cultivo sólo las esporas (Monteiro *et al.*, 2014; Khardziani *et al.*, 2017). Una vez pasadas las 48 horas de incubación 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 por 20 minutos y luego se enfrió en hielo por 5 minutos. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷; para luego sembrar 0.1 mL de las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁷ en agar nutritivo (Anexo 1) y se incubaron a 55 ó 37 °C (dependiendo del ensayo) por 48 horas.

4.7 Evaluación de la actividad enzimática

Con el fin de evaluar la actividad enzimática del microorganismo producido en el medio optimizado, se hizo un montaje de este medio (numeral 4.5). Pasado el tiempo de incubación, se procedió a hacer la técnica de choque térmico para obtener la suspensión de esporas (numeral 4.6) y de esta suspensión se sembraron 50 µl en agar leche y agar almidón. Como control positivo se hizo el mismo procedimiento, pero usando el medio combinado ajustando la concentración de esporas a la misma del medio optimizado y como control negativo se utilizó solución salina al 0.85% (p/v). Las cajas de agar leche y agar almidón se dejaron incubando a 55°C por 48 horas y se midieron halos de hidrólisis cada 24 horas para determinar la actividad enzimática cualitativa.

Los halos de hidrólisis se calcularon siguiendo la ecuación 1.

$$\text{Halo de hidrólisis} = \text{Diámetro total} - \text{Diámetro de la colonia} \quad (1)$$

4.8 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Desing Expert Versión 10 para hacer el diseño experimental, la regresión y el análisis gráfico de los resultados obtenidos. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y los datos de los recuentos fueron transformados usando escala logarítmica (Log₁₀).

5. Resultados y discusión

5.1 Selección de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y temperatura

Los resultados del diseño factorial arrojaron que la fuente de carbono azúcar morena (sacarosa) y la fuente de nitrógeno, extracto de levadura y sulfato de amonio, son las que permitieron un

mayor recuento de esporas (**Figura 1**). El modelo factorial fue estadísticamente significativo (p-valor 0.0001) con R^2 de 0.9971 y mostró que la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y la interacción entre los dos son significativos para la producción de esporas de *Bacillus* sp. 12 AP (**Tabla 5**).

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) del recuento de esporas del diseño factorial.

Fuente	Log (esporas/mL)	
	Valor F	Valor P
A-Fuente de carbono	3680.04	<0.0001*
B-Fuente de nitrógeno	144.66	<0.0001*
AB	77.32	<0.0001*
Modelo	824.80 *	<0.0001*
R²	0.9971	
R² Ajustado	0.9959	

*Valores significativos

Los resultados de la **Figura 1** muestran que los tratamientos (**Tabla 2**) 5 (azúcar morena 22 g/L, sulfato de amonio 5 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.) y 6 (azúcar morena 22 g/L, extracto de levadura 5 g/L, sulfato de amonio 2.4 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) son los que permiten obtener el mayor número de esporas con un recuento de 3.1×10^7 y 3.5×10^7 *Esporas/mL* respectivamente.

Se sabe que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno son necesarias para el crecimiento y formación de productos en el cultivo microbiano. La naturaleza y características de estos sustratos tienen un papel predominante en el metabolismo microbiano e influyen particularmente en la diferenciación de las células en proceso de esporulación (Anderson & Jayaraman 2003). De acuerdo con esto, lo encontrado en el diseño factorial (**Figura 1**) muestra que la fuente de carbono idónea para producir esporas es azúcar morena. Al comparar estos resultados con otros estudios se observa que por ejemplo Khardziani *et al.*, (2017) encontraron que las mejores fuentes de carbono para producir esporas en *Bacillus subtilis* subsp.

KATMIRA1933 son: la glucosa, sacarosa y xilosa respectivamente. En otro estudio se encontró que sustratos complejos como almidón o salvado de trigo aumentan la producción de esporas (27×10^8 *Esporas/mL*) al compararlas con fuentes de carbono simples como la glucosa (8.5×10^8 *Esporas/mL*) (Chen *et al.*, 2010). Mazmira *et al.*, (2012) encontraron que la glucosa y la sacarosa son las fuentes de carbono que mayor cantidad de esporas producen, con 9.8×10^{11} y 7.1×10^{11} *Esporas/mL* respectivamente.

La fuente de nitrógeno varía en diferentes estudios, por ejemplo Monteiro *et al.*, (2014) encontraron que el sulfato de amonio permite producir aproximadamente 2.2×10^9 *Esporas/mL* de *Bacillus subtilis*. De igual manera Liu & Tzeng (1998) encontraron que el sulfato de amonio (0.6 g/L) permitió un recuento de 8.6×10^8 *Esporas/mL*. Por otra parte Khardziani *et al.*, (2017) encontraron que fuentes de nitrógeno orgánicas como la peptona o el extracto de levadura permitieron producir 66×10^9 y 31×10^9 *Esporas/mL* respectivamente y las fuentes inorgánicas como sulfato de amonio 6×10^9 *Esporas/mL*, mientras que Rao *et al.*, (2007) encontraron que el sulfato de amonio y la peptona permitieron un recuento de 5.9×10^8 *Esporas/mL*. Estos resultados muestran que para producir la mayor cantidad posible de esporas de *Bacillus*, no existen unas únicas fuentes de carbono ni nitrógeno y las mismas pueden variar dependiendo de la especie del microorganismo.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Log10 esporas/mL
 ● Design Points

