



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**UTILIZACIÓN DE UN MEDIO ENRIQUECIDO CON
MELAZAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE
BACILLUS LICHENIFORMIS CON POTENCIAL
BIOFERTILIZANTE**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

PRESENTA:

I.A. LUIS ERICK MOTA PACHECO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, MÉXICO, FEBRERO DE 2013

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos y el Laboratorio de Alimentos y Productos Naturales, así como en el Vivero de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Parte del trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y el Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis papás, José Luis y Noemí, por creer en mi, y por apoyarme en cada uno de los retos que me planteo, por amarme, cuidarme y consentirme tanto, más allá de lo que creo merecer. ¡¡LOS AMO!! A mi hermana Alma Edden, por ser... ¡Mi hermana! ¡¡Te Amo Changuito!!

¡¡Que suerte que hoy la alegría tiene tu nombre y tiene tu piel!! A ti Pame... ¡TE AMO!

A toda mi familia: A los que aún puedo abrazar y agradecerles por haberme dejado nacer y crecer en una familia de gran corazón; y a todos aquellos que ahora nos rodean con su energía todos los días, que nunca nos han dejado, que laten en cada minuto de nuestra vida...

A mis hermanos Ray, Carlos, Alejandro (Calamarino), Eder y Silvino... ¡Y a Kikis! ¡Por ser ustedes mi reflejo! ¡Por sincronizar nuestros corazones! ¡Los quiero mucho mucho! ¡Pero mucho güe!

A Karlita, Pancho, Claudia (Cui cui), Nancy, Magda y Anita... ¡Nos divertimos mucho juntos, sufrimos juntos y aprendimos juntos, siempre vivirán en mi! ¡Los quiero! También a mis queridos amigos Moni, Tenoch, Armando, Aideé, Evelyn, Luis, Luz, Eri, Ita, etc... Y a mis amigos de Anima Yeé...

\o/ "We must be over the Rainbow!" \m/

A la música, mi disolvente universal; a mi guitarra, mi refugio, mi paz, mi nave de madera y nylon... A ti, por siempre estar ahí, cantándome.... ¡Eternamente!

A mis mascotas, Jerry y Bicho y Slinky...

¡¡Lo más hermoso es el misterio de amarlo todo, amar en serio; no hay más remedio ni Bandera que amar en todo, amar de veras!! – Gerardo Pablo.

Agradezco a mis Padres y a mi hermana por su incondicional amor y apoyo, por confiar siempre en mi y por permitirme llegar hasta este punto... También a Pame por todo su apoyo y amor (¡No estaría aquí si no fuera por ti wera!)..

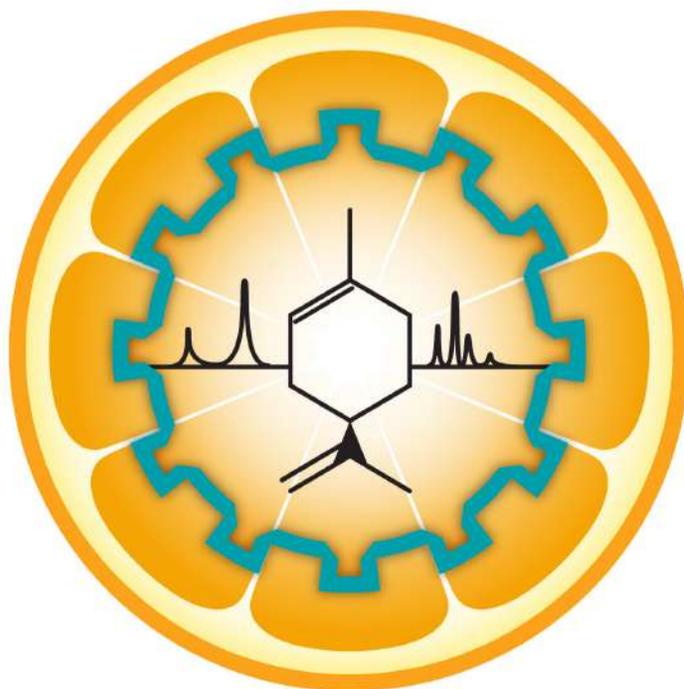
A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, de igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Quiero agradecer de manera especial a mi asesor, el Dr. Rogelio Valadez Blanco por confiar en mi y por toda la enseñanza brindada durante esta aventura del conocimiento... ¡Muchas Gracias!

También al Dr. Raúl Salas Coronado, a la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, a la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza y a la M.C. Alma Yadira Salazar Govea por todo lo que me han enseñado y por contagiarme un poco de su gran entusiasmo por la investigación, por siempre apoyarme, animarme y confiar en mí... ¡¡Son mi ejemplo a seguir!!

A Edilberto López Pérez, por su apoyo en el sistema de control del biorreactor.

Al Dr. Adelfo Escalante Lozada, el Dr. Vladimir Sánchez López, el Dr. Fidencio Sustaita Rivera, el Dr. Raúl Salas Coronado y el Dr. Rogelio Valadez Blanco, por todo su apoyo y conocimientos brindados para el mejoramiento del proyecto...



“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay otros que luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida... ¡¡Esos son los imprescindibles!!” – Bertolt Brecht.

RESUMEN

En la actualidad la producción de productos agrícolas se ha mantenido gracias a la aplicación cada vez mayor de fertilizantes químicos en los cultivos. Sin embargo, el exceso de fertilizantes en el suelo provoca la pérdida gradual de su material orgánico y actividad microbiológica, así como severos cambios en los ecosistemas por el agotamiento de oxígeno. Además, la producción de los fertilizantes químicos contribuye a la destrucción de la capa de ozono y el agotamiento de los recursos no renovables. Una alternativa para la disminución del uso de fertilizantes químicos es la utilización de biofertilizantes. Estos consisten en microorganismos vivos que al ser agregados mediante un material acarreador al suelo o a las semillas de las plantas, promueven el enriquecimiento de la disponibilidad de nutrimentos, el mejoramiento de la fertilidad y el control de enfermedades. Consecuentemente, se promueven mejores rendimientos en los cultivos y se contribuye a la reestructuración del suelo y de sus condiciones fisicoquímicas y microbiológicas naturales. Para la producción de biofertilizantes, es necesaria la obtención de una cepa microbiana a partir de suelo rizosférico que no haya sido sometido a tratamiento de fertilización química intensivo. Posteriormente se necesita producir la suficiente cantidad de biomasa para su aplicación en campo. Para esto es necesario además de la implementación de sistemas de biorreactores, la búsqueda de fuentes de sustrato económicas, como pueden ser desechos provenientes de otras industrias. A esto último se le considera como un proceso de desarrollo sustentable. En el presente trabajo se aisló una cepa de *Bacillus licheniformis* a partir de una muestra de suelo rizosférico. La bacteria se adaptó exitosamente para la producción de biomasa empleando melazas de caña de azúcar como sustrato sustentable. Después, se llevó a cabo la producción de biomasa en un biorreactor piloto de 3 L a condiciones de temperatura y pH controladas. Con la biomasa obtenida, se elaboraron inoculantes empleando suelo y almidón estériles como materiales acarreadores. Finalmente se evaluó la efectividad de los inoculantes producidos en cultivos de maíz en condiciones de invernadero. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se determinó que el uso de *B. licheniformis* usando almidón como acarreador y con la adición del 50% de la dosis de fertilización química recomendada para la Región Mixteca, permite un rendimiento estadísticamente mayor en la producción de grano respecto al cultivo testigo, en el cual se emplea el 100% de la dosis de fertilización química recomendada.

CONTENIDO

RESUMEN.....	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE NOMENCLATURA	xxi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ESTADO DEL ARTE	4
2.1. Fertilizantes.	4
2.1.1. Definición y clasificación.	4
2.1.2. Situación de los fertilizantes químicos en México.	5
2.2. Los biofertilizantes.	9
2.2.1. Definición y ventajas de los Biofertilizantes.	9
2.2.2. Clasificación de los Biofertilizantes.	10
2.3. El género <i>Bacillus</i>	11
2.3.1. Definición y generalidades de <i>Bacillus</i>	11

2.3.2. <i>Bacillus licheniformis</i>	13
2.3.3. Interacción y beneficios de la inoculación de <i>B. licheniformis</i> en la rizósfera.....	16
2.3.3.1. Solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno.	16
2.3.3.2. Producción de enzimas y fitohormonas.	16
2.3.3.3. Control biológico.	17
2.3.3.4. Activación de la resistencia sistémica inducida.	18
2.4. Aislamiento e identificación de <i>B. licheniformis</i>	19
2.4.1. Análisis genético.	20
2.4.2. Etapas de la técnica de identificación molecular.	22
2.4.2.1. Amplificación del gen a partir de la muestra.	23
2.4.2.2. Determinación de la secuencia de nucleótidos.	27
2.4.2.3. Análisis y comparación de la secuencia.	30
2.5. Inoculantes de <i>B. licheniformis</i>	31
2.6. Producción a gran escala	33
2.6.1. Melazas como sustrato autosustentable.	34
2.6.1.1. Usos comunes de las melazas de caña de azúcar.	36
2.6.2. Análisis del consumo del sustrato.	36
2.6.2.1. HPLC.	36
2.6.2.2. Colorimetría.	37
2.6.2.3. Determinación de azúcares totales.	39
2.6.2.4. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo en lote.....	40
2.7. Implicaciones de la investigación bibliográfica	43
3. ORIGINALIDAD	45

4. OBJETIVOS	46
4.1. OBJETIVO GENERAL	46
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5. METAS	47
6. METODOLOGÍA	48
6.1. Meta 1. Aislamiento y conservación de la cepa	48
6.1.1. Material Biológico.	48
6.1.2. Medios de cultivo	49
6.1.2.1. Medio ATCC: 838.	49
6.1.2.2. Medio NFb-RC.	49
6.1.2.3. Medio Luria-Bertani (LB).	50
6.1.2.3.1. Medio Luria Bertani-Rojo Congo (LB-RC).	50
6.1.2.4. Medio Mota-Valadez (MMV).	51
6.1.3. Proceso de aislamiento y conservación de <i>B. licheniformis</i>.	51
6.1.4. Identificación genética de la cepa aislada.	52
6.1.4.1. Extracción de ADN cromosomal.	52
6.1.4.2. Electroforesis en gel de agarosa.	54
6.1.4.3. Amplificación del gen ADNr 16s por PCR	57
6.1.4.4. Digestión enzimática de la muestra.	59
6.1.4.5. Purificación del gen ADNr 16S	61
6.1.4.6. Secuenciación del gen ADNr 16S.	62
6.1.4.7. Comparación de la secuencia obtenida contra una base de datos. 63	

6.2. Meta 2. Adaptación de <i>B. licheniformis</i> a un medio enriquecido con melazas	64
6.2.1. Técnicas para el análisis del consumo de sustrato	64
6.2.1.1. Determinación de la densidad óptica del cultivo (DO)	64
6.2.1.1.1. Determinación de la DO en el medio de cultivo LB	64
6.2.1.1.2. Determinación de la DO en el medio MMV	65
6.2.1.2. Determinación de sacarosa, fructosa y glucosa por HPLC	65
6.2.1.3. Determinación de azúcares totales	67
6.2.1.4. Determinación del color del medio	70
6.2.1.5. Análisis estadístico empleado para el análisis del consumo de sustrato	71
6.2.2. Determinación de las condiciones adecuadas de crecimiento	71
6.2.2.1. Asimilación de distintas fuentes de carbono	71
6.2.2.2. Análisis de asimilación de glucosa	71
6.2.2.3. Determinación del medio LB adecuado para <i>B. licheniformis</i>	72
6.2.2.4. Determinación de la temperatura óptima de crecimiento	72
6.2.3. Crecimiento y adaptación de <i>B. licheniformis</i> en el medio MMV con melazas	73
6.2.3.1. Aclimatación inicial al medio MMV con 4 g/L de melazas	73
6.2.3.2. Adaptación de <i>B. licheniformis</i> al medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas	74
6.2.4. Análisis del crecimiento de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada, en el medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas	75

6.2.5. Análisis del crecimiento en reactor piloto de la cepa adaptada en el medio MMV con 11 g/L de melazas.....	76
6.2.5.1. Biorreactor empleado para la producción de biomasa.....	76
6.2.5.2. Producción de biomasa de <i>B. licheniformis</i>	78
6.3. Meta 3. Producción de inoculantes.....	79
6.3.1. Inoculante con almidón.....	79
6.3.2. Inoculante con suelo.	80
6.3.3. Preparación de la semilla para su aplicación en invernadero.....	80
6.4. Meta 4. Evaluación de los inoculantes en cultivos de maíz.....	81
6.4.1. Contenido de clorofila de las plantas..	83
6.4.2. Producción de grano.	83
6.4.3. Análisis estadístico empleado.	84
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
7.1. Aislamiento y conservación de <i>B. licheniformis</i>.	85
7.1.1. Identificación genética de la cepa aislada.....	87
7.2. Determinación de las condiciones adecuadas de crecimiento de <i>B. licheniformis</i>.....	89
7.2.1. Fuente de carbono adecuada para el crecimiento.....	89
7.2.2. Medio LB adecuado para <i>B. licheniformis</i>	93
7.2.3. Selección de la temperatura óptima de crecimiento.....	93
7.3. Crecimiento y adaptación de <i>B. licheniformis</i> en el medio MMV enriquecido con melazas.	96
7.3.1. Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> en el medio MMV adicionado con 4 g/L de melazas.	96

7.3.2. Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas.	98
7.4. Análisis genético de las cepas de <i>B. licheniformis</i> adaptadas al medio enriquecido con melazas.	106
7.5. Análisis de la asimilación de sustrato de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada al medio enriquecido con melazas.	108
7.5.1. Análisis del consumo de azúcares de la cepa <i>B. licheniformis</i> adaptada al medio enriquecido con melazas en comparación con la cepa no adaptada. .	108
7.5.1.1. Análisis del consumo de sustrato de la cepa de <i>B. licheniformis</i> no adaptada.	109
7.5.1.2. Análisis del consumo de sustrato de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada.	112
7.5.2. Crecimiento de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada en medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas.	114
7.5.2.1. Análisis del consumo de azúcares.	116
7.5.2.2. Análisis del cambio de color durante la incubación.	118
7.6. Ensayo en reactor de la cepa adaptada empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas.	122
7.7. Producción de inoculantes.	128
7.7.1. Inoculante con almidón.	128
7.7.2. Inoculante con suelo.	129
7.8. Evaluación de los inoculantes en cultivos de maíz.	130
7.8.1. Altura y diámetro de la planta.	130
7.8.2. Clorofila.	132

7.8.3. Producción de grano.	133
7.8.4. Efectividad de los tratamientos biofertilizantes.	135
8. CONCLUSIONES	136
8.1. Características de la cepa de <i>B. licheniformis</i> aislada.	136
8.2. Adaptación de la cepa de <i>B. licheniformis</i> a un medio enriquecido con melazas.	137
8.3. Características del crecimiento en reactor de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada a melazas.	139
8.4. Evaluación de inoculantes en cultivos a condiciones de invernadero.	140
9. PERSPECTIVAS	141
10. BIBLIOGRAFÍA	143
11. APÉNDICE	154