X1 = A: Fuente C
 X2 = B: Fuente de N

■ B1 Extracto
 ▲ B2 Sulfato
 ◆ B3 Mezcla

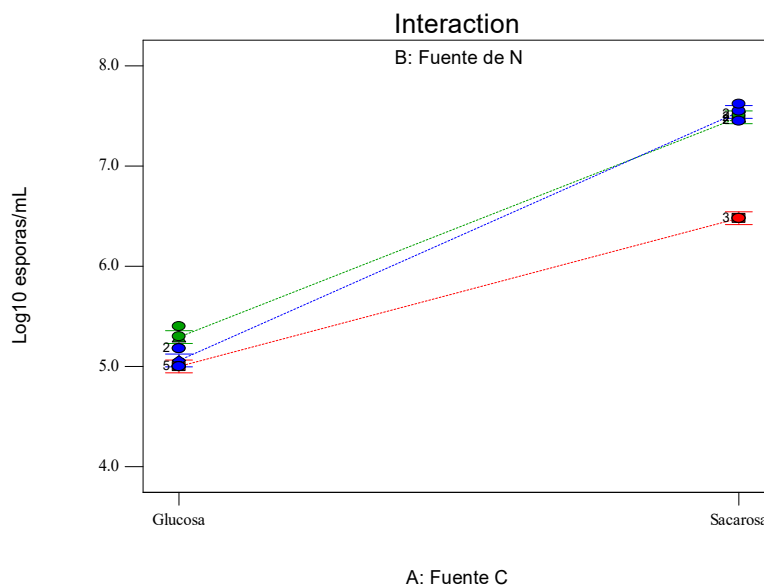


Figura 1. Gráfico de Interacción de los factores fuente de carbono (A), fuente de nitrógeno (B). Como fuentes de carbono se usaron glucosa y sacarosa, mientras que se usaron extracto de levadura (B1), sulfato de amonio (B2) y una mezcla extracto de levadura/sulfato de amonio (B3) como fuentes de nitrógeno.

La preferencia de sacarosa sobre glucosa por parte de *Bacillus* sp. 12AP, podría deberse a que el azúcar morena tiene un alto contenido de minerales como calcio, hierro y fósforo (Muis, 2006). Cabe resaltar que en el empaque del azúcar utilizado para estos experimentos se menciona que el 98% del producto es sacarosa, por lo cual se podría pensar que el 2% restante, es en parte, esos minerales que ayudan al crecimiento del microorganismo. De la misma manera, el que *Bacillus* sp. 12AP sea capaz de crecer con sacarosa como sustrato, indica que este microorganismo puede ser productor de alguna enzima capaz de degradar disacáridos (sacarosa) a monosacáridos (Mazmira *et al.*, 2012).

La sacarosa es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa (Reid & Abratt 2005). El catabolismo de la sacarosa en bacterias lleva a la producción de fructosa, glucosa-6-fosfato o glucosa-1-fosfato que pueden entrar a diferentes rutas metabólicas como lo es la glucólisis o la vía de las pentosas fosfato para la obtención de ATP (Reid & Abratt 2005; Tännler *et al.*, 2008). La obtención de ATP puede darse gracias a la respiración aerobia; proceso en el cual se oxida un compuesto utilizando oxígeno como aceptor final de electrones y en el que participan 3 rutas metabólicas principales: glucólisis, oxidación del piruvato y ciclo del ácido cítrico (Madigan *et al.*, 2009). La oxidación de una molécula de glucosa puede llevar a la producción de 32/38 moléculas de ATP (Pfeiffer *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2009), mientras que la sacarosa, por su hidrólisis en fructosa, glucosa-6-fosfato o glucosa-1-fosfato, puede llevar a la obtención del doble de ATP (Reid & Abratt 2005). La esporulación es un proceso que requiere un gran consumo de energía (Mazmira *et al.*, 2012), por lo que *Bacillus* sp. 12 AP puede estar obteniendo mayor cantidad de energía de la sacarosa (64/76 moléculas de ATP) que puede ser utilizada en el proceso de esporulación, mientras que la energía obtenida de la glucosa (32/38 moléculas de ATP) puede no ser suficiente para invertir en este proceso y por ello se obtiene un recuento más bajo de esporas (**Figura 1**).

Por otra parte, en los resultados de la **Figura 1** se puede ver que tanto el sulfato de amonio como la mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura permitieron el mayor recuento de esporas. De acuerdo con estudios previos el sulfato de amonio (fuente inorgánica de nitrógeno) aporta principalmente amonio, el cual permite un mayor crecimiento celular (Fisher 1999) y se ha reportado que los microorganismos del género *Bacillus* prefieren las fuentes inorgánicas de nitrógeno durante el crecimiento vegetativo (Liu & Tzeng 1998). Por otra parte, las fuentes orgánicas como el extracto de levadura tienen un alto contenido de aminoácidos, factores de crecimiento como coenzimas o vitamina B; es también un excelente estimulador del crecimiento bacteriano y además, puede contener carbohidratos que permiten el crecimiento del microorganismo (Muis 2006; Mazmira *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2016), por lo que tanto el sulfato de amonio, como el extracto de levadura podrían ayudar a la producción de biomasa suficiente por parte de *Bacillus* sp. 12 AP para activar el sistema de "Quorum Sensing"; lo que también

permite iniciar el proceso de esporulación y es indicativo de por qué la mezcla de estas dos fuentes de nitrógeno permiten un recuento de 3.5×10^7 *Esporas/mL* (**Figura 1**).

Se seleccionó la sacarosa y la mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura para hacer el proceso de optimización, ya que la sacarosa es la fuente de carbono que permitió una mayor producción de esporas de *Bacillus* sp 12. AP (**Figura 1**). A su vez, cabe resaltar que este microorganismo es de lento y difícil crecimiento (Galindo & Londoño 2005); por ello, la mezcla sulfato de amonio/extracto de levadura, como fuente de nitrógeno, puede estar aportando mayor cantidad de nutrientes para el crecimiento del microorganismo y por ello un mayor recuento de esporas (**Figura 1**).

Se seleccionó la temperatura de 55°C ya que el recuento del medio S3 fue de 3.5×10^7 *Esporas/mL*, mientras que a 37°C fue $< 1 \times 10^6$ *Esporas/mL* N.E (número estimado). El microorganismo *Bacillus* sp. 12 AP es termófilo y este ensayo se hizo para ver si era posible hacer la optimización a baja temperatura por el consumo energético que se requiere para mantener 55°C. De igual manera, el bajo recuento a 37°C pudo ocurrir debido a que no se produjo la biomasa suficiente para activar el sistema de “*Quorum Sensing*” que permite la esporulación en el género *Bacillus* (Tzeng *et al.*, 2008; Posada-Uribe *et al.*, 2015).

5.2 Selección de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno

Se evaluó el aumento y la disminución en la concentración de fuente de carbono (usando como punto central 9 g/L) y de fuente de nitrógeno (usando como punto central 1 g/L), (**Tabla 6**). El modelo (**Figura 2**, **Figura 3**) muestra que a medida que se disminuye la concentración de la fuente de carbono y se aumenta la de nitrógeno, el recuento de esporas aumenta. El modelo es significativo (p-valor < 0.0001) con R^2 de 0.8364 y mostró que tanto la concentración de la fuente de carbono (p-valor 0.0106) como la de nitrógeno (p-valor < 0.0001) afectan significativamente la producción de esporas (**Tabla 6**).

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) del recuento de esporas para el Diseño Central Compuesto.

Fuente	Log (esporas/mL)	
	Valor F	Valor P
A-Fuente de carbono	7.87	0.0106*
B-Fuente de nitrógeno	42.72	$< 0.0001^*$

AB	10.20	0.0044*
Modelo	21.48	<0,0001*
R²	0.8364	
R² Ajustado	0.7975	

*Valores significativos

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Log10 esporas/mL

● Design points above predicted v.

● Design points below predicted v.

8.37



X1 = A: Carbono

X2 = B: Nitrógeno

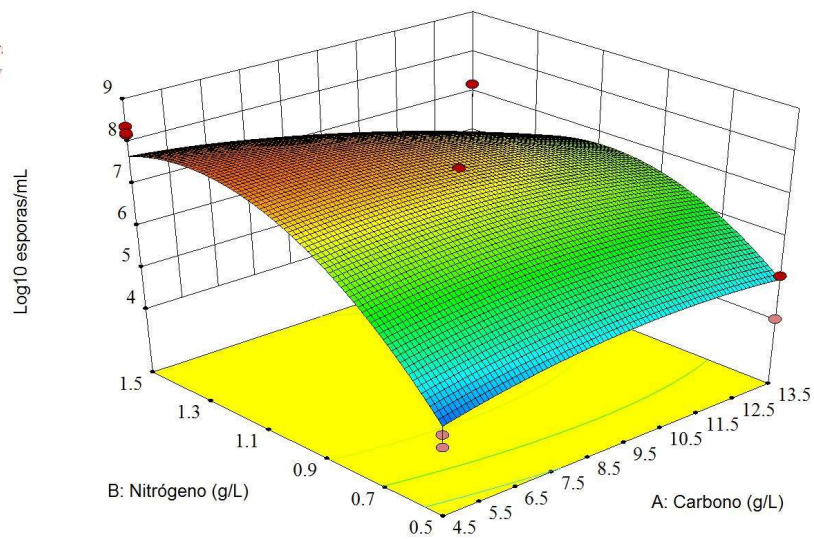


Figura 2. Gráfico de superficie respuesta obtenido para el recuento de esporas de *Bacillus* sp. 12AP en función de la concentración de fuente de carbono (g/L) y la concentración de fuente de nitrógeno (g/L). El gráfico se obtuvo a partir del diseño central compuesto.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Log10 esporas/mL
 ● Design Points
 8.37
 4
 X1 = A: Carbono
 X2 = B: Nitrógeno

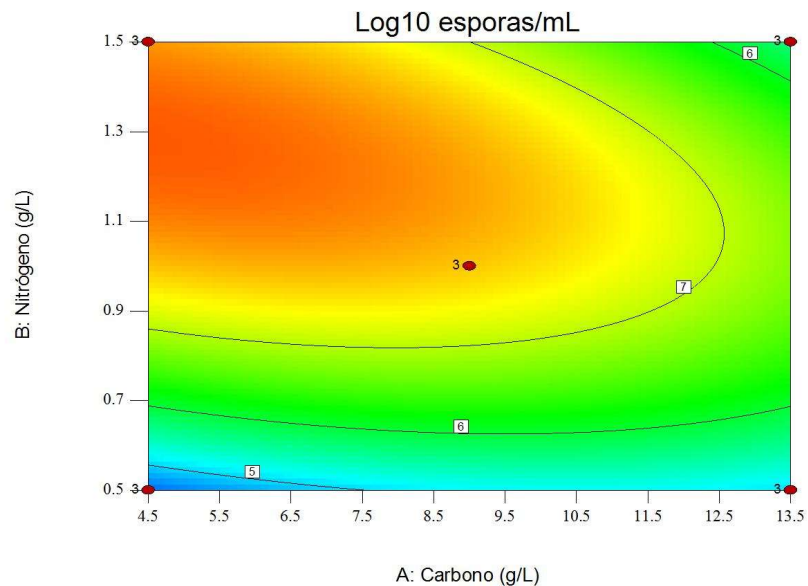


Figura 3. Gráfico de contornos en el cual se ve el \log_{10} del recuento de esporas de *Bacillus* sp. 12 AP en respuesta a variar las concentraciones de fuente de carbono y de nitrógeno. Igualmente se ve el efecto que tiene la interacción entre fuente de carbono y fuente de nitrógeno con el recuento de esporas.

Los resultados de la **Figura 2 y 3** muestran que el carbono 4.5 g/L y nitrógeno 1.5 g/L son los que generan la mayor respuesta. Esto se refleja en el tratamiento/medio 3 (**Tabla 4**) (azúcar morena 11 g/L, extracto de levadura 7.5 g/L, sulfato de amonio 3.5 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*.