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Naturaleza, fuentes y efectos adversos de los efluentes de las industrias productoras de fertilizantes.....	8
Tabla 2. Características de las colonias de <i>B. licheniformis</i>	14
Tabla 3. Composición promedio de las melazas de caña	35
Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR.....	57
Tabla 5. Mezcla de reacción para la digestión del gen ADNr 16S.	60
Tabla 6. Mezcla de reacción para la secuenciación del gen ADNr 16S.	63
Tabla 7. Tratamientos para la validación de los biofertilizantes en cultivos de maíz, bajo condiciones de invernadero.....	82
Tabla 8. Consumo de sustrato y rendimiento celular por parte de <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con distintas concentraciones de melazas.	118
Tabla 9. Cambios de color en el medio MMV antes y después de la incubación de <i>B. licheniformis</i>	120
Tabla 10. Valor ΔE de los medios enriquecidos con melazas después del crecimiento de <i>B. licheniformis</i>	121
Tabla 11. Resultados de altura y diámetro de la planta a los 3 meses del cultivo en invernadero.....	131

Tabla 12. Índice de clorofila en la plantas de maíz a los 5 meses de cultivo.....	133
Tabla 13. Peso del grano de maíz al final del cultivo en invernadero.	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotodocumentador empleado para el revelado del gel después de la electroforesis en gel de agarosa.	24
Figura 2. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.....	26
Figura 3. Diferencia entre un desoxinucleótido trifosfato y un didesoxinucleótido trifosfato.	28
Figura 4. Terminación de la síntesis de ADN mediante un ddNTP.	28
Figura 5. Determinación de la secuencia del ADN.....	30
Figura 6. Parámetros de medición de color CIELab.....	39
Figura 7. Complejo generado a partir de la reacción de Dubois.	40
Figura 8. Crecimiento microbiano en un cultivo por lote.....	41
Figura 9. Preparación del sistema de electroforesis.	56
Figura 10. Marcador de referencia con patrón de bandeo.....	56
Figura 11. Termociclador Bio-Rad C1000.....	58
Figura 12. Programa de temperaturas y ciclos para la amplificación del gen ADNr 16S de <i>B. licheniformis</i>	59
Figura 13. NanoDrop empleado para medir la concentración de ADN.	62

Figura 14. Colorímetro HunterLab empleado para la determinación del color en el medio MMV.	70
Figura 15. Reactor piloto de 3 L, para el crecimiento de <i>B. licheniformis</i>	77
Figura 16. Crecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno en medio LB-RC.....	86
Figura 17. Observaciones de colonias en caja Petri durante el aislamiento de <i>B. licheniformis</i>	87
Figura 18. Árbol filogenético de la cepa biofertilizante obtenido a partir de la secuencia del gen ADNr 16S.	88
Figura 19. Celulas bacilares y enquistadas de <i>B. licheniformis</i>	90
Figura 20. Formación de polímero en cultivos con la adición de glucosa como fuente de carbono.	91
Figura 21. Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con ácido málico como fuente de carbono.	94
Figura 22. Polímero producido por <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con ácido málico como fuente de carbono.....	95
Figura 23. <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 4 g/L de melazas.	97
Figura 24. <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 4 g/L de melazas observado a las 221 h de incubación.	98
Figura 25. Células enquistadas de <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 5 g/L de melazas.....	99
Figura 26. Células enquistadas de <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 5 g/L de melazas formando el polímero insoluble.	100

Figura 27. <i>B. licheniformis</i> en forma de bacilos cortos medio MMV con 5 g/L de melazas al final de la incubación.	100
Figura 28. <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 8 g/L de melazas. Se observa la producción de polímero en el medio.....	101
Figura 29. <i>B. licheniformis</i> en medio MMV con 8 g/L de melazas al final de la incubación.	102
Figura 30. Crecimiento de <i>B. licheniformis</i> en medio MMV.	104
Figura 31. Patrón de bandeado de las cepas de <i>B. licheniformis</i> adaptadas al medio enriquecido con melazas.....	107
Figura 32. Crecimiento de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada y no adaptada a melazas en medio MMV con 5 y 11 g/L de melazas respectivamente.....	109
Figura 33. Análisis de azúcares consumidos por la cepa de <i>B. licheniformis</i> no adaptada, en el medio MMV con 5 g/L a diferentes tiempos de cultivo.	111
Figura 34. Análisis de azúcares consumidos por la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada, en el medio MMV con 11 g/L a diferentes tiempos de cultivo.	113
Figura 35. Crecimiento de la cepa de <i>B. licheniformis</i> adaptada a melazas en el medio MMV a distintas concentraciones de melazas.	116
Figura 36. Concentración inicial y final de azúcares en el medio MMV a distintas concentraciones de melazas.	117
Figura 37. Crecimiento de la cepa de <i>B. licheniformis</i> en reactor por lote de 3 L usando el medio MMV con 11 g/L de melazas.	123
Figura 38. Cambios en el parámetro de color L^* durante la incubación en reactor empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas.	125

Figura 39. Cambios en el parámetro de color a^* durante la incubación en reactor empleando en el medio MMV con 11 g/L de melazas.	126
Figura 40. Cambios en el parámetro de color b^* durante la incubación en reactor empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas.	127
Figura 41. Preparación del inoculante usando almidón como acarreador.....	129
Figura 42. Inoculante usando suelo como acarreador.	130

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr 16S	Gen 16S del ARN ribosomal
ANOVA	Análisis de varianza
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
C	Citosina
CIE	Comisión internacional de la iluminación (Por sus siglas en francés “Commission internationale de l'éclairage”)
ddA	Didesoxiadenina
ddATP	Didesoxiadenina trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótido trifosfato
DMS	Diferencia mínima significativa
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
Fw	<i>Primer</i> hacia delante
G	Guanina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAA	Ácido indol acético

LB	Medio Luria-Bertani
LB-P	Medio LB reportado por Puerta y Ureña
LB-RC	Medio Luria-Bertani adicionado con Rojo Congo
LB-T	Medio LB reportado por Tilak y colaboradores
MMV	Medio Mota-Valadez para crecimiento de <i>B. licheniformis</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFB	Bacterias fijadoras de nitrógeno (por sus siglas en inglés “Nitrogen fixing bacteria”)
NFb-RC	Medio deficiente de nitrógeno con Rojo Congo
NMX	Norma mexicana
NPK	Fertilizante Nitrógeno-Fósforo-Potasio
OMD	Organismos descomponedores de materia orgánica (por sus siglas en inglés “Organic matter decomposer”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (por sus siglas en inglés “Plant growth promoting rhizobacteria”)
PMFB	Biofertilizantes movilizadores de fosfatos (por sus siglas en inglés “Phosphate mobilising biofertilizer”)
RDP	Ribosomal database project
RSI	Resistencia sistémica inducida
Rv	<i>Primer</i> reverso
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SMRI	Instituto de Investigación sobre la Molienda de Azúcar
T	Timina
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTM	Universidad Tecnológica de la Mixteca
UV	Ultra violeta

LISTA DE NOMENCLATURA

a^*	Parámetro de color entre rojo y verde
b^*	Parámetro de color entre azul y amarillo
ΔE	Diferencia de color
DO_{MAX}	Densidad óptica máxima del cultivo
Kb	Mil pares de bases
kg/ha	Kilogramos por hectárea
L^*	Parámetro de color CIELAB de luminosidad
p	Nivel de significancia estadística
pb	Pares de bases (nucleótidos)
r_X	Velocidad de producción de biomasa
S	Unidad Svedberg para el coeficiente de sedimentación
S_0	Concentración de sustrato al tiempo cero.
S_F	Concentración de sustrato al final de la incubación.
t_R	Tiempo de retención
UDO	Unidades de densidad óptica
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo
V_R	Volumen de cultivo
X	Concentración de biomasa
$y_{x/s}$	Rendimiento celular

1. INTRODUCCIÓN

Cuando México transitaba desde una sociedad rural a una sociedad industrializada, se elevó considerablemente la demanda de productos agrícolas. Esta demanda se satisfizo gracias a la “Revolución Verde”, la cual se basó en el uso de fertilizantes químicos, el empleo de semillas híbridas de alto rendimiento, la utilización de productos químicos para el combate de plagas y enfermedades, y en la implementación de sistemas de riego. La Revolución Verde logró incrementar la producción de alimentos incluso en dos veces más respecto al tamaño de la población. Sin embargo, sus beneficios no tuvieron la duración que se esperaba, ya que el uso indiscriminado de productos químicos trajo consecuencias al agrosistema, deteriorando los suelos, contaminando las aguas y degradando el medio ambiente (Morales Ibarra 2007).

Por todo lo anterior, la situación actual de la agricultura en México ha impulsado la búsqueda de fertilizantes de bajo costo que ayuden a restaurar el daño provocado en los suelos por los fertilizantes químicos, así como fomentar una producción sustentable. Entre los productos emergentes que atienden esta necesidad están los biofertilizantes. Los biofertilizantes son productos elaborados a base de determinadas cepas bacterianas, fúngicas, o la mezcla de ellas, que establecen relaciones simbióticas con las plantas. Éstos productos no únicamente

contribuyen a la nutrición de las plantas, sino también al re-establecimiento de las condiciones físicas, químicas y biológicas naturales de los suelos (Kannaiyan 2002). Las bacterias empleadas como biofertilizantes, pertenecen a un grupo de microorganismos que se hallan habitualmente en la rizósfera de las plantas, llamadas “rizobacterias” (Goldstein y Liu 1987). Se han empleado diversas especies de microorganismos como biofertilizantes, tales como *Aspergillus*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Trichoderma*, así como distintas cepas de hongos micorrízicos (Board 2004). La bacteria de estudio en este proyecto es una rizobacteria biofertilizante llamada *Bacillus licheniformis*.

Para la producción de biofertilizantes es necesaria la producción de biomasa en forma viable y sustentable. Hasta la fecha existen pocos estudios relacionados con la producción de biomasa de *B. licheniformis* a gran escala. Lim y Kim (2010), llevaron a cabo la producción de *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*, empleando melazas como una de las fuentes de carbono ensayadas. En cuanto a inoculantes, Chung y colaboradores (2010), llevaron a cabo la producción de un inoculante en polvo a base de endosporas termo resistentes de *B. licheniformis* y *B. subtilis*. En la literatura no existen publicaciones que traten específicamente sobre la optimización de la producción de biomasa de *B. licheniformis*, empleando un sustrato sustentable como las melazas específicamente.

En el presente proyecto se llevó a cabo un proceso de adaptación de *B. licheniformis* a un medio enriquecido con melazas, para promover la producción de biomasa a bajo costo y con buenos rendimientos. Los resultados de este proyecto se pueden utilizar para producir biofertilizantes de *B. licheniformis* de manera

tecnológica y económicamente factible. Con esto se busca impulsar el desarrollo comercial y semi-industrial de los biofertilizantes en México y de manera particular, en el Estado de Oaxaca.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Fertilizantes

2.1.1. Definición y clasificación. Un fertilizante es una sustancia natural o artificial, sólida o líquida, que se agrega al suelo para mejorar la concentración de los nutrimentos y/o las propiedades físicas y químicas para lograr el crecimiento y mejorar la calidad y el rendimiento de las plantas (Gowariker et al. 2009). Los fertilizantes pueden clasificarse en base a su composición química, a su contenido nutrimental, y a su estado de agregación.

Con base en su composición química, los fertilizantes se clasifican en (Gowariker et al. 2009):

1. *Fertilizantes minerales.* Contienen compuestos inorgánicos u orgánicos sintetizados químicamente.
2. *Fertilizantes orgánicos.* Se producen a partir de desechos de:
 - a. *La agricultura y ganadería:* estiércol de establo, estiércol líquido, entre otros.

- b. *Productos de descomposición de las plantas*: compostas, plantas, y otros.
 - c. *Productos de tratamientos residuales*: compostas, lodos, entre otros.
3. *Acondicionadores sintéticos del suelo*: su función principal es mejorar las propiedades físicas del suelo.

Con base en su contenido nutrimental, los fertilizantes se clasifican en:

1. *Fertilizantes directos*: contienen sólo un nutrimento primario.
2. *Fertilizantes mixtos o complejos*: contienen varios nutrimentos primarios y a veces micronutrientes.
3. *Fertilizantes micronutritivos*: contienen nutrimentos que requieren las plantas en cantidades pequeñas.

Finalmente, con base a su estado de agregación los fertilizantes se clasifican en:

1. *Líquidos*.
2. *Sólidos*.

2.1.2. Situación de los fertilizantes químicos en México y las desventajas de su uso. En México, se consumen aproximadamente 4.5 millones de toneladas de fertilizantes de los cuales, se importan más del 55% (SAGARPA 2009). El consumo de fertilizantes en México representa el 1.2% del

consumo mundial y un 2% de las importaciones mundiales, con lo que se ubica en la posición número once entre los países importadores de fertilizantes (FIRA 2008).

En el bajío, una de las zonas agrícolas más importantes de México, tanto en área de producción como en el número de especies cultivadas, destaca la rotación de cereales y hortalizas. La capacidad de esta región para sostener ésta producción se ha mantenido durante los últimos 30 años gracias a la aplicación cada vez mayor de fertilizantes químicos. Sin embargo, todo esto ha provocado una disminución considerable en el contenido de materia orgánica de los suelos, y problemas de contaminación ambiental (Peña-Cabriales et al. 2001).

El exceso de fertilizantes en el suelo provoca que éste vaya perdiendo gradualmente su material orgánico y su actividad microbiológica. Por tanto su estructura se deteriora y se vuelve compacta, menos capaz de retener agua y nutrientes (Nag 2008). Además, las cantidades excesivas de nitrógeno y fósforo que se emplean, se almacenan y se filtran en el suelo. Estos minerales son susceptibles de ser arrastrados tanto a las aguas superficiales como a las subterráneas, provocando la contaminación de éstas, llamada eutrofización. Esta consiste en un incremento en la fertilidad natural de las aguas que provoca un acelerado aumento en la turbidez y el crecimiento de algas y plantas acuáticas (Paul 2007).

Por otro lado, los procesos de manufactura de fertilizantes contribuyen a la destrucción de la capa de ozono y al agotamiento de recursos no renovables, debido a los efluentes producidos durante el proceso (Thakur 2006). Un análisis de los residuos de una planta productora de fertilizantes que desecha 20,000

toneladas/día de efluentes, muestra un contenido promedio de nitrógeno entre 400-800 mg/L, entre 70-500 mg/L de fosfatos, de 10-20 mg/L de fluoruros (F⁻) y arsénico entre 1 y 2.5 mg/L. Los principales gases contaminantes son dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, fluoruro y materia de distinta naturaleza y tamaños de partícula. Los valores aceptados de nitrógeno, fluoruros y arsénico, son 1.2 mg/L, 2 mg/mL y 1 mg/L, respectivamente (Trivedi 2004). Los efectos de estos contaminantes sobre el ambiente se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Naturaleza, fuentes y efectos adversos de los efluentes de las industrias productoras de fertilizantes (Trivedi, 2008).

Contaminante	Fuente	Efectos contaminantes
Amonio	Plantas de amonio y urea.	Toxicidad para peces y especies acuáticas. Eutrofización.
Urea	Plantas de urea.	Toxicidad por el amonio producido después de la hidrólisis. Eutrofización.
Arsénico	Purificación de gas en la manufactura de amonio y urea.	Provoca la enfermedad del Pie Negro. Es un veneno acumulativo. Afecta a plantas y cultivos.
Aceite	Compresores de gas en manufactura de amonio y urea.	Suprime la disolución del oxígeno en el agua.
Fosfato	Plantas de ácido fosfórico y unidades de producción de fertilizantes complejos.	Junto con el amonio, provoca eutrofización, lo que eleva el costo por tratamiento de efluentes.
Fluoruro	Efluentes de lavado en la manufactura de ácido fosfórico y superfosfatos.	Provoca fluorosis esquelética y dental. Afecta la incubación de los huevos de peces.

2.2. Los biofertilizantes

2.2.1. Definición y ventajas de los Biofertilizantes. Existe otro tipo de fertilizantes, que debido a su origen, no se incluyen en ninguna de las clasificaciones anteriores, estos son los biofertilizantes. Estos productos son inoculantes biológicamente activos, constituidos de bacterias, algas, hongos, o una mezcla de ellos. Son cultivados bajo condiciones especiales e incorporados al suelo mediante un acarreador adecuado (Thakur 2006; Gowariker et al. 2009). Estos materiales, al agregarse a semillas o suelo, proveen o enriquecen la disponibilidad de nutrimentos en los cultivos, mejorando la fertilidad y contribuyendo al crecimiento de la planta. Pueden ayudar también al control de enfermedades y a la manutención de la estructura física y química del suelo (Kannaiyan 2002; Rai 2006).

La utilización de biofertilizantes conlleva diversas ventajas, que se mencionan a continuación (Kannaiyan 2002; Nag 2008):

- Incrementan el número y actividad biológica de los microorganismos necesarios en el ambiente rizosférico de la planta.
- Son una fuente barata y renovable, si se produce con tecnología y procesos adecuados.
- No contaminan; al contrario, aseguran la estabilidad biológica del suelo.
- Funcionan como acondicionadores del suelo, estimulando la actividad microbiana del suelo, y mejoran o restauran la fertilidad del suelo.

- Mejoran la proporción aire-agua en el suelo y hacen al suelo menos propenso a la compactación y a la erosión.
- Incrementan el rendimiento de los cultivos en un 20-30%. Estimulan el crecimiento de la planta.
- Reemplazan en cierto porcentaje, al nitrógeno y al fósforo químico. Por lo tanto, reduce el costo por el uso de fertilización química.

2.2.2. Clasificación de los Biofertilizantes. Generalmente, los biofertilizantes pueden clasificarse en tres grandes grupos (Board 2004):

1. Biofertilizantes fijadores de nitrógeno (NFB).
 - a. Para leguminosas:
 - i. *Rhizobium*.
 - b. Para cereales.
 - i. *Azotobacter*.
 - ii. *Azospirillum*.
 - iii. *Pseudomonas*.
 - iv. *Aspergillus*.
2. Biofertilizantes movilizadores de fosfato (PMFB).
 - a. Solubilizadores de fosfato.
 - i. *Bacillus*.
 - b. Amortiguadores de fosfato.
 - i. Hongos micorrízicos arbusculares.
3. Degradadores de materia (OMD).

- a. Organismos celulolíticos.
 - i. *Cellulomonas*.
 - ii. *Trichoderma agaricus*.
- b. Organismos ligninolíticos.
 - i. *Arthrobacter*.

Las bacterias que se emplean como biofertilizantes pertenecen a un grupo de bacterias que habitualmente se hallan en la rizósfera de las plantas, llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés). Estas bacterias facilitan el crecimiento de las plantas proveyendo a éstas con diversas formas de nutrientes y previniendo el ataque de patógenos (Goldstein y Liu 1987). Dentro de este grupo también se encuentran las bacterias estimulantes, rizomediadoras, y biopesticidas (Khan et al. 2009).

2.3. El género *Bacillus*

2.3.1. Definición y generalidades de *Bacillus*. El género *Bacillus* está constituido por bacterias generalmente mesófilas, bacilares rectas o ligeramente curvadas; se ordenan comúnmente en pares, algunos en cadenas, y ocasionalmente como largos filamentos (Whitman 2009). Estas bacterias son aerobias o aerobias facultativas (a excepción de *B. infernos*, que es anaerobia estricta), quimioorganotróficas, móviles gracias a sus flagelos peritricos (excepto *B.*

anthracis y *B. micoides*), Gram positivas (aunque algunas pueden ser variables), catalasa positivas y producen endosporas subterminales, terminales o centrales en condiciones aerobias. Las esporas son muy resistentes al calor y a la desecación (Silva García et al. 2006; Winn y Koneman 2006). Algunas especies son capaces de hidrolizar almidón y ADN, así como metabolizar un gran número de fuentes de carbono, como metanol, celulosa, xilasas, quitina, entre otras. Se encuentra en distintos nichos, como en la rizósfera, polvo, agua y algunos residuos de origen animal y vegetal (Pommerville 2011; Winn y Koneman 2006; Silva García et al. 2006). También se encuentra en ambientes alcalinos, pinturas, respiraderos hidrotérmicos, intestinos de insectos y agua de mar (Ettoumi et al. 2009; Fan et al. 2011). La presencia del género en diversos ambientes refleja su amplia versatilidad en su capacidad metabólica. Algunas especies son patogénicas en animales e insectos (Winn y Koneman 2006).

Algunas cepas del género *Bacillus* se emplean para la producción de antibióticos y vitaminas, y en bioensayos como biosensores. Adicionalmente se han usado para la producción de biofertilizantes, bacteriocinas, biosurfactantes, también como microorganismos indicadores en el monitoreo de la eficacia de desinfectantes y procesos de esterilización (Sansinenea 2012; Winn y Koneman 2006).

La taxonomía del género *Bacillus* puede clasificarse en dos grupos, el grupo de *B. subtilis* y el grupo de *B. cereus*. Las cepas del grupo de *B. subtilis* están muy relacionadas y por esta razón es muy difícil distinguirlas entre sí; incluyen a las especies *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. sorensis*, *B. licheniformis*, entre otras (Maheshwari 2010).

El grupo de *B. subtilis* se encuentra en ambientes de suelo y plantas, y está relacionado con el metabolismo de carbohidratos (Margulis 1998; Jensen et al. 2003; Swiecicka y Mahillon 2006).

En la rizósfera, el género *Bacillus* tiene la función de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, producir fitohormonas y antimicrobianos para las plantas; así como promover el consumo de micronutrientes en las plantas. Por esta razón, las células de éste género pueden ser empleadas como biofertilizantes. Estas bacterias promueven la mejora en el rendimiento de los cultivos por medio de tres mecanismos: (1) promoción de la nutrición y crecimiento de la planta hospedera; (2) antagonismo contra hongos, bacterias, nematodos, patógenos, insectos y (3) estimulación de los mecanismos de defensa de la planta. Se ha encontrado que promueven la resistencia sistémica inducida (RSI) (Maheshwari 2010). Debido a estas características, las bacterias de éste género pueden considerarse como promotoras del crecimiento y por lo tanto tienen potencial en la implementación de tecnologías de agricultura sustentable.

2.3.2. *Bacillus licheniformis*. *B. licheniformis* es una bacteria bacilar, de 0.6-0.8 por 1.5-3 μm , anaerobia facultativa, catalasa-positiva, oxidasa-variables, *Gram* positiva y mótil. Se puede encontrar individualmente, en pares o incluso en cadenas; produce esporas elipsoidales o cilíndricas que pueden observarse al centro de la célula (Whitman 2009). En la Tabla 2 se muestran las características generales de la morfología de sus colonias.

Tabla 2. Características de las colonias de *B. licheniformis*

(Whitman, 2009).

Forma	Redonda o irregular, con márgenes ondulados o fimbriosos.
Superficie	Embotada, puede tornarse rugosa.
Textura	Varía entre húmeda, butirosa o mucoide. Se vuelven duras y quebradizas cuando se secan. Tienden a adherirse al agar.
Diámetro	2-4 mm.
Color	Crema o cafés, se pueden volver opacas.

La temperatura mínima de crecimiento es de 15 °C y la máxima de 50-55 °C, aunque se ha reportado una cepa aislada de un ambiente geotérmico a una temperatura de 68 °C (Llarch et al. 1997). El crecimiento ocurre a un pH de entre 5.7 y 6.8, pero no se han reportado los valores óptimos. Crece en presencia de un contenido de NaCl de 7% (Whitman 2009).

B. licheniformis tiene un metabolismo que exhibe un flujo alto de la vía de las pentosas fosfato, lo que la hace una eficiente productora de nucleósidos purínicos y vitaminas (Yu et al. 2011; Sheremet et al. 2011; Li et al. 2011; Zhang et al. 2011; Eppinger et al. 2011). Sus principales fuentes de carbono son el citrato y propionato en la mayoría de las cepas. Lleva a cabo una fermentación ácido mixta, produce NO, N₂O y N₂, y exhibe un crecimiento anaeróbico pobre en fumarato. Puede crecer en presencia de arginina, empleando la ruta de la arginina desaminasa. Es capaz de formar dextranos y levanos extracelularmente a partir de

sacarosa. Reduce el nitrato a nitrito. Se ha comprobado también, que algunas cepas fijan nitrógeno atmosférico. Produce un biopolímero soluble llamado ácido poli- γ -glutámico, el cual tiene una amplia aplicación en diversos sectores como el alimentario, farmacéutico y cosmético, así como floculante y quelatante de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales (Whitman 2009). Kaynar y Beyatli (2009) reportaron una variedad de *B. licheniformis* capaz de producir poli- β -hidroxibutirato.

B. licheniformis hidroliza arginina, esculina, gelatina y almidón (algunas cepas pueden hidrolizar urea). Este microorganismo también es capaz de descomponer quitina, pectina y polisacáridos de tejidos de plantas. Es un organismo queratinolítico y por tal razón tiene un rol importante en la degradación de plumas y desechos de aves de corral (Whitman 2009; Haq-Ikram-ul et al. 2005).

B. licheniformis se ha empleado también como suplemento dietético en animales, como agente antimicrobiano y promotor del crecimiento en la acuicultura mediante la mejora de la resistencia a enfermedades. Su efecto probiótico se debe a la capacidad de sus esporas para germinar en el tracto gastrointestinal y producir bacteriocinas y otros antibióticos con actividad antagónica contra bacterias patógenas (Sansinenea 2012).

B. licheniformis se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, compostas, plumas de aves, cuero, papel, cartón, superficies rocosas, en leche y otros alimentos, así como en especímenes clínicos y veterinarios. Esta especie se ha podido aislar también de los tejidos internos de plantas sanas de algodón, uva, chícharo, abeto y maíz (Whitman 2009).

2.3.3. Interacción y beneficios de la inoculación de *B. licheniformis* en la rizósfera. A continuación se abordarán con mayor profundidad los mecanismos que contribuyen al efecto de *B. licheniformis* en el crecimiento y rendimiento de las plantas.

2.3.3.1. Solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno. El empleo de fertilizantes químicos fosfatados en suelos con salinidad alta resulta inadecuada, ya que éste tipo de suelos provoca la insolubilidad de los fosfatos, haciéndolos no disponibles para las plantas (Goldstein 1986). Por tanto, el uso de una bacteria solubilizadora de fosfato como *B. licheniformis* es una alternativa excelente para éste tipo de suelos, ya que promueve una mejor biodisponibilidad del fosfato para las plantas. Así mismo, esto ayuda a evitar el uso excesivo de fertilizantes químicos y por lo tanto también contribuye a disminuir la contaminación de los suelos (Sapsirisopa et al. 2009). Se ha reportado que *B. licheniformis*, además de ser solubilizadora de fosfatos, puede fijar nitrógeno para contribuir al crecimiento de las plantas (Rojas et al. 2001; Canbolat et al. 2005; Barua et al. 2011; Çakmakçi et al. 2007).

2.3.3.2. Producción de enzimas y fitohormonas. Bajo condiciones de estrés, las plantas promueven la producción de etileno empleando ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como precursor (Bleecker y Kende 2000; Morgan y Drew 1997). La elevación de la concentración de esta fitohormona en las plantas induce la inhibición en la elongación de las raíces, provocando un

crecimiento reducido. *B. licheniformis* produce una enzima desaminasa que degrada al ACC, permitiendo por lo tanto, una mayor elongación de las raíces de las plantas (Mayak et al. 2004; Sapsirisopa et al. 2009).

B. licheniformis también produce auxinas, giberelinas, y ácido indolacético (IAA), que son fitohormonas que tienen influencia sobre la germinación de las semillas, el crecimiento del tallo, la florescencia y la composición de los frutos (MacMillan 2001; Gutiérrez-Mañero et al. 2001; Lim y Kim 2009; Jung et al. 2006; Jung et al. 2007). Las auxinas son indispensables en el proceso inicial de formación y elongación de las raíces. Esto a su vez mejora el potencial de la planta para absorber nutrimentos y agua, debido a que, al promover el crecimiento de las raíces, se incrementa el área superficial de contacto entre el suelo y la raíz. Asimismo las auxinas de origen microbiano pueden mejorar la producción de auxinas en las plantas hospederas (Gaspar et al. 1996; Kloepper et al. 2004; Yao et al. 2006; Selvadurai et al. 1991; Germida y Walley 1996).

2.3.3.3. Control biológico. *B. licheniformis* produce sustancias capaces de evitar la contaminación fúngica patógena en maíz, pastos y cultivos vegetales, tales como la β -glucanasa y la celulasa. Estas enzimas permiten controlar fitopatógenos como *Phytophthora capsici*, *Phytophthora blight*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, mediante la hidrólisis de la pared celular de éstos patógenos (Kloepper et al. 2004; Neyra et al. 1996; Jung et al. 2006; Jung et al. 2007). Lim y Kim (2010) emplearon una mezcla de *B. licheniformis* y *B. subtilis*, para combatir la infección en plantas de chile causada por *P. blight*. Los autores reportaron que el 80% de los chiles tratados con estas cepas sobrevivieron hasta los 65 días.

2.3.3.4. Activación de la resistencia sistémica inducida. La resistencia inducida se define como el mejoramiento de la capacidad de defensa de las plantas contra patógenos y enfermedades, mediante la activación de los mecanismos de defensa latentes (Hammerschmidt y Kuc 1995; Van Loon 1997). A la elevación de la resistencia causada por un agente inductor, se le denomina resistencia sistémica inducida (Hammerschmidt y Kuc 1995). El agente inductor de la resistencia sistémica puede ser biótico o abiótico. Los agentes inductores bióticos pueden ser microorganismos patógenos o no patógenos. Los agentes abióticos son el ácido salicílico, el etileno, el ácido dicloro-isonicotínico y el benzotiadiazol (Görlach et al. 1996; Sticher et al. 1997).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento, a las cuales pertenece *Bacillus licheniformis*, activan la inducción de la resistencia sistémica sin provocar ningún síntoma necrótico sobre la planta hospedera. Consecuentemente, se pueden definir como agentes de inducción bióticos no patógenos (Van Loon et al. 1998). El empleo de las rizobacterias como inductores de la resistencia sistémica en plantas de cultivo se ha demostrado satisfactoriamente bajo condiciones de campo (Wei 1991; Wei et al. 2010; Vidhyasekaran y Muthamilan 1999; Viswanathan 1999; Viswanathan y Samiyappan 1999).

2.4. Aislamiento e identificación de *B. licheniformis*

La mayoría de las cepas de *B. licheniformis* pueden aislarse a partir del suelo así como de fuentes de agua y alimentos (Whitman 2009). Existen dos metodologías bien definidas para el aislamiento de esta bacteria que han sido reportadas en la literatura. La primera, es la siembra de diluciones seriales a partir de la muestra de suelo en medios nutritivos como agar nutritivo, Luria Bertani, agar soya tripticasa o agar sangre. La otra es a partir de las esporas de *B. licheniformis* que se obtienen al tratar térmicamente la muestra de suelo, seguido por la siembra en medios nutritivos (Whitman 2009; Yi et al. 2012).