Se sabe que la concentración de carbono juega un papel fundamental en el proceso de esporulación (Khardziani *et al.*, 2017). En el estudio de Khardziani *et al.*, (2017) se encontró que la menor cantidad de fuente de carbono (glucosa 2 g/L) permitió un recuento de 2.3×10^9 *Esporas/mL* en *Bacillus subtilis* subsp. KATMIRA1933. También se encontró que en *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 se obtuvo un recuento de 7.1×10^9 *Esporas/mL* en medios con 4 g/L de glucosa y que un aumento de más de 5 g/L de glucosa en los medios de estos microorganismos conducía a una inhibición de la esporulación. Por otra parte Monteiro *et al.*, (2014) encontró que para *Bacillus subtilis* la glucosa ejercía un efecto inhibitorio en la producción de esporas si su concentración superaba los 20 g/L. De igual manera Mazmira *et al.*, (2012) encontraron que una concentración de 8 g/L de glucosa permitía un recuento de 9.8×10^{11} *esporas/mL* y que un exceso de esta puede llevar a una inhibición de la esporulación.

Respecto a la concentración de nitrógeno Khardziani *et al.*, (2017) encontraron que un aumento gradual de fuentes orgánicas como peptona o extracto de levadura llevaban a un aumento de

20×10^9 a 83×10^9 *Esporas/mL*, aunque un mayor aumento en la concentración de nitrógeno retrasaba el crecimiento del microorganismo y con ello el proceso de esporulación. Monteiro *et al.*, (2014) encontraron que al aumentar la concentración de sulfato de amonio de 0.2 a 0.4 g/L el recuento aumentaba de 0.5×10^9 a 0.7×10^9 *Esporas/mL*, pero si aumentaba más de 0.4 g/L el recuento empezaba a disminuir nuevamente.

Al comparar los resultados de este estudio con lo reportado en la literatura, se puede ver que la producción de esporas depende de la concentración de la fuente de carbono en el medio para garantizar la máxima concentración de células vegetativas y de esporas (Monteiro *et al.*, 2014; Khardziani *et al.*, 2017). Tzeng *et al.*, (2008) menciona que es necesaria una importante acumulación de biomasa para un óptimo rendimiento de esporas, ya que esta producción suele depender de nutrientes acumulados endógenamente por parte del microorganismo durante el crecimiento vegetativo. Por otro lado, el exceso de fuente de carbono puede llegar a reprimir la expresión del gen *spo0A*, gen que desencadena la producción de esporas (Mazmira *et al.*, 2012). La expresión reducida de *spo0A* en presencia de un exceso de fuente de carbono en la etapa temprana de la esporulación podría llevar a una represión de la esporulación (Mazmira *et al.*, 2012). Dicha represión genética podría explicar porque el aumento de la concentración de fuente de carbono a más de 4.5 g/L, lleva a una disminución en el recuento de esporas de *Bacillus* sp. 12 AP (**Figura 2**).

En cuanto a la fuente de nitrógeno, se sabe que un aumento o disminución excesiva lleva a un retraso en el crecimiento microbiano y a la esporulación (Monteiro *et al.*, 2014; Khardziani *et al.*, 2017). Sin embargo, el aumento de la concentración de nitrógeno es clave en el proceso de esporulación, ya que las proteínas son importantes para este proceso (proteger el DNA, o formar la multicapa de proteínas que recubren la corteza de la espora) además, de jugar un papel en el proceso de crecimiento vegetativo (Laloo *et al.*, 2009). Esto podría explicar por qué es necesario aumentar la concentración de fuente de nitrógeno hasta 1.5 g/L (**Figura 2**), ya que una disminución excesiva de ella podría llevar a que no se produzcan las suficientes proteínas requeridas para el proceso de esporulación.

Para validar el modelo se procedió a hacer un medio con las concentraciones de 4.5 g/L de carbono y 1.27 g/L de nitrógeno. Con estas concentraciones se obtuvo un medio compuesto de: 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). El modelo predijo que al usar estas concentraciones se podría obtener un recuento preciso de 1×10^8 *Esporas/mL*. El resultado arrojó, precisamente, un recuento de 1×10^8 *Esporas/mL* demostrando la validez del modelo (**Tabla 7**).

Tabla 7. Punto óptimo fuente de carbono y nitrógeno.

Fuente de carbono (g/L)	Fuente de nitrógeno (g/L)	Valor predictivo de recuento de esporas (\log_{10} esporas/mL)	Valor obtenido de recuento de esporas (\log_{10} esporas/mL)
4.5	1.27	7.995	7.981 \pm 0.18

5.3 Evaluación de la actividad enzimática

La actividad enzimática del microorganismo se evaluó a partir del medio combinado y del medio optimizado para la producción de esporas. La producción de estas enzimas esta inducida por la caseína presente en la leche, la cual es fuente de proteína y por el almidón presente en la fécula de maíz (Serrano & Torres 2017). En la actividad enzimática proteolítica, la hidrólisis libera péptidos y aminoácidos que se evidencian por la generación de zonas de aclaramiento o halos de hidrólisis (Ozturkoglu-Budak *et al.*, 2016) , mientras que en la actividad amilolítica se evidencian estos halos por la hidrólisis del almidón al adicionar lugol, un colorante compuesto por yodo que tiene la capacidad de interactuar con la estructura helicoidal del polisacárido amilosa; generando un color negro-azulado. Al hidrolizarse el almidón no existe interacción entre el colorante y el polisacárido, por lo que se evidencian las zonas de aclaramiento (Novo *et al.*, 2016).