Después de la siembra, se puede llevar a cabo un análisis morfológico de las colonias, un análisis del perfil de ácidos grasos y pruebas bioquímicas para corroborar el género y especie de los microorganismos aislados (Whitman 2009; Canbolat et al. 2005; Pasnik et al. 2008; De Freitas et al. 1997).

Un aspecto relevante a tomar en cuenta en el aislamiento de la cepa, radica en que *B. licheniformis* es capaz de producir diversos metabolitos, así como de metabolizar distintas moléculas dependiendo del nicho de donde se aísle. Por lo tanto, el medio de cultivo a emplear para el aislamiento puede enriquecerse con algún sustrato que *B. licheniformis* pueda metabolizar.

Con base en esto, se han logrado aislar cepas de *B. licheniformis* con distintas características. Por ejemplo, Saimmai et al. (2011; 2012) aislaron una cepa de *B. licheniformis* capaz de producir biosurfactantes, mediante el empleo de un medio suplementado con aceite. Usando la misma estrategia, Sandalli et al. (2008) emplearon un medio enriquecido con quitina para poder aislar una cepa de *B.*

licheniformis capaz de degradar este polisacárido. Así mismo, Ashengroph y Nahvi (2012) aislaron una cepa de *B. licheniformis* capaz de llevar a cabo la biotransformación de ácido ferúlico a ácido vainillínico, empleando en los medios de aislamiento ácido ferúlico como única fuente de carbono. También se ha logrado aislar una variedad de *B. licheniformis* capaz de degradar plumas de aves empleando estos desechos en los medios de cultivo (Williams y Shih 1989; Williams et al. 1990). Bharagava et al. (2009) lograron aislar una variedad de *B. licheniformis* capaz de degradar melanoidinas, mediante la formulación de medios de cultivo que contenían estos polímeros. Por otro lado, se han aislado cepas resistentes a la desecación a partir de suelos salinos empleando medios enriquecidos con NaCl (Wei et al. 2010). Sareen y Mishra (2008) aislaron una cepa de *B. licheniformis* resistente a disolventes orgánicos empleando precisamente un disolvente orgánico en el medio de cultivo. En todos los casos, el aislamiento se realizó a partir de suelo contaminado con efluentes relacionados a los metabolitos de interés.

2.4.1. Análisis genético para la identificación de la sub especie. *B. licheniformis* está estrechamente relacionada con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, y por esta razón es muy difícil diferenciarla de éstas mediante el uso de pruebas fisiológicas o bioquímicas. Por esta razón, se recurre a la identificación molecular basada en la comparación de la secuencia del gen ADN_r 16S contra un banco de datos para obtener de manera precisa la especie y sub

especie del microorganismo aislado (Rey et al. 2004; Bharagava et al. 2009; Vigneshwaran et al. 2010; Yi et al. 2012).

El ribosoma celular, orgánulo encargado de la síntesis de proteínas, tiene un coeficiente de sedimentación de 70S, expresado en unidades Svedberg (unidad para medir el coeficiente de sedimentación de una molécula cuando es centrifugada). Este coeficiente aumenta con el peso molecular de la molécula sedimentada pero no de forma directamente proporcional, ya que la forma de la partícula también afecta la velocidad de sedimentación (Rodicio y Mendoza 2004; Campbell y Farrell 2004). El ribosoma puede disociarse en dos subunidades, una grande (50S) y una pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoprotéico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ácido ribonucleico específicas. La subunidad 30S contiene al ARNr 16S, el cual es un polirribonucleotido de aproximadamente 1,500 pares de bases (pb), denominado también ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Esta es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Rodicio y Mendoza 2004).

El análisis de la secuencia de los ADNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló que existen secuencias específicas cortas que aparecen en todas o la mayoría de los miembros de un determinado grupo filogenético, llamados oligonucleótidos firma. Estas secuencias son las que permiten ubicar a cada bacteria dentro de un grupo específico. El gen ADNr 16S fue considerado por Woese (1987) como cronómetro molecular definitivo por las razones siguientes:

1. Se trata de una molécula presente en todas las bacterias actuales.
2. Su función y estructura son constantes a través del tiempo.

3. Los cambios en su estructura ocurren de manera lo suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas, y con la suficiente variabilidad para diferenciar entre organismos que incluso sean filogenéticamente muy cercanos.
4. Tiene un tamaño relativamente grande, lo cual minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación de su estructura secundaria puede ser de ayuda para las comparaciones filogenéticas.
6. Dada la relativa facilidad de su secuenciación, existen bases de datos muy completas para la comparación e identificación genética.

El gen ADNr 16S se marca primeramente *in vivo*, posteriormente se purifica y se trata con la enzima ribonucleasa T1. Los fragmentos generados se separan para determinar su secuencia; posteriormente, esta secuencia se compara contra un banco de datos empleando programas bioinformáticos. Finalmente, se obtienen coeficientes de asociación.

2.4.2. Etapas de la técnica de identificación molecular. La técnica de identificación molecular basada en el análisis del gen ADNr 16s es muy rápida y precisa y consta de tres etapas: (1) amplificación del gen a partir de la muestra, (2) determinación de la secuencia de nucleótidos, y (3) análisis y comparación de la secuencia contra una base de datos (Campbell y Farrell 2004).

2.4.2.1. Amplificación del gen a partir de la muestra. Primero, se extrae y purifica el ADN cromosomal a partir de un cultivo puro. Existen protocolos generales para realizar la extracción, sin embargo estos pueden requerir de modificaciones dependiendo de la bacteria analizada (Campbell y Farrell 2004). Una vez extraído el ADN, se debe llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa para corroborar que efectivamente se extrajo el ADN cromosomal del microorganismo. La electroforesis en gel de agarosa es un método para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal, extraído de algas marinas, que forma geles con poros que varían de 100 a 300 nm, dependiendo de la concentración de agarosa en el gel. Sobre este gel se separan los fragmentos de ADN, dependiendo del tamaño de los fragmentos y del tamaño de poro del gel. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo al polo positivo. Los poros obstaculizan menos a las moléculas más cortas que a las más largas, y así, las primeras se mueven con más rapidez a través del gel y la corriente eléctrica sirve como fuerza motriz para impulsar las moléculas a través del gel. Por lo tanto, moléculas de diferentes longitudes forman bandas en el gel, identificando así los diferentes fragmentos en la mezcla al revelar el gel en un fotodocumentador, Figura 1 (Puerta y Ureña 2005; Brown 2008).



Figura 1. Fotodocumentador empleado para el revelado del gel después de la electroforesis en gel de agarosa.

Posteriormente, se realiza la amplificación del gen ADNr 16S usando un termociclador mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica permite la amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN, generando millones de copias idénticas. Para que se lleve a cabo esta reacción se emplean dos oligonucleótidos llamados *primers* que contienen un extremo 3' libre, que es complemento de la cadena de ADN que se quiere replicar. Los *primers* funcionan como punto de inicio para la adición de nucleótidos y para copiar la cadena deseada en el PCR, uno de ellos promueve la adición hacia delante de la cadena (Fw) y otro hacia atrás (Rv). Una vez que los *primers* se unen a la cadena, la enzima ADN Polimerasa extiende la hebra complementaria empleando

nucleótidos suministrados a la reacción. En general el ciclo de una reacción de PCR consta de tres pasos:

1. *Desnaturalización:* En esta etapa se rompen los puentes de hidrógeno que unen a las hebras de ADN para posteriormente poder fijar los *primers* a las cadenas sencillas. Esto se logra mediante el calentamiento a 95 °C durante 5 min.
2. *Alineamiento:* En esta etapa se promueve la fijación de los *primers* en los extremos del fragmento deseado de ADN; esto se logra a una temperatura de 55 °C.
3. *Extensión:* En este último paso se suministra la temperatura ideal para que la enzima polimerasa extienda la cadena complementaria de ADN. Una de las polimerasas más conocidas es la aislada del microorganismo *Thermus aquaticus*, por lo que se le conoce como Taq Polimerasa y su temperatura ideal de extensión es de 72 °C.

En el primer ciclo, se sintetizan los primeros fragmentos de ADN, sin embargo, no tienen el tamaño deseado, ya que la Taq polimerasa copiará hasta donde le sea posible. En el segundo ciclo, los *primers* se unirán también a los nuevos fragmentos generados y así sucesivamente; logrando que conforme se repitan los ciclos se generen los fragmentos del tamaño adecuado (Espinosa Azúcar 2007; Dale y Von Schantz 2002). En la Figura 2 se muestran esquemáticamente las tres etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.

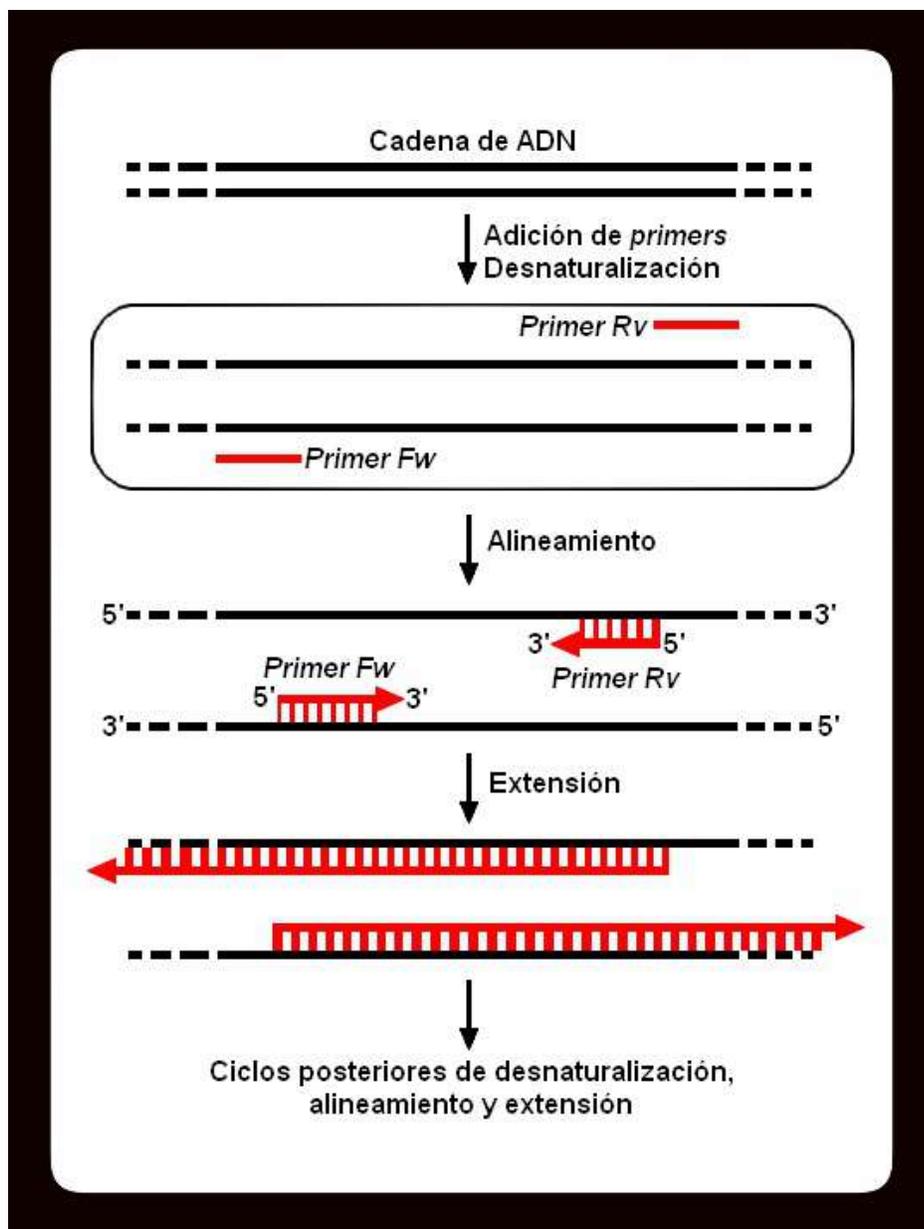


Figura 2. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (Dale y Von Schantz 2002).

Antes de pasar a la secuenciación del gen, se comprueba la obtención del gen mediante electroforesis en gel de agarosa. Se deberá observar en el revelado del gel, la presencia de un único fragmento de alrededor de 1.5 Kb que representa la presencia del gen ADNr 16S.

2.4.2.2. Determinación de la secuencia de nucleótidos. La secuenciación consiste en la obtención de la serie de bases que conforman el gen analizado. Para esto se emplea el método Sanger, que se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Su fundamento se reporta a continuación:

Durante la síntesis del ADN, la adición de bases a la cadena creciente se logra mediante la formación de un enlace covalente fosfodiéster entre la terminación 5'-fosfato del nucleótido a agregar con el grupo 3'-OH de la desoxirribosa en la molécula de ADN. El sustrato para esta reacción es un 5'-dNTP, que es un desoxinucleótido con tres fosfatos en la posición 5' de la desoxirribosa. La terminación de la síntesis del ADN se consigue mediante la adición de un didesoxinucleótido, en el cual la molécula de azúcar no posee el grupo -OH en la posición 3' (ddNTP) (Figura 3). La incorporación del ddNTP a la molécula de ADN (debido a que carece del grupo 3'-OH) impide continuar con la adición de nucleótidos, terminándose así la síntesis de ADN. Esta terminación se ilustra en la Figura 4 (Dale y Von Schantz 2002).

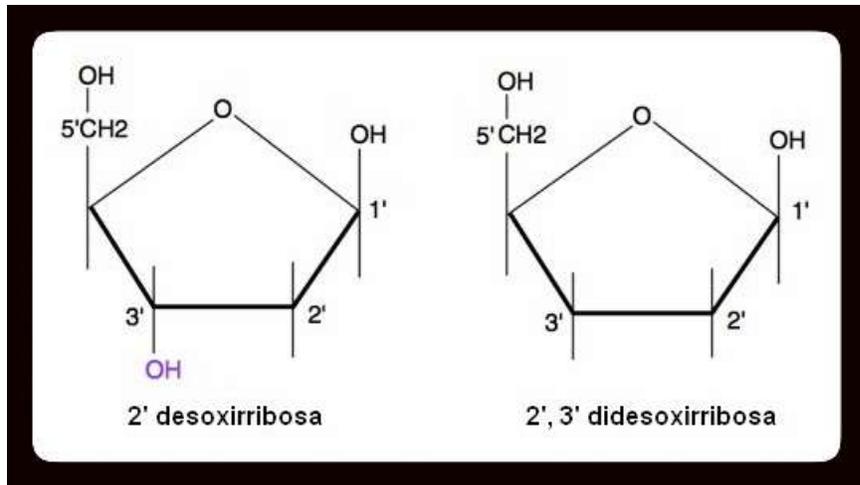


Figura 3. Diferencia entre un desoxinucleótido trifosfato (dNTP) y un dideoxinucleótido trifosfato (ddNTP) (Dale y Von Schantz 2002).

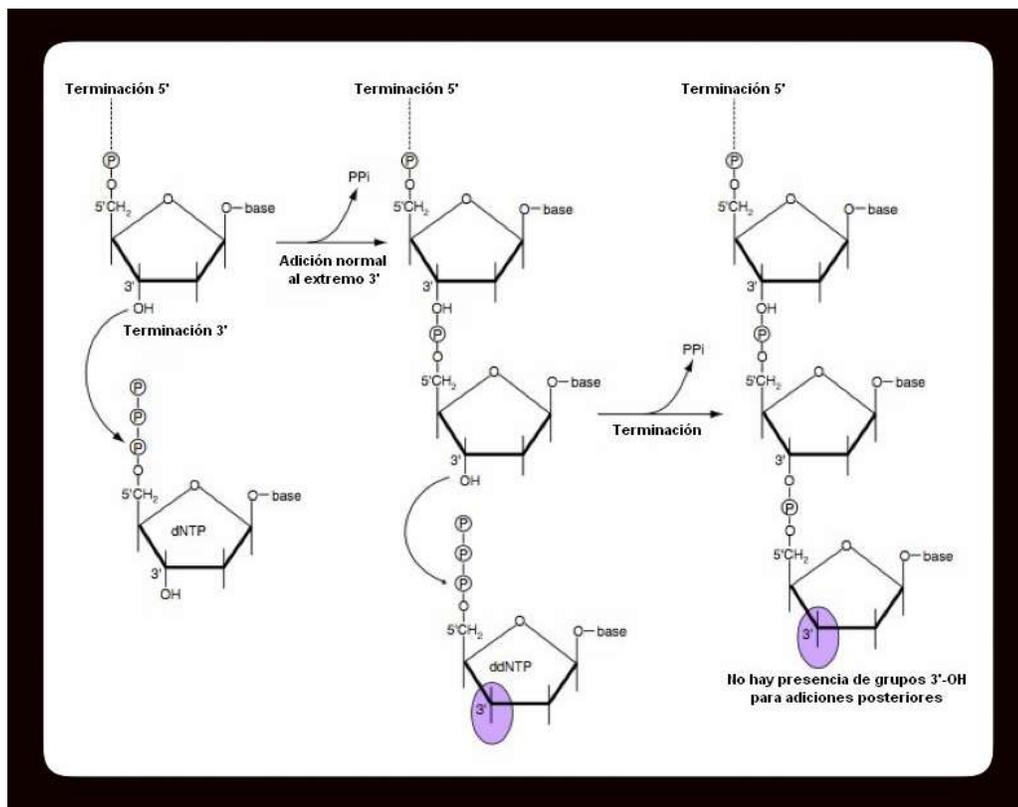


Figura 4. Terminación de la síntesis de ADN mediante un ddNTP (Dale y Von Schantz 2002).

Por ejemplo, si en una reacción se agrega además de la mezcla de moléculas de dNTP una molécula de didesoxiadenina trifosfato (ddATP) con fósforo marcado radiactivamente, cuando aparezca el primer residuo de timina en la cadena, unas cuantas moléculas del nuevo ADN formado tendrán el ddA añadido y por tanto la síntesis de estas moléculas se detendrá, pero la mayoría de las nuevas moléculas de ADN tendrán el residuo de adenina normal, lo que permitirá que la síntesis continúe. Cuando aparezca el segundo residuo de Timina ocurrirá una situación similar: se detiene la síntesis en algunas moléculas, y en algunas otras continúa. Al final de la reacción, se obtiene una serie de moléculas de distintas longitudes, cada una terminada con un residuo de ddA marcado. Estas moléculas pueden ser separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida que permite diferenciar entre moléculas con una sola base de diferencia. De esta manera se tienen diferentes bandas en el gel, correspondientes a las posiciones de los residuos de adenina en la nueva cadena (o timina en el gen a secuenciar). En el método de Sanger, se emplea un set de cuatro reacciones, agregando en cada una un ddNTP distinto, obteniéndose al final un set de 4 corridas en el gel. Después, el gel se revela con ayuda de rayos X y la secuencia se obtiene leyendo las 4 bandas reveladas en el gel (Véase la Figura 5) (Dale y Von Schantz 2002).

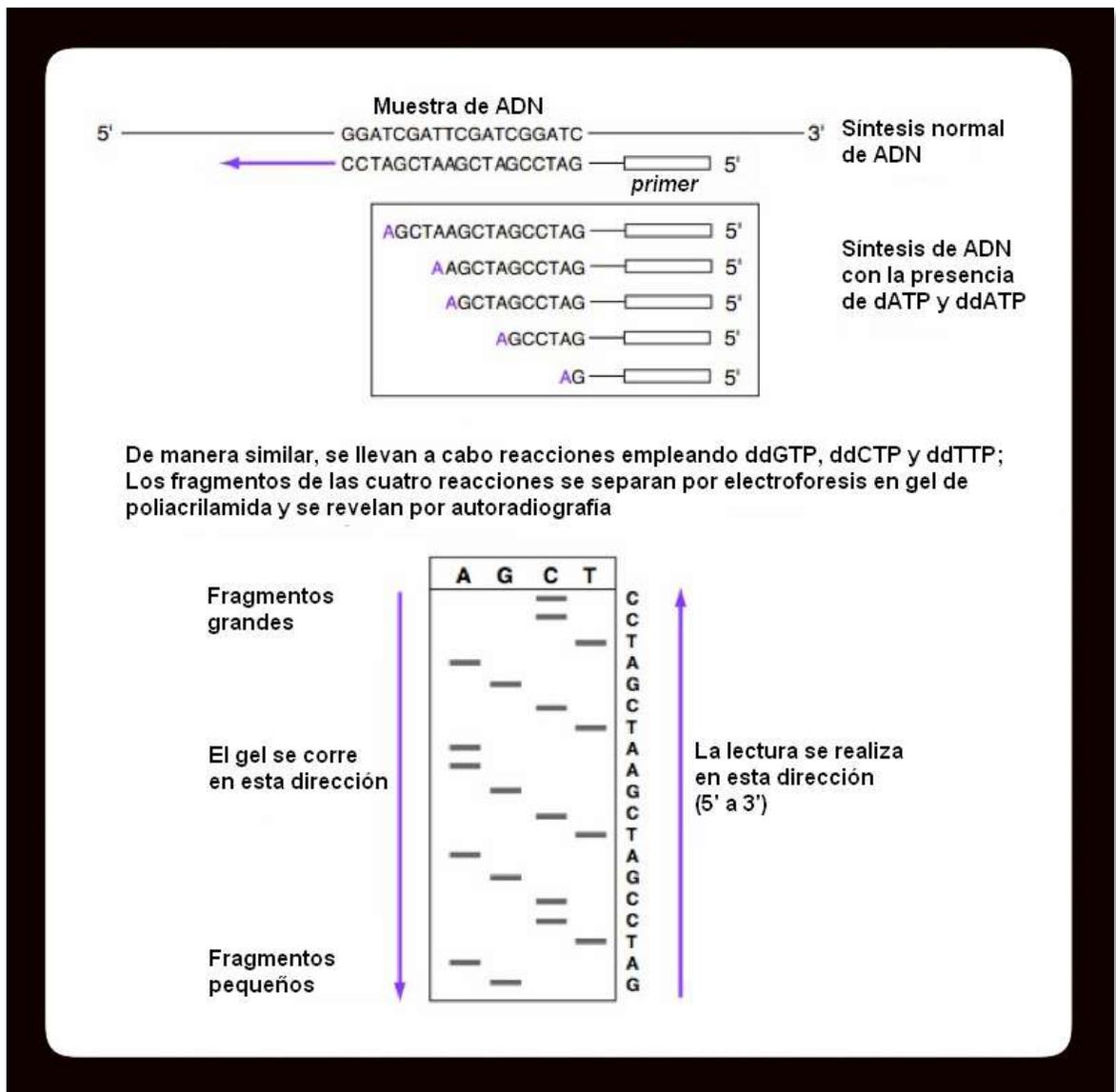


Figura 5. Determinación de la secuencia del ADN (Dale y Von Schantz 2002).

Aunque actualmente la secuenciación se lleva a cabo de manera automatizada, el fundamento de la técnica es la misma.

2.4.2.3. Análisis y comparación de la secuencia. Finalmente la secuencia obtenida se compara contra un banco de datos. Se recomienda la utilización de más

de uno de estos para comprobar si conducen al mismo resultado. Finalmente, se puede construir un árbol filogenético que representará de manera esquemática el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas.

Como resultado de la técnica se obtiene el grado de similitud entre la secuencia de la bacteria analizada y la bacteria reportada en el banco de datos. Esta información permite establecer la relación evolutiva de la bacteria de estudio, y además permite reflejar gráficamente la genealogía molecular de ésta (Campbell y Farrell 2004).

2.5. Inoculantes de *B. licheniformis*

Un inoculante, o producto biofertilizante, es una formulación que contiene una o más cepas microbianas contenidas en un material llamado acarreador, el cual puede ser una biomolécula o un sustrato sintético. El material acarreador es usado para hacer llegar el biofertilizante a la planta viva en estado viable (Yoav Bashan et al. 2004). En la literatura existen escasos reportes acerca de la formulación y empleo de inoculantes de *B. licheniformis* para mejorar el rendimiento y el crecimiento de plantas de cultivo. Lim y Kim (2009) y Lim et al. (2009) formularon un inoculante a base de esporas termo-resistentes de *B. licheniformis* y *B. subtilis* que se empleó para promover el crecimiento de chiles rojos y jitomate, además de suprimir el crecimiento del patógeno *P. capsici*. El crecimiento vegetativo se indujo en un fermentador de 8 L con ácido dipicolínico y cloruro de calcio. Estos investigadores reportaron que la aplicación del inoculante en las plantas de chile y

jitomate causó un incremento del 20% del sistema radicular y del tamaño de las hojas.

Brdar-Jokanovic et al. (2011) evaluaron la efectividad biofertilizante en cultivos de cebolla de un inoculante llamado “Slavol” producido por la industria Agrounik d.o.o. Este producto está compuesto por *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Azotobacter chorocoocum*, *Azotobacter vinelandi* y *Derxia* sp. Los parámetros que se midieron fueron el rendimiento, el peso y número de bulbos por parcela en cinco cultivos de cebolla. El rendimiento de las parcelas no fertilizadas, las tratadas con abono y biofertilizante, obtuvieron un rendimiento (kg/parcela) del 24.3, 25.3 y 48.8% respecto al rendimiento del control con 100% del fertilizante NPK (Nitrógeno-Fósforo-Potasio), respectivamente. El uso del inoculante bacteriano elevó el peso de los bulbos de cebolla en un 55.1% respecto al control fertilizado con NPK.

Domenech et al. (2006) emplearon un producto llamado “LS213” manufacturado por la empresa Gustafson Inc., que contiene esporas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Este inoculante se evaluó como parte de una mezcla con *B. licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Chryseobacterium balustinum*, con el objetivo de evaluar el posible efecto sinérgico entre todas las bacterias en el crecimiento de chile y jitomate, y su capacidad para prevenir infección por *Fusarium* y *Rhizoctonia*.

Chung et al. (2010) diseñaron un inoculante a base de esporas de *B. licheniformis* y *B. subtilis* para su aplicación en cultivos de chile. Los autores emplearon un acarreador de zeolita que permitió la supervivencia de ambas bacterias a 45 °C hasta por 60 días. Las dos especies de *Bacillus* colonizaron la

rizósfera del chile por 15 días (10^8 UFC/g). Los autores reportaron un incremento de 20% en el crecimiento del cultivo, en términos de la longitud de las raíces, la altura y peso de la planta, comparado contra el tratamiento sin inoculante. Además, de acuerdo a estas investigaciones, el inoculante inhibió por completo el crecimiento del patógeno *Phytophthora* en las plantas de chile.

2.6. Producción a gran escala

El uso comercial a gran escala de los inoculantes de *B. licheniformis* requiere de una cantidad considerable de biomasa para asegurar la colonización suficiente de la rizósfera de la planta. La elaboración de productos sustentables a nivel semi-industrial e industrial requiere el uso de materiales económicos y que provean los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Debido a esto, no se pueden usar de manera factible medios de cultivo sintéticos (bien definidos) como se hace a nivel laboratorio. Es necesario buscar fuentes de carbono y nitrógeno económicas, siendo los desechos agroindustriales un área de grandes oportunidades en este campo. Con esto, no solo se promueve la eliminación adecuada de los sub-productos de manera efectiva y sin provocar contaminación, sino que a su vez se generan productos de valor agregado alto. Esto último se considera un proceso de desarrollo sustentable. El desecho agroindustrial empleado en la presente investigación es la melaza de azúcar, que proviene de la industria azucarera. Una vez evaluada la eficiencia de la producción de biomasa de

B. licheniformis a partir de melazas de caña de azúcar, es posible pasar a la producción de biofertilizantes a escala piloto mediante el uso de biorreactores.

2.6.1. Melazas como sustrato autosustentable. Según la NMX-Y-327-1998-SCFI, la melaza de caña de azúcar es el coproducto de la fabricación del azúcar en sus diferentes calidades, siendo un líquido denso y viscoso del cual no se pueden cristalizar más azúcares mediante los métodos convencionales. Debe contener una humedad de 17-25%, un porcentaje máximo de cenizas de 11% y 85 °Brix a 20 °C.

Las melazas son ricas en azúcares reductores y aproximadamente el 60% de los sólidos presentes está compuesto de sacarosa, glucosa y fructosa, además de otras sustancias de origen orgánico como aminoácidos, ácidos carboxílicos, alifáticos y olefinicos, vitaminas, proteínas y fenoles, entre otros. También existe una fracción de origen mineral de gran importancia en la que se encuentran más de 20 metales y no metales en distintas proporciones (Aguilar Rivera et al. 2010). La composición aproximada de las melazas se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición promedio de las melazas de caña**(Murtagh 1999; Gálvez 1990).**

COMPONENTE	VALOR	COMPONENTE	VALOR
Agua (%)	20.5	Cloruros (Cl ⁻¹) (%)	1.4
°Brix	79.5	Fósforo (P ₂ O ₃) (%)	0.08
Sólidos totales (%)	75.0	Sodio (%)	2.4
Densidad (gL ⁻¹)	1.41	Silicio (%)	0.2
Azúcares totales (%)	46.0	Cobre (mg/kg)	36
Sacarosa (%)	28.0	Hierro (mg/kg)	249
Glucosa (%)	9.3	Manganeso (mg/kg)	35
Proteína cruda (%)	3.0	Zinc (mg/kg)	13
Nitrogeno (N ₂)	0.35	Biotina (mg/kg)	0.36
Cenizas (%)	8.1	Colina (mg/kg)	745
Gomas y coloides (%)	8.9	Ác. Pantoténico (mg/kg)	21
Aminoácidos (%)	0.95	Riboflavina (mg/kg)	1.8
Azufre (%)	0.5	Tiamina (mg/kg)	0.9
Calcio (%)	0.8		

No obstante, la composición precisa de las melazas es muy variable, pues depende de factores agrícolas e industriales, así como de la variedad de la planta, grado de madurez, clima, condiciones de cultivo, tipo de corte, eficiencia industrial, entre otros. (Aguilar Rivera et al. 2010).

En los últimos años, el precio de la melaza de caña ha mostrado una tendencia creciente. En 2010, Oaxaca produjo alrededor de 40-79 toneladas de melazas (Financiera Rural 2011).

2.6.1.1. Usos comunes de las melazas de caña de azúcar. En el mercado internacional, las melazas de caña tienen cuatro destinos básicos: alimento animal, producción de etanol, reprocesamiento industrial para extraer los azúcares contenidos en ella y procesos biotecnológicos industriales como la producción de levadura, ácido cítrico, lisina entre otros (Financiera Rural, 2011).

Existen diversos reportes en la literatura acerca de la utilización de melazas para la producción de biomasa de algunos microorganismos, principalmente levaduras (Fernández-López et al. 2012; Fajardo Castillo y Sarmiento Forero 2007; Ariza y González 1997; Echegaray et al. 2000; Skountzou et al. 2003; Shima et al. 2005; Vu y Kim 2009). Sin embargo, no existen reportes en la literatura acerca de la producción de *B. licheniformis* empleando melazas como sustrato principal.