El resultado de la actividad enzimática se evidencio como halos de hidrólisis para las enzimas proteolíticas y amilolíticas producidas a partir de esporas. En el caso de las enzimas proteolíticas, a partir del medio combinado se obtuvieron halos de $10\text{mm} \pm 3.61$ y para el medio optimizado se obtuvieron halos de $10\text{mm} \pm 7.81$. Respecto a las enzimas amilolíticas se obtuvieron halos de $2.3\text{mm} \pm 0.58$ a partir del medio combinado y halos de $2.3\text{mm} \pm 1.15$ a partir del medio optimizado.

Estos resultados son similares a evaluaciones enzimáticas hechas previamente a este microorganismo. Serrano & Torres (2017) hizo una evaluación cualitativa de enzimas proteolíticas y amilolíticas en agar leche y en agar almidón de *Bacillus* sp. 12 AP, en donde encontraron halos de hidrólisis de 9.7 mm para enzimas proteolíticas y de 2 mm para enzimas amilolíticas.

De acuerdo con esto y con los resultados obtenidos en este estudio, se puede ver que la actividad enzimática del microorganismo no es afectada por el medio en el cual se producen las esporas. Esto puede deberse a la composición del núcleo de la spora, el cual está relativamente deshidratado (lo cual ha mostrado ser un parámetro clave en el desarrollo de resistencia de las esporas) y es donde se contiene el DNA, RNA, ribosomas y enzimas; estas condiciones dentro del

núcleo están altamente relacionadas con las propiedades de resistencia y muchas de las cuales protegen el DNA de un posible daño (Luu 2010; Sella *et al.*, 2014). Como dicho núcleo contiene el DNA se podría creer que el proceso de esporulación no va a afectar la actividad enzimática del microorganismo, ya que la espora lo que hace es proteger el DNA.

6. Conclusiones

Se logró diseñar y optimizar un medio de cultivo para la producción de esporas de *Bacillus* sp. 12 AP. Un medio compuesto por azúcar morena (11 g/L), sulfato de amonio (3 g/L) y extracto de levadura (6.4 g/L). El azúcar morena demostró ser un sustrato mucho más eficiente que la glucosa (teniendo en cuenta que esta era grado químico) para la producción de esporas; en parte por su contenido extra de vitaminas, minerales y la obtención de energía extra en forma de ATP, mientras que la mezcla de fuentes de nitrógeno aporta diversos nutrientes que igualmente pueden favorecer el crecimiento de este microorganismo exigente nutricionalmente.

Fue necesario disminuir la concentración de la fuente de carbono lo suficiente como para permitir el crecimiento y evitar una represión en la esporulación, mientras que es necesario aumentar la concentración de la fuente de nitrógeno lo suficiente para no retrasar el crecimiento del microorganismo.

La actividad enzimática, tanto proteolítica como amilolítica, del microorganismo *Bacillus* sp. 12 AP no es afectada al hacer la producción de esporas en un medio sin una fuente de almidón como la maicena o una fuente de proteína como la caseína de la leche (se obtuvieron halos de hidrólisis iguales en los dos medios evaluados), ya que la función de la espora es proteger el material genético, lugar donde se encuentra la información para sintetizar dichas enzimas.

7. Recomendaciones

Aunque el Diseño Central Compuesto arrojó un resultado óptimo para la producción de esporas, es recomendable hacer un diseño evaluando concentraciones inferiores a 4.5 g/L de fuente de carbono y concentraciones superiores a 1.5 g/L para la fuente de nitrógeno.

Es recomendable hacer una evaluación de azúcar morena con una glucosa grado alimentario para observar si con un reactivo de menor grado de pureza, existe una diferencia en la producción de esporas.

Es recomendable hacer una cinética de crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo que se encontró como óptimo para observar la cinética, de la biomasa, las esporas y el sustrato.

Se recomienda hacer una evaluación cuantitativa de la actividad proteolítica y amilolítica en el medio combinado y en el medio de producción de esporas para evidenciar con un valor preciso si existe alguna diferencia en la actividad enzimática.

8. Referencias

Anderson RKI, Jayaraman K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for biopesticide production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 17:225–231, 2003.

Bogota J, Diaz S, Ramos P. Montaje y puesta en marcha de dos biodigestores anaerobios con residuos orgánicos generados en la central de mercado “Plaza Kennedy” en Bogotá. *Universidad Manuela Beltrán, Facultad de ingeniería ambiental*. 1-121, 2008.

Božić N, Slavić MŠ, Gavrilović A, Vujčić Z. Production of raw-starch-digesting α -amylase isoform from *Bacillus* sp. under solid-state fermentation and biochemical characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 37:1353–1360, 2014.

doi:10.1007/s00449-013-1105-1

Checinska A, Paszczynski A, Burbank M. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. *Annual review of food science and technology*. 6:351–369, 2015.

doi:10.1146/annurev-food-030713-092332

Chen ZM, Li Q, Liu HM et al. 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, 2010.

doi:10.1007/s00253-009-2162-x

Fisher SH. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Molecular Microbiology*. 32:223–232, 1999.

doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01333.x

Galindo L, Londoño N. Aislamiento de bacterias termófilas y hongos mesófilos a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. *Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias*. 1-103, 2005.

Gill SS, Jana AME, Shrivastav A. Aerobic Bacterial Degradation of Kitchen Waste: A Review. *Journal of Biotechnology and Food Sciency*. 6:477–483, 2014.

Godinho I, Pires C, Pedro S et al. Antioxidant Properties of Fish Protein Hydrolysates Prepared from Cod Protein Hydrolysate by *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 178:1095–1112, 2016.

doi:10.1007/s12010-015-1931-5

Herrmann L, Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:8859–8873, 2013.

doi:10.1007/s00253-013-5228-8

Hermida Castillo H. Plazas de mercado en Bogotá, generadoras de residuos y desarrollo. *Conferencia presentada en Bogotá D.C*, 2014.

Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36:131–148, 2012.

doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x

Karnchanawong S, Nissakla S. Effects of microbial inoculation on composting of household organic waste using passive aeration bin. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 3:113–119, 2014.

doi:10.1007/s40093-014-0072-0

Khardziani T, Kachlishvili E, Sokhadze K et al. Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for Spore Production in Submerged Fermentation of Plant Raw Materials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 4:435-443, 2017.

doi:10.1007/s12602-017-9303-9

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

doi:10.1007/s00253-008-1845-z

Liu B-L, Tzeng Y-M. Optimization of growth medium for the production of spores from. *Bioprocess Engineering*. 18:413, 1998.

doi:10.1007/s004490050464

Luo M miao, Ren L jing, Chen S lan, Ji X jun, Huang H. Effect of media components and morphology of *Bacillus natto* on menaquinone-7 synthesis in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 21:777–786, 2016.

doi:10.1007/s12257-016-0202-9

Luu H. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* germination kinetics: A Michaelis-Menten approach. *University of Nevada. Department of chemistry*. 1-72, 2010.

Malarkodi, Rajeshkumar S, Paulkumar K, Gnanajobitha G, Vanaja M, Annadurai G. Bacterial synthesis of silver nanoparticles by using optimized biomass growth of *Bacillus* sp. *Nanoscience and Nanotechnology: An International Journal*. 3:26–32, 2013.

Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock biology of microorganisms, 12th edition, Pearson education, 2009.

Mazmira MM, Ramlah SAA, Rosfarizan M, Ling TC, Ariff AB. Effect of saccharides on growth, sporulation rate and delta-endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*. 11:9654–9663, 2012.

doi:10.5897/AJB11.1391

Monteiro SMS, Clemente JJ, Carrondo MJT, Cunha AE. Enhanced Spore Production of *Bacillus subtilis* Grown in a Chemically Defined Medium. *Advances in Microbiology*. 4:444–454, 2014.

doi:10.4236/aim.2014.48049

Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*. 21:1026–1031, 2005.

doi:10.1021/bp050062z

Mosquera S, González-Jaramillo LM, Orduz S, Villegas-Escobar V. Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3:378–385, 2014.

doi:10.1016/j.bcab.2014.09.004

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

doi:10.21082/ijas.v7n2.2006.p51-56

Ngampimol H, Kunathigan V. The Study of Shelf Life for Liquid Biofertilizer from Vegetable Waste. *Assumption University Journal of Technology*. 11:204–208, 2008.

Novo MT, Casanoves M, Garcia-Vallvé S, Pujadas G, Mulero M, Valls C. How do Detergents Work? A Qualitative Assay to Measure Amylase Activity. *Journal of Biological Education*. 50:251–260, 2016.

doi:10.1080/00219266.2015.1058843

Ozturkoglu-Budak S, Wiebenga A, Bron PA, de Vries RP. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 237:17–27, 2016.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007

Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*. 292:504–507, 2001.

doi:10.1126/science.1058079

Poopathi S, Archana B. A novel cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis for mosquito control. *Tropical Biomedicine*. 29:81–91, 2012.

Posada-Uribe LF, Romero-Tabarez M, Villegas-Escobar V. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and biosystems engineering*. 38:1879–1888, 2015.

doi:10.1007/s00449-015-1428-1

Rao YK, Tsay KJ, Wu WS, Tzeng YM. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*. 42:535–541, 2007.

doi:10.1016/j.procbio.2006.10.007

Reid SJ, Abratt VR. Sucrose utilisation in bacteria: Genetic organisation and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:312–321, 2005.

doi:10.1007/s00253-004-1885-y

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

doi:10.1139/w03-076

Sella SRBR, Gouvea PM, Gomes VF, Vandenberghe LPS, Minozzo JC, Soccol CR. Glycerol-based sterilization bioindicator system from *Bacillus atrophaeus*: Development, performance evaluation, and cost analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:1031–1042, 2013.

doi:10.1007/s00253-012-4350-3

Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*. 169:931–939, 2014.

doi:10.1016/j.micres.2014.05.001

Serrano A, Torres J. Evaluación del efecto de un bioinoculante, en el proceso de compostaje de mortalidades porcícolas. *Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias*. 1-87, 2017.

Setlow P. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *Journal of Bacteriology*. 196:1297–1305, 2014.

doi:10.1128/JB.01455-13

Shi F, Zhu Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. *BioControl*. 52:845–853, 2007.

doi:10.1007/s10526-006-9055-z

Sreekumar G, Krishnan S. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*. 9:8078–8084, 2010.

doi:10.5897/AJB10.1283

Srivastava V, De Araujo ASF, Vaish B, Bartelt-Hunt S, Singh P, Singh RP. Biological response of using municipal solid waste compost in agriculture as fertilizer supplement. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 15:677–696, 2016.

doi:10.1007/s11157-016-9407-9

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

Tännler S, Decasper S, Sauer U. Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. *Microbial Cell Factories*. 7:1–13, 2008.

doi:10.1186/1475-2859-7-19

Tavares MB, Souza RD, Luiz WB et al. *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: Optimization of growth conditions and purification method. *Current Microbiology*. 66:279–285, 2013.

doi:10.1007/s00284-012-0269-2

Tzeng YM, Rao YK, Tsay KJ, Wu WS. Effect of cultivation conditions on spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 and its antagonism to *Botrytis elliptica*. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1275–1282, 2008.
doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03683.x

Wang S, Jeyaseelan J, Liu Y, Qin W. Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of *Bacillus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 180:136–151, 2016.
doi:10.1007/s12010-016-2089-5

Zhang YR, Xiong HR, Guo XH. 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.
doi:10.1007/s12223-013-0264-4

Zhong J, Zhang X, Ren Y, Yang J, Tan H, Zhou J. Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jjean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. *Electronic Journal of Biotechnology*. 17:132-136, 2014.
doi:10.1016/j.ejbt.2014.04.010

Anexos

Anexo 1. Composición de Medios de cultivo

Medio combinado

Maicena 1.2 % (p/v)

Leche 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.