2.6.2. Análisis del consumo del sustrato. Antes de pasar el proceso de producción de biomasa a una etapa de reactor, es necesario evaluar primero si la cepa de estudio es capaz de utilizar este sustrato para su crecimiento. En segundo lugar, es importante estudiar el proceso de consumo de sustratos y crecimiento de la bacteria para tener un mayor control sobre la producción de biomasa. Por esta razón resulta fundamental el empleo de algunas técnicas de análisis para el monitoreo del consumo del sustrato por parte de *B. licheniformis* tales como la cromatografía de líquidos de alta resolución, colorimetría y determinación de azúcares reductores.

2.6.2.1. HPLC. Para el análisis de carbohidratos, inicialmente se emplearon columnas de sílice enlazada a grupos amino. Desafortunadamente los grupos

amino reaccionaban con los azúcares reductores obteniéndose resultados erróneos (Kort 1980). En 1987, el instituto de investigación sobre la molienda de azúcar (SMRI, por sus siglas en inglés: Sugar Milling Research Institute), adquirió un sistema de HPLC para separar los carbohidratos, empleando columnas de intercambio de cationes de sodio o de calcio. Estas columnas tienen la ventaja de que la fase móvil puede ser incluso agua, y por lo tanto las separaciones se llevan a cabo de manera efectiva y más económica (Day-Lewis 1989). Para la determinación de azúcares, generalmente se utiliza un detector de índice de refracción. A pesar de que este detector es de sensibilidad baja, puede ser muy útil para analitos no iónicos, que no absorban en el UV y que no tengan la propiedad de fluorescencia.

El detector de índice de refracción contiene una celda que a su vez posee dos compartimentos triangulares de 5-10 μL de capacidad, a través de los cuales pasa el disolvente puro o la muestra que sale de la columna. Existen diversos diseños de celdas, sin embargo todos se basan en la diferencia entre el índice de refracción del disolvente puro y el del disolvente más el soluto (Harris 2007).

2.6.2.2. Colorimetría. Se puede llevar a cabo un estudio sobre la evolución del color del medio durante el crecimiento de *B. licheniformis* en el medio, utilizando la colorimetría. La instrumentación para la medida del color es muy extensa y variada, sin embargo el fundamento es prácticamente el mismo. Para el examen de color, en este trabajo se emplea un colorímetro UltraScan VIS de HunterLab. Este equipo es un espectrofotómetro con una lámpara dual de xenón, que emplea un rango de longitud de onda de 350 a 1050 nm con una resolución de 5 nm que mide el color mediante reflectancia o transmitancia. Emplea también un iluminante D65

(luz de día) y un ángulo de observación de 8° . Los parámetros triestímulo se obtienen empleando funciones de respuesta espectral directamente proporcionales a los coeficientes de distribución (funciones de igualación de color) correspondientes al observador colorimétrico estándar de la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE, por sus siglas en francés), que es la Comisión Internacional de la Iluminación (Perea et al. 2002). El CIELab es un modelo cromático que se emplea para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano en una escala normalizada. Este sistema está basado en la medición de tres parámetros, el L^* , a^* y b^* . El valor L^* representa la luminosidad y los cambios desde 0 (negro) a 100 (blanco). El valor a^* indica el cambio de $-a$ (verde) a $+a$ (rojo), mientras que el valor b^* define los cambios de $-b$ (azul) a $+b$ (amarillo). Los valores de estos dos parámetros van de -120 a +120 (Sahin y Gülüm Sumnu 2006; Muñoz 2011). El espacio CIELab permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional, tal como se muestra en a Figura 6 (Muñoz 2011).



Figura 6. Parámetros de medición de color CIELab.

2.6.2.3. Determinación de azúcares totales por el método de Dubois.

Esta es una técnica espectrofotométrica para la determinación de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos, y sus derivados, incluyendo sus metil-ésteres con grupos reductores libres o potencialmente libres. Este método fue propuesto por Dubois et al. en 1956. El fundamento es el siguiente: los azúcares en medio ácido son hidrolizados y deshidratados a reactivos intermediarios que, en presencia de fenol, forman un complejo aromático de un color naranja-amarillo que alcanza su máximo de absorción a 490 nm (Figura 7). La cantidad de azúcar presente en la muestra se determina usando un espectrofotómetro y mediante la interpolación en una curva de calibración.

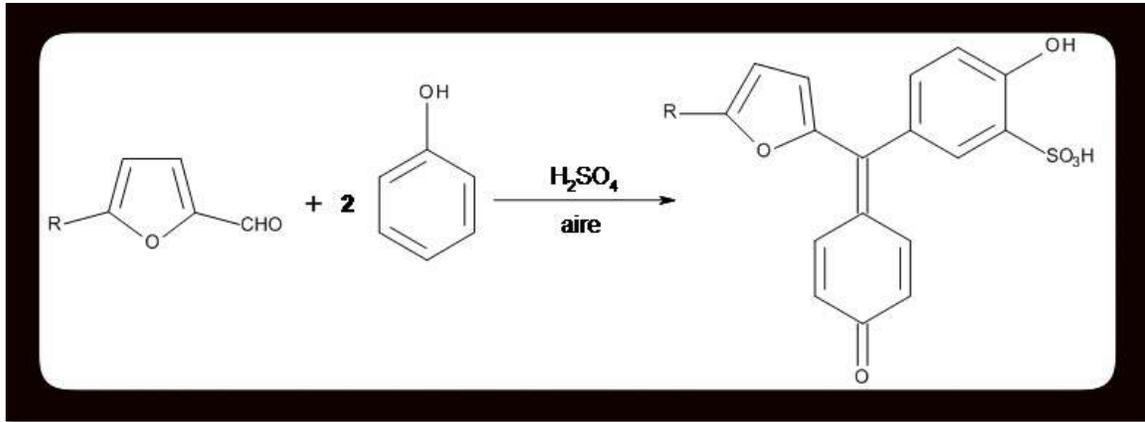


Figura 7. Complejo generado a partir de la reacción de Dubois (Mikkelsen y Cortón 2004).

2.6.2.4. Cinética de crecimiento microbiano en un cultivo en lote. Para llevar a cabo un análisis adecuado acerca de la relación entre el consumo de sustrato y la producción de biomasa, resulta fundamental conocer la cinética de crecimiento microbiano.

Un cultivo en lote es un sistema cerrado sin entradas ni salidas, con un volumen fijo de medio de cultivo. El inóculo se transfiere a este volumen y entonces los microorganismos crecen y se replican gradualmente. Conforme ocurre el crecimiento de biomasa el sustrato se agota y se forman diversos productos. El crecimiento microbiano se determina por el peso seco de células (en g/L), mediante densidad óptica (DO) que es la absorbancia definida a determinada longitud de onda o bien en UFC/L (Najafpour 2007).

En la Figura 8 se muestra una curva de crecimiento bacteriano típica, la cual se divide en tres etapas principales: (1) La fase *Lag* o de latencia es un periodo durante el cual las células se ajustan fisiológicamente al medio. La duración de esta

etapa depende del tamaño del inóculo. (2) La fase exponencial, donde la población crece logarítmicamente con el tiempo si los nutrientes del medio están presentes en exceso. Conforme la población crece, los nutrientes son utilizados y se producen compuestos inhibitorios, como ácidos y toxinas. El cambio en la composición del medio y el agotamiento del sustrato resulta pronto en la muerte de algunas células. (3) La fase estacionaria, en la que la velocidad de crecimiento de los organismos es igual a la velocidad de muerte. El resultado neto es una población constante. (4) La fase de muerte, en la cual la velocidad de muerte rebasa la velocidad de crecimiento y la población decrece a velocidad exponencial (Okafor 2007; Najafpour 2007).



Figura 8. Fases de la cinética de crecimiento microbiano en un cultivo por lote (Najafpour, 2007).

Durante el cultivo en lote, se pueden monitorear los siguientes parámetros: biomasa, productos del metabolismo, inhibición, pH, temperatura y concentración

de sustratos. A continuación se definen algunos parámetros para evaluar la productividad del microorganismo en un cultivo por lote (Bailey y Ollis 1986). El porcentaje de consumo de sustrato se define como:

$$\text{Consumo de sustrato} = \frac{S_0 - S_F}{S_0} \times 100\% \quad (1)$$

Donde S_0 es la concentración de sustrato al tiempo inicial de incubación y S_F es la concentración de sustrato al final de incubación. Otro parámetro importante para caracterizar la cinética de cultivo microbiano es el rendimiento celular, definido por:

$$y_{x/s} = \frac{X}{S_0 - S_F} \quad (2)$$

Donde $y_{x/s}$ es el rendimiento celular y X es igual a la cantidad de biomasa producida.

La velocidad de producción de biomasa de un microorganismo se define como:

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

2.7. Implicaciones de la investigación bibliográfica

A partir de la investigación realizada, se pudieron encontrar algunos vacíos en el conocimiento técnico-científico del área de producción de biofertilizantes a partir de *B. licheniformis*. A continuación se describen estos puntos de manera sintetizada:

- No existen investigaciones reportadas que aborden la posibilidad del consumo de melazas de caña de azúcar por parte de *B. licheniformis* y la optimización de la producción de biomasa mediante la adaptación de la cepa a concentraciones cada vez mayores de este sustrato.
- No hay reportes científicos en los cuales se reporte el uso único de *B. licheniformis* como biofertilizante en cultivos agrícolas.
- Los trabajos revisados, no se dirigen estratégicamente al establecimiento de procesos sustentables, como es el caso de la utilización de residuos agroindustriales para la producción de biofertilizantes.
- Los estudios convencionales de biofertilizantes, consideran que estos materiales son capaces de sustituir completamente el uso de fertilizantes químicos. Esta premisa no está bien argumentada científicamente, puesto que el biofertilizante requiere que el suelo de la planta reciba la nutrición mínima necesaria para su crecimiento.

En este proyecto se planteó el aislamiento de una cepa de *B. licheniformis* capaz de fijar nitrógeno atmosférico y se evaluó su crecimiento en un medio enriquecido con

melazas de caña de azúcar. Asimismo, se planteó adaptar la cepa a la concentración más elevada posible de melazas para optimizar su producción de biomasa. Finalmente, el proyecto abordó la utilización de *B. licheniformis* como inoculante para su evaluación en el crecimiento de maíz. El empleo de maíz como cultivo de estudio se basó en las siguientes razones:

- El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, en diversos aspectos como el alimentario, el industrial, el político y el social.
- Con este proyecto, también se responde a una demanda de la Secretaría de Agricultura, a través del fondo mixto Conacyt-Estado de Oaxaca.

Finalmente, en esta tesis se propone un estudio en el que se evalúan distintos niveles de fertilización química en combinación con el biofertilizante, para poder determinar en qué porcentaje el uso del biofertilizante puede reducir la cantidad necesaria de fertilizante químico.

Esto permitirá establecer las bases de un proceso biotecnológico que permitirá la producción y uso de los biofertilizantes como una alternativa viable para mejorar el rendimiento de los cultivos de manera efectiva y económica. El empleo de estos biofertilizantes podrá ayudar a restablecer el equilibrio químico y biológico del suelo. Con el seguimiento y consolidación de este proyecto, se podrá ayudar al desarrollo agronómico y económico del Estado de Oaxaca.

3. ORIGINALIDAD

No existe un estudio que aborde la utilización de melazas de caña de azúcar como sustrato para la producción de biomasa de *B. licheniformis*, así como su adaptación a concentraciones cada vez mayores de este residuo agroindustrial. Tampoco se ha reportado el estudio en campo de la inoculación de cultivos agrícolas con *B. licheniformis*. Este trabajo abordó por primera vez la aplicación de biofertilizantes en la Región Mixteca del Estado de Oaxaca. Finalmente, en este trabajo se estudiaron por primera vez los efectos combinados del biofertilizante con distintas dosis de la fertilización química recomendada para la región Mixteca. Con este estudio se estableció la relación de fertilizante químico/biofertilizante necesaria para obtener un rendimiento del cultivo similar al del tratamiento químico.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Producir biofertilizante a escala piloto, empleando un biorreactor de 3 L, a partir de una cepa de *B. licheniformis*, y su aplicación como inoculante para el cultivo de maíz.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar la cepa de *B. licheniformis* a partir de una muestra de suelo.
2. Evaluar el crecimiento de *B. licheniformis* en un medio enriquecido con melazas de caña de azúcar y lograr su adaptación al medio.
3. Producir inoculantes a partir de *B. licheniformis* a una escala piloto de 3 L.
4. Evaluar el efecto de los inoculantes en cultivos de maíz en combinación con diferentes dosis de fertilizante químico.

5. METAS

Meta 1. Aislamiento, tipificación y conservación de *B. licheniformis*.

Meta 2. Adaptación de *B. licheniformis* a un medio enriquecido con melazas.

Meta 3. Producción de inoculantes a escala piloto de 3 L.

Meta 4. Evaluación del inoculante en cultivos de maíz.

6. METODOLOGÍA

6.1. Meta 1. Aislamiento y conservación de la cepa

Con base en la literatura revisada, en la cual se reportan cepas de *B. licheniformis* capaces de fijar nitrógeno atmosférico, y tomando en cuenta (también con base en el Estado del Arte) que este microorganismo es capaz de adaptarse a distintos nichos, redirigiendo su metabolismo para utilizar distintos sustratos, se planteó el aislamiento de una cepa capaz de fijar nitrógeno atmosférico para después, adaptarla a un medio enriquecido de melazas, para la producción de biomasa.

6.1.1. Material Biológico. Se partió de una muestra de suelo rizosférico, proporcionada por el Doctor Roberto Quintero Lizaola del Instituto de Recursos Naturales del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, constituida por una mezcla de microorganismos capaces de fijar nitrógeno.

6.1.2. Medios de cultivo

6.1.2.1. Medio ATCC: 838. Este es un medio creado por la ATCC (American Type Culture Collection) para microorganismos fijadores de nitrógeno. El medio se preparó de la siguiente manera: en 1 L de agua destilada se suspendieron: 0.4 g de KH_2PO_4 , 0.1 g de K_2HPO_4 , 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de NaCl , 0.02 g de CaCl_2 , 0.01 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g de malato de sodio y 0.05 g de extracto de levadura. El pH del medio se ajustó a 7.2-7.4 y se esterilizó durante 15 min a 121 °C.

6.1.2.2. Medio NFb-RC. Se empleó una modificación del medio propuesto por Rodríguez-Cáceres (1982) para aislar microorganismos fijadores de nitrógeno que además sean capaces de generar colonias pigmentadas de rojo escarlata mediante la utilización del colorante Rojo Congo.

Primero se preparó una solución salina con las sales formuladas en baja concentración para facilitar la manipulación y preparación del medio. La solución salina se preparó de acuerdo a la siguiente formulación: en 1 L de agua destilada se suspendieron 5 g de K_2HPO_4 , 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de NaCl , y 0.15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. El cloruro férrico se disolvió previamente con la adición de dos gotas de HCl 0.1 M, para lograr su disolución.

Una vez preparada la solución salina, el medio NFb-RC se preparó de la siguiente manera: se suspendieron en 900 mL de agua destilada 5 g de ácido DL-málico, 4.8 g de KOH , 0.5 g de extracto de levadura, 20 g de agar y 100 mL de la solución salina. El pH se ajustó a 7.0 con KOH 0.1 N y el medio se esterilizó a 121 °C por 20 min. Antes de servir en las cajas Petri, se agregaron asépticamente 15 mL

de una solución acuosa 1:400 de Rojo Congo (previamente esterilizada). Para el empleo del medio NFb-RC líquido se evitó el uso del agar.

6.1.2.3. Medio Luria-Bertani (LB). Este es un medio general, enriquecido para el crecimiento de bacterias. Para la preparación de este medio se emplearon dos formulaciones distintas:

Medio LB-P (Puerta y Ureña 2005): En 1 L de agua destilada se suspendieron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7.0-7.2 y se esterilizó durante 20 min a 121 °C.

Medio LB-T (Tilak et al. 2010): En 1 L de agua destilada se suspendieron 5 g de peptona de caseína, 3 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7.0-7.2 y se esterilizó durante 20 min a 121 °C.

Cuando se requirió emplear el medio en forma sólida, se agregó a la mezcla 15 g de agar.

6.1.2.3.1. Medio Luria Bertani-Rojo Congo (LB-RC). Este medio es una modificación del medio de Tilak y colaboradores (2010). Se empleó para identificar las colonias de *B. licheniformis* en un medio rico de nutrimentos en el que pueden crecer algunos otros microorganismos. La variante en la formulación fue la adición de 15 mL de una solución acuosa 1:400 de Rojo Congo (previamente esterilizada) después de la esterilización.

6.1.2.4. Medio Mota-Valadez (MMV). Este medio se empleó para el crecimiento de *B. licheniformis* usando melazas de caña de azúcar como fuente de carbono.

Primero se preparó una solución salina tal y como se describe en el punto 6.1.2.2. Una vez lista esta solución, la preparación del medio se realizó de la siguiente manera: en 800 mL de agua destilada se disolvió $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ considerando una relación carbono/nitrógeno de 3.9 respecto a la fuente de carbono (melaza) y se agregaron 100 mL de la solución salina. Por otro lado, se preparó una solución de melazas disolviendo una cantidad determinada de melazas en 50 mL de agua destilada y aforando a 100 mL. Las dos soluciones se esterilizaron por separado durante 20 min a 121 °C, se dejaron enfriar, y posteriormente se mezclaron. Cuando se requirió emplear el medio MMV de manera sólida, se agregaron a la solución salina 15 g de agar.

6.1.3. Proceso de aislamiento y conservación de *B. licheniformis*. Para el aislamiento de *B. licheniformis* a partir de la mezcla inicial de microorganismos, se estriaron asadas de la muestra rizosférica en cuñas de agar ATCC:838 y se incubaron a 37 °C. El crecimiento en el medio ATCC:838 es excesivamente lento, por lo que la aparición de las colonias tardó incluso más de 2 semanas. Posteriormente se resembró este cultivo en medio LB líquido a 37 °C para su enriquecimiento y después se reinocularon estas bacterias en medio líquido ATCC. Después de esto, se empleó el medio NFb-RC para aislar a *B. licheniformis* de la mezcla de microorganismos fijadores de nitrógeno obtenida.

A partir de este cultivo se procedió al aislamiento de *B. licheniformis*. Se inoculó una asada de la mezcla microbiana en cajas Petri conteniendo medio NFb-RC y estas se incubaron a 37 °C durante 96 h. Las colonias que selectivamente se pigmentaron de color rojo escarlata, se resembraron en medio LB líquido (Puerta y Ureña 2005) y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Después de la incubación, el cultivo se observó al microscopio empleando una magnificación de 1000x para observar la constitución celular de las colonias aisladas. Al cabo de tres ciclos de resiembras se obtuvo un cultivo de *B. licheniformis* completamente puro. La cepa pura se resembró en medio LB-RC sólido en cajas Petri de plástico y se conservó a -20 °C.

6.1.4. Identificación genética de la cepa aislada. Se empleó la técnica de comparación del ADNr 16S para la identificación genética de la cepa aislada. Esta identificación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y en el Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.1.4.1. Extracción de ADN cromosomal. Se empleó el kit de extracción Ultra Clean™ – Microbial DNA isolation kit (MO BIO Laboratories Inc., USA). En un tubo colector de 2 mL se colocó la mitad del crecimiento de una caja de medio LB-RC con abundante crecimiento de la cepa. Las bacterias se resuspendieron con 300 µL de solución MicroBead y se agitaron en un vórtex durante aproximadamente 30 s. Esta solución contiene un buffer y sales que ayudan a estabilizar y dispersar homogéneamente las bacterias previo a la lisis celular. Después de esto, la mezcla

se transfirió a un tubo MicroBead y se agregaron 50 μL de solución MD1. La solución MD1 contiene un detergente aniónico, SDS, que rompe ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana celular de los microorganismos. Luego, se agitó el tubo MicroBead en el vórtex durante 10 min a la velocidad máxima, tratando de colocarlo de manera horizontal para asegurar una lisis adecuada de las células. Durante la agitación, se crean las condiciones químico-mecánicas para promover la lisis celular y liberar los ácidos nucleicos de las células.

El tubo se centrifugó a 10000 x g durante 30 s a temperatura ambiente. Con este proceso, se hace que los restos celulares se depositen en el fondo del tubo, mientras que el ADN permanece en el sobrenadante. El sobrenadante se transfirió a un tubo colector limpio de 2 mL. Después de esto, se agregaron 100 μL de solución MD2 al tubo colector y se agitó en vórtex durante 5 s. Posteriormente, el tubo se incubó a 4 °C durante 5 min. La solución MD2 contiene un reactivo que promueve la precipitación del material orgánico e inorgánico distinto al ADN, incluyendo restos celulares y proteínas.

Después de la incubación, el tubo se centrifugó a 10000 x g por 1 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a un segundo tubo colector, evitando decantar el *pellet* formado. Dado que el *pellet* contiene materiales orgánicos e inorgánicos distintos al ADN, es importante evitar decantarlo junto con el sobrenadante.

Posteriormente, se agregaron 900 μL de solución MD3 al sobrenadante y se agitó en un vórtex durante 5 s. El líquido MD3 consiste de una solución salina altamente concentrada que causa que el ADN se retenga en los filtros de membrana (“*Spin filter membrane*”). Después de esto, se vertieron 700 μL de la mezcla del

sobrenadante y la solución MD3 en el filtro de membrana y se centrifugó a 10000 x g durante 1 min, a temperatura ambiente. El permeado se desechó y el resto de la mezcla se vertió para volver a centrifugar. Esto hace que el ADN se una selectivamente a la membrana de sílica del filtro.

Subsecuentemente, se agregaron 300 μ L de la solución MD4 al filtro de membrana. El permeado se centrifugó a 10000 x g por 30 s a temperatura ambiente. La solución MD4 contiene etanol que sirve para limpiar el ADN retenido en la membrana, removiendo residuos de sal y otros contaminantes. Se desechó el sobrenadante que contenía los contaminantes arrastrados. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 10000 x g durante 30 s a temperatura ambiente para remover los restos de la solución MD4 del filtro de membrana. El filtro de membrana se colocó nuevamente en un tubo colector de 2 mL, y se le agregaron 50 μ L de la solución MD5 en el centro. La solución MD5 es un buffer de Tris 10 mM con pH de 8 que ayuda a la remoción del ADN de la membrana del filtro. El tubo se centrifugó a 10000 x g durante 30 s. Este último paso ayuda a la remoción del ADN de la membrana, el cual fluye hacia el tubo colector. Finalmente, se desechó el filtro del tubo colector y se obtuvo el ADN cromosomal en 50 μ L de solución buffer.

6.1.4.2. Electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 1% disolviendo 1 g de agarosa en 100 mL de buffer TBE de electroforesis. La mezcla se calentó en un horno de microondas a temperatura alta durante 1 min o hasta la disolución total de la agarosa. Después de un ligero enfriamiento, se tomaron 40 mL de este gel y a este se le agregaron 4 μ L de bromuro de etidio, para su revelado. Luego, en la cubeta de electroforesis se colocó la peineta que forma los pocillos para

la muestra y se colocaron los soportes o topes. Posteriormente se vertió el gel y se dejó gelificar durante 15 min (Figura 9). Una vez obtenido el gel, se retiraron los topes, la peineta y se agregó buffer TBE a la cubeta hasta cubrir el gel. Para cargar los pozos, se utilizó un trozo de *parafilm* sobre el cual se depositaron 3 μL de la muestra y se mezclaron con 5 μL de colorante de carga. La mezcla se depositó sobre el pocillo del gel.

Por otra parte, para calcular el tamaño aproximado del ADN analizado, en un pocillo se cargó la mezcla de 5 μL del colorante de carga con 1 μL del marcador de peso molecular (GeneRuler™ de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, USA) que está compuesto por fragmentos de ADN de peso conocido. Posteriormente, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se corrió la electroforesis a 100 V durante 40 min aproximadamente, o hasta que el frente de colorante alcanzó las dos terceras partes del gel. Para el revelado del gel se empleó un fotodocumentador BIO-RAD Molecular Imager Gel Doc™ XR + Imaging System. El gel se retiró cuidadosamente con el uso de guantes de látex y se colocó en la cámara de revelado del equipo. Las bandas de la muestra se comparan contra el patrón de bandeado del marcador (Figura 10).

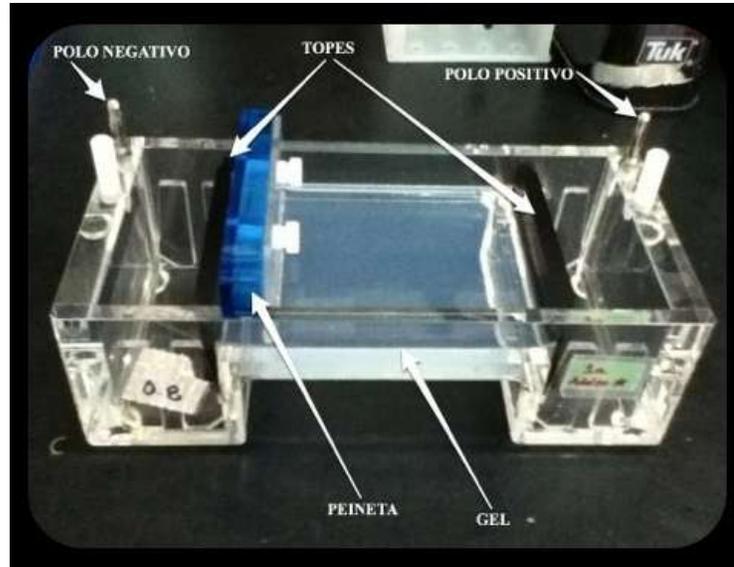


Figura 9. Preparación del sistema de electroforesis.

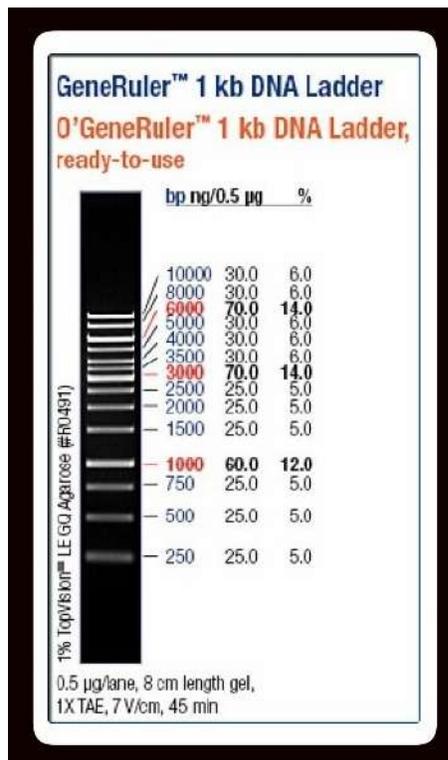


Figura 10. Marcador de referencia con patrón de bandeos.

La electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para evaluar si el proceso de purificación o de amplificación del ADN se llevó a cabo de la manera correcta.

6.1.4.3. Amplificación del gen ADNr 16s por PCR. La mezcla de reacción se preparó usando la enzima Taq DNA Polimerasa (recombinante) #EPO404 LC, 500 u (Fermentas, USA). La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4. Mezcla de reacción para
PCR.**

Reactivo	Cantidad (μL)
10X <i>Taq</i> Buffer	5
dNTP Mix	1
Forward <i>primer</i> (Fw)	0.6
Reverse <i>primer</i> (Rv)	0.6
MgCl ₂	4
<i>Taq</i> DNA Polimerasa	1.25
H ₂ O	36.55
Muestra de ADN	1
Volumen total	50

En base a la tabla 4 se prepararon reacciones de 25 μ L en tubos Eppendorf de paredes delgadas. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó un termociclador Bio-Rad C1000 (Figura 11) que es un equipo especializado para proveer las condiciones adecuadas de cada una de las tres fases de la reacción de PCR (Sección

2.4.2.1). En este equipo se programaron las temperaturas y el número de ciclos necesarios para lograr la amplificación deseada. El número de copias a amplificar depende del número de ciclos a los que se someta la reacción de acuerdo a la fórmula: $N = 2^n$; donde n es el número de ciclos y N es el número de copias. Una vez colocados los tubos en el termociclador, se programó el equipo según se muestra en la Figura 12 para obtener el ADNr 16S amplificado.



Figura 11. Termociclador Bio-Rad C1000.

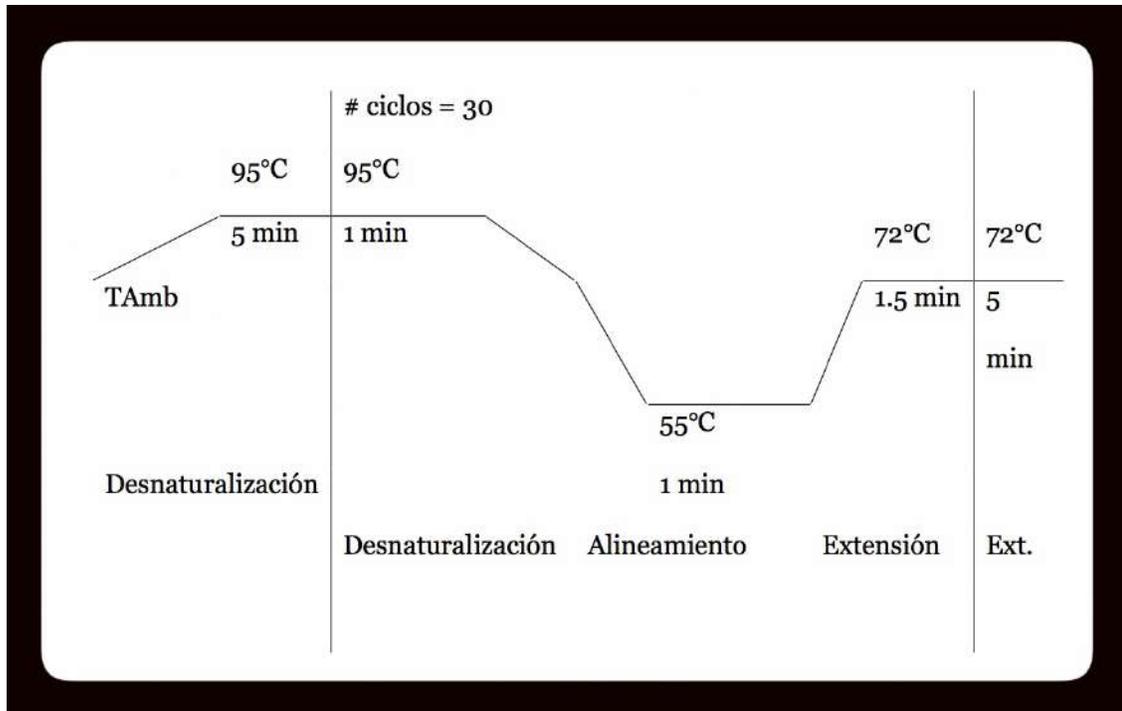


Figura 12. Programa de temperaturas y ciclos para la amplificación del gen ADNr 16S de *B. licheniformis*.