Agar nutritivo

Extracto de levadura 2 g/L.

Peptona 5 g/L.

Cloruro de sodio 5 g/L.

Agar 15 g/L.

Medios del diseño factorial

Los medios están hechos en base a los factores glucosa y sacarosa (con una concentración de 9 g/L de carbono) y los factores sulfato de amonio y extracto de levadura (con una concentración e 1 g/L de nitrógeno), a su vez el cloruro de calcio, fosfato monobásico de sodio y fosfato dibásico de sodio provienen de los componentes del medio combinado. Estos medios son cada tratamiento que se evaluó para determinar la fuente de carbono y nitrógeno ideal para producir esporas de *Bacillus* sp. 12 AP.

Glucosa 1

Glucosa 23 g/L.

Extracto de levadura 10 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.

Sulfato de amonio 2.4 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.

Glucosa 2

Glucosa 23 g/L.

Sulfato de amonio 5 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.

Sacarosa 1

Azúcar morena 22 g/L.

Extracto de levadura 10 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.

Glucosa 3

Glucosa 23 g/L.

Extracto de levadura 5 g/L.

Sacarosa 2

Azúcar morena 22 g/L.

Sulfato de amonio 5 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.

Sacarosa 3

Azúcar morena 22 g/L.

Extracto de levadura 5 g/L.

Sulfato de amonio 2.4 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.

Medios del diseño central compuesto

Los medios están hechos en base a los factores, concentración de carbono (9 g/L) y concentración de nitrógeno (1 g/L) aumentando y disminuyendo la concentración de estos. Los 9 medios son un tratamiento diferente (con diferente concentración de carbono y nitrógeno) para optimizar la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno seleccionada.

Medio 1

Azúcar morena 6.4 g/L.

Extracto de levadura 5 g/L.

Sulfato de amonio 2.4 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.

Extracto de levadura 1.5 g/L.

Sulfato de amonio 0.68 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.

Medio 2

Azúcar morena 11 g/L.

Extracto de levadura 2.5 g/L.

Sulfato de amonio 1.2 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.

Medio 5

Azúcar morena 22 g/L.

Extracto de levadura 5 g/L.

Sulfato de amonio 2.4 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.

Medio 3

Azúcar morena 11 g/L.

Extracto de levadura 7.5 g/L.

Sulfato de amonio 3.5 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.

Medio 6

Azúcar morena 22 g/L.

Extracto de levadura 8.5 g/L.

Sulfato de amonio 4 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.

Medio 4

Azúcar morena 22 g/L.

Medio 7

Azúcar morena 32.72 g/L.

Extracto de levadura 2.5 g/L.

Sulfato de amonio 1.2 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.

Medio 8

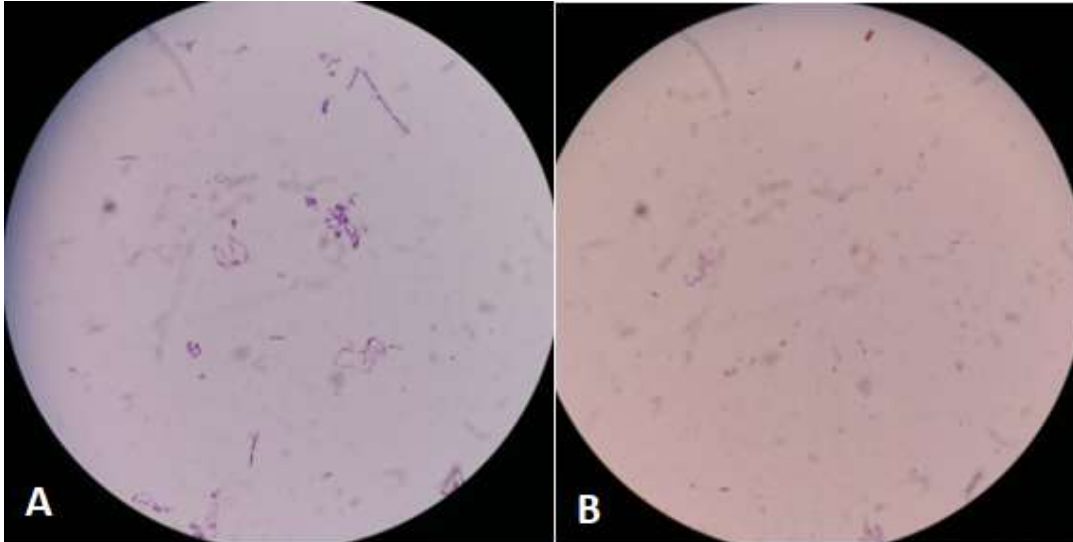
Azúcar morena 32.72 g/L.
Extracto de levadura 7.5 g/L.
Sulfato de amonio 3.5 g/L.
Cloruro de calcio 0.5 g/L.
Fosfato monobásico de sodio 0.5 g/L.

Fosfato dibásico de sodio 0.5 g/L.

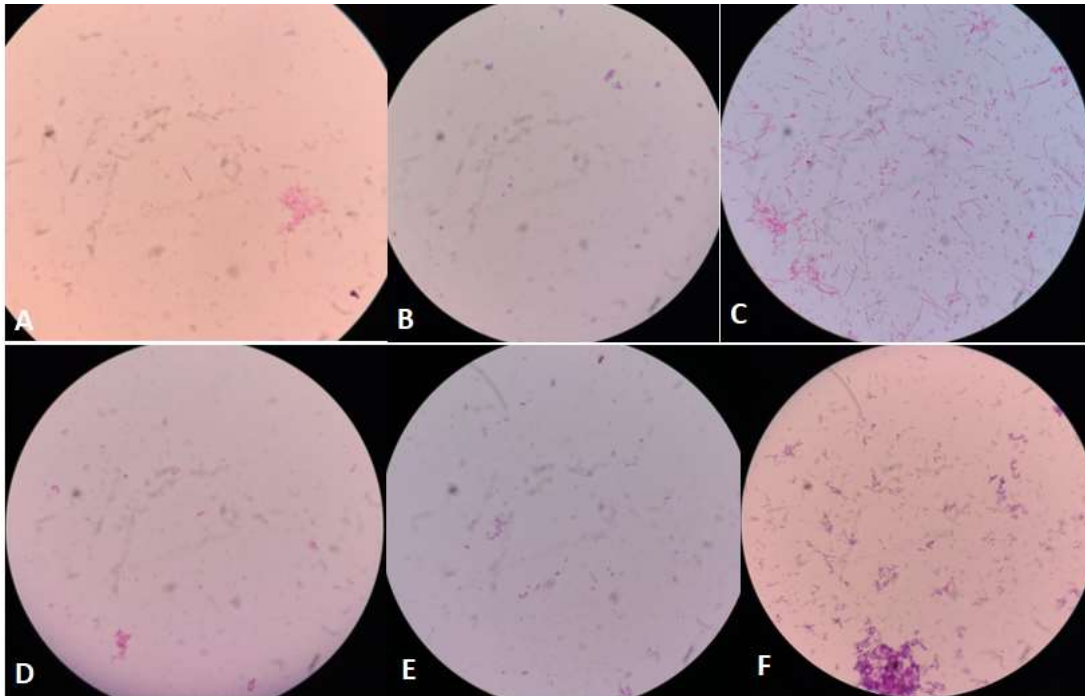
Medio 9

Azúcar morena 37.22 g/L.
Extracto de levadura 5 g/L.
Sulfato de amonio 2.4 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.

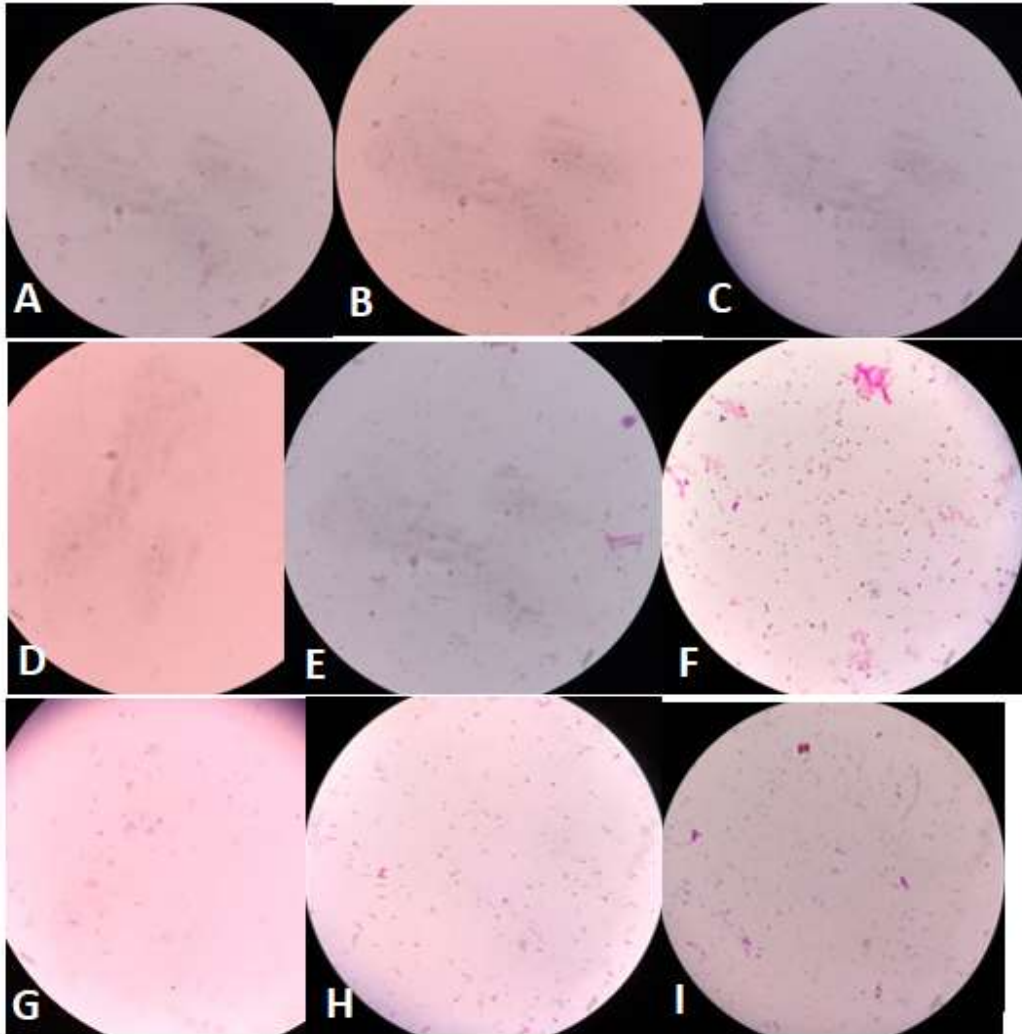
Anexo 2. Coloración de Gram



Coloración de Gram de los medios Sacarosa 2 (A) Y Sacarosa 3 (B) a las 48 horas con incubación a 37°C.



Coloración de Gram de los medios Glucosa 1 (A), 2(B), 3(C), Sacarosa 1(D), 2(E), 3(F) a las 48 horas con incubación a 55°C.



Coloración de Gram de los medios 1 (A), 2(B), 3(C), 4(D), 5(E), 6(F), 7(G), 8(H), 9(I) a las 48 horas de cultivo. Estos medios contenían como fuente de carbono azúcar morena y como fuentes de nitrógeno extracto de levadura y sulfato de amonio a diferentes concentraciones del diseño central compuesto.