Después de la obtención de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia única de fragmentos de 1.5 Kb (peso del gen ADNr 16S).

6.1.4.4. Digestión enzimática de la muestra. La digestión del gen ADNr 16S de la muestra se emplea para evaluar si distintas muestras de microorganismos pertenecen a una misma especie. Posteriormente se realiza la electroforesis de las muestras digeridas y se observa el patrón de bandeos. Si el patrón de bandeos es el mismo para todas las muestras, el microorganismo analizado es el mismo; si por el

contrario, se observan distintos patrones de bandeo, entonces se tienen especies distintas en cada muestra.

La digestión enzimática se realiza con una enzima de restricción, la cual lleva a cabo la ruptura específica y controlada del ADN. La enzima que se utilizó para la digestión del gen ADNr 16S de *B. licheniformis* fue la HAE III #R0108 (BioLabs Inc., New England). De igual manera que con la enzima *Taq* polimerasa, la enzima *HAE III* requiere de una formulación específica para llevar a cabo la reacción, la cual se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la digestión del gen ADNr 16S.

Reactivo	Cantidad (μL)
Buffer 2 (10X)	2
Enzima HAE III	1
H ₂ O	13
Muestra de ADN	4
Volumen total	20

La mezcla de reacción se realizó de acuerdo a la Tabla 5 en tubos Eppendorf de 0.5 mL y se incubaron a 37 °C durante 2 h. La mezcla digerida se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, debido a que los fragmentos obtenidos son mucho más pequeños que cuando se analiza el ADN cromosomal. La electroforesis se corrió a 70 V durante 40 min.

6.1.4.5. Purificación del gen ADNr 16S. Los productos de la reacción de PCR se purificaron para llevar a cabo la secuenciación del gen. Para esto, se utilizó el kit de purificación GeneJet™ PCR Purification Kit, #KO701 (Fermentas, USA). La metodología de purificación fue la siguiente:

La muestra se mezcló con la solución *Binding buffer* en una relación de volúmenes 1:1. Dado que se tenían 20 µL de productos de PCR, se agregaron 20 µL de la solución y ésta se agitó en vórtex. Después de esto, la solución se transfirió a una columna de purificación GeneJet; se centrifugó durante 1 min a 10000 x g a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Con esto se logró retener el ADN en la columna. Luego, se agregaron a la columna 700 µL del buffer de lavado y se centrifugó a 10000 x g durante 1 min a temperatura ambiente; después de lo cual, se desechó el sobrenadante. Con esto se lavó el ADN retenido en la columna de purificación, limpiándolo de posibles impurezas. Posteriormente, la columna de purificación se colocó sobre un tubo Eppendorf nuevo de 2.5 mL y se agregaron a la columna 50 µL del Buffer de elución. Por último, se centrifugó a 10000 x g durante 1 min a temperatura ambiente y se colectó el sobrenadante que contenía el ADNr 16S purificado.

Previo a la secuenciación, se necesita medir la cantidad de ADN en la muestra purificada. Para medir la concentración de ADN en la muestra purificada se empleó un equipo llamado NanDorop 2000c (Thermo Scientific USA) que es un espectrofotómetro a micro escala (Figura 13). Este equipo muestra la concentración de ADN. El equipo se calibró con 1 µL de agua ultrapura en la lente y se limpió con un paño especial. Posteriormente, se midieron las muestras, aplicando sobre la

lente 1 μL del producto de PCR purificado. La concentración adecuada para llevar a cabo la secuenciación del gen debe ser de 10 ng/100 pb.



Figura 13. NanoDrop empleado para medir la concentración de ADN.

6.1.4.6. Secuenciación del gen ADNr 16S. El proceso de secuenciación se llevó a cabo en el Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Previo a esto, se prepararon dos mezclas de reacción, una con el *primer* Fw y otra con el *primer* Rv. La formulación utilizada se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la secuenciación del gen ADNr 16S.

Reactivo	Cantidad
<i>Primer Fw/Rv</i>	1μL
H ₂ O	7μL
Muestra de ADN	8μL
Volumen total	16μL

6.1.4.7. Comparación de la secuencia obtenida contra una base de datos. A continuación, a partir del método de Sanger se obtuvieron dos secuencias, la Fw y la Rv en dos archivos distintos, los cuales se analizaron en el software *4Peaks* (Nucleobytes, Inc, for MacOSX) para obtener la secuencia en el formato FASTA. Este formato se usa para representar la secuencia usando códigos de una sola letra, obteniéndose así la sucesión de nucleótidos. A partir del formato FASTA de la secuencia Fw y Rv se obtuvo la secuencia completa del gen ADNr 16S en un procesador de texto (Microsoft Office *Word*®), la cual se comparó contra bases de datos disponibles. Se utilizaron dos bases de datos para llevar a cabo la comparación:

1. La base de datos NCBI (Por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information).
2. La base de datos de la RDP (Por sus siglas en inglés, Ribosomal Data Project).

La secuencia completa se copió del procesador de texto y se pegó en el programa de la base de datos. Se usó la función BLAST (para el caso del NCBI), ó SUBMIT (para el caso del RDP). El banco de datos arrojó el género, especie y subespecie de la secuencia ingresada, y el porcentaje de ajuste (MATCH) de la secuencia ingresada con la secuencia de la base de datos.

6.2. Meta 2. Adaptación de *B. licheniformis* a un medio enriquecido con melazas

6.2.1. Técnicas para el análisis del consumo de sustrato.

6.2.1.1. Determinación de la densidad óptica del cultivo (DO). La densidad óptica de un cultivo es proporcional a la cantidad de bacterias; su medición permite estimar la población bacteriana (Neyra et al. 1996). Durante el proyecto se evaluó la densidad óptica en cultivos con medio LB (de color claro) y en el medio MMV con melazas (de color oscuro). Debido a las diferencias de color, se utilizaron dos metodologías distintas para la determinación de este parámetro:

6.2.1.1.1. Determinación de la densidad óptica en el medio de cultivo LB. Para determinar la densidad óptica de los medios se siguió el siguiente método: antes de la inoculación se tomaron muestras de medio para emplearlo como blanco. Posteriormente se tomaron bajo condiciones de esterilidad las muestras del medio, y se vertieron sobre tubos para centrífuga estériles. A

continuación, los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min. Después de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de la muestra de agua destilada. Posteriormente, se agitaron los tubos hasta resuspender totalmente las células. El lavado se repitió una vez más. Finalmente, se midió la absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Lambda 35 UV/VIS de Perkin-Elmer.

6.2.1.1.2. Determinación de la densidad óptica en el medio MMV.

Debido a que el medio MMV enriquecido con melazas presentó una cantidad considerable de sólidos así como un color café oscuro, se modificó el método de lavado de la muestra como se describe a continuación. Antes de la inoculación del medio, se tomaron muestras de medio para emplearlos como blanco, las cuales se sometieron al mismo proceso de lavado. Las muestras en los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de agua destilada. Después de esto, se resuspendieron las células mediante agitación. Este procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente, la densidad óptica se midió en un espectrofotómetro HACH-DR5000 a 610 nm.

6.2.1.2. Determinación de sacarosa, fructosa y glucosa por HPLC.

Para la determinación de los tres azúcares principales en el medio enriquecido con melazas se empleó el equipo HPLC GBC LC 1445, que emplea un sistema de bomba GBC LC1150 con un detector GBC de índice de refracción LC1240 y un horno para columna Eppendorf CH-30 operando a 85 °C. La columna que se empleó fue la

MetaCarb 87C 300 x 7.8 mm marca Varian y el loop de inyección usado fue de 20 μL .

Soluciones empleadas.

A. Solución de EDTA cálcico a 50 ppm:

Se pesaron 0.0498 g de EDTA disódico y 0.01 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en un vaso de precipitados y las dos sales se disolvieron en 200 mL de agua destilada. Después de esto, la solución se aforó a 1 L. Posteriormente, la solución se sometió a sonicación durante 5 min en un baño de ultrasonido Branson 8510. Subsecuentemente, la solución se filtró a través de papel filtro y se degasificó durante 30 min en un baño de ultrasonido Branson 8510.

B. Estándares de sacarosa, glucosa y fructosa:

Se utilizó glucosa y fructosa grado reactivo de Sigma-Aldrich y sacarosa grado reactivo de la marca Baker. Se prepararon 5 soluciones de la mezcla de los tres azúcares a concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, y 2.0% en matraces aforados de 10 mL. Las soluciones se vertieron en viales de 10 mL para su almacenamiento en refrigeración. Las soluciones fueron preparadas 48 h antes de su inyección en el equipo de HPLC.

Estabilización del equipo de HPLC. Después de la degasificación de la fase móvil, ésta se vertió cuidadosamente en el recipiente de fase móvil del equipo, evitando la formación de burbujas. Posteriormente se realizó una purga del equipo para eliminar el aire contenido en el *tubing* que va del contenedor de la fase móvil

al degasificador y del degasificador al mezclador del equipo. Una vez que ya no se observaron burbujas en todo el *tubing*, se detuvo la purga y se cerró la válvula. El sistema se inició con un flujo de 1 mL/min, con la finalidad de llenar la columna con el fluido rápidamente. Conforme la presión en el sistema fue en aumento, el flujo se disminuyó hasta estabilizar el sistema a una presión de 200 psi con un flujo de fase móvil de 0.1 mL/min. Una vez estabilizado el equipo, se llevaron a cabo pruebas de inyección y *previews* para determinar el punto en el que la línea base presentaba menos ruido. Cuando se comprobó que el sistema estaba estable, se procedió a la inyección de los estándares y de las muestras. El tiempo por corrida fue de 30 min. Para la obtención de los cromatogramas y la manipulación de los mismos, se empleó el programa *WinChrom*TM Ver. 1.31 (*GBC Scientific equipment*, Australia) para Microsoft Windows 98TM.

Análisis de la muestra. La muestra obtenida del matraz de cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min. A partir de esto, el sobrenadante se pasó por una membrana de 0.45 µm, recuperando el líquido en un vial color ámbar. Después de esto, el vial se agitó manualmente para promover la homogeneización de la muestra pero evitando la formación de burbujas. Para realizar las inyecciones, se utilizó una jeringa de inyección de 500 µL, se utilizaron 200 µL de la muestra para lavar la jeringa. Posteriormente, se inyectaron 200 µL de la muestra en el equipo de HPLC. Cada muestra se analizó por triplicado en el equipo.

6.2.1.3. Determinación de azúcares totales. Este parámetro se obtuvo mediante la técnica de azúcares reductores de Dubois (1956), también conocida

como el ensayo del fenol-sulfúrico. La metodología empleada se basó en el trabajo de Dubois (1956) y en el trabajo reportado por Wrolstad et al. (2005).

Soluciones empleadas.

A. Solución de fenol al 4%:

Se pesaron 4 g de fenol en un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvieron en 300 mL de agua destilada, con ayuda de una varilla de vidrio. Luego, se vertió la solución en un matraz aforado de 500 mL y se aforó con agua destilada. La solución de fenol puede almacenarse hasta por seis meses a temperatura ambiente.

B. Estándar de sacarosa:

Para la determinación de azúcares totales, se empleó únicamente un estándar de sacarosa, debido a que la sacarosa es el azúcar mayoritario en las melazas. Se pesó 1 g de sacarosa en un matraz aforado de 10 mL y se agregaron 5 mL de agua destilada. Después, se agitó en un vórtex hasta la disolución total y se aforó a 10 mL con agua destilada. De esta solución se tomaron 100 μ L, los cuales se aforaron a 10 mL con agua destilada.

Obtención de la curva de calibración. En viales color ámbar, se vertieron alícuotas de 10, 20, 30, 40 y 50 μ L de la solución estándar, por triplicado. Después, cada muestra se completó con agua destilada a un volumen de 150 μ L. Por cada grupo de réplicas se procesó una muestra blanco que consistió de 150 μ L de agua destilada en un vial color ámbar. Las muestras se procesaron en grupos de 4, es decir, las tres réplicas de cada concentración más el blanco, debido a la sensibilidad

del complejo colorido formado. En cada muestra se vertieron 500 μL de la solución de fenol al 4%. Los viales se agitaron durante un minuto en el vórtex. Luego, se agregaron de manera rápida 2500 μL de ácido sulfúrico concentrado, procurando que el ácido cayera directamente en la superficie del líquido. Posteriormente, los viales se dejaron reposar durante 10 min. Después de esto, los viales se llevaron a agitación durante 1.5 min y se dejaron reposar en un baño a 25 °C durante 20 min. Una vez pasado este tiempo, los viales se agitaron durante 1 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HACH-DR5000 a 490 nm, obteniendo así la curva de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración de azúcares totales.

Análisis de las muestras. Se determinó la concentración de azúcares totales tanto en los medios de crecimiento antes y después de la inoculación. En ambos casos, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se empleó para la determinación de azúcares. Para el caso del análisis de los medios MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas antes de su inoculación, se llevó a cabo una dilución 1:3 con agua destilada. Para el caso del análisis de los medios después del crecimiento de biomasa, se realizó una dilución previa 1:1 con agua destilada, a excepción de la muestra de MMV con 5 g/L de melazas, donde se empleó la muestra directamente. Después de realizar la dilución antes señalada, se llevó a cabo el análisis de azúcares totales por triplicado, tal como se describe en el párrafo anterior.

6.2.1.4. Determinación del color del medio. Para realizar el análisis de color, se empleó un colorímetro UltraScan VIS (HunterLab, USA) que se muestra en la Figura 14. La determinación de color se realizó por transmitancia ya que el medio es un líquido translúcido. Se empleó el software *EasyMatch QC* de HunterLab, para Windows®XP. El equipo se calibró usando la tarjeta negra en la parte interna del equipo para el negro, y el mosaico blanco en la parte externa para el estándar blanco. Para la medición de la muestra, ésta se vertió en la celda de cuarzo y se colocó en la parte interna del colorímetro destinada a la toma de datos mediante transmitancia. Posteriormente se obtuvieron los parámetros de color CIELab: L^* , a^* , y b^* . Cuando la cantidad de muestra no era suficiente para llenar la celda de cuarzo, se realizó una dilución 1:1 con agua destilada.



Figura 14. Colorímetro HunterLab empleado para la determinación del color en el medio MMV.

6.2.1.5. Análisis estadístico empleado para el análisis del consumo de sustrato. Para el análisis de los resultados de la determinación de la densidad óptica de los cultivos, la determinación de azúcares totales, y la medición de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) se empleó un intervalo de confianza del 95%.

6.2.2. Determinación de las condiciones adecuadas de crecimiento

6.2.2.1. Asimilación de distintas fuentes de carbono. Después de lograr el aislamiento de *B. licheniformis*, se evaluó su capacidad de metabolizar algunas fuentes de carbono para su crecimiento. Se empleó el medio LB-P, añadiendo a la formulación diferentes fuentes de carbono: glucosa, ácido málico (10 g/L) y glicerol (1.4 g/L). Para cada fuente de carbono, se prepararon duplicados con 250 mL del medio. Después de esto, los matraces se inocularon con 25 mL de un cultivo de *B. licheniformis* en medio NFb líquido a 37 °C durante 24 h. A partir de este experimento, se reportó si hubo crecimiento en cada medio evaluado.

6.2.2.2. Análisis de asimilación de glucosa. Se llevó a cabo un experimento más detallado para evaluar la capacidad de asimilación de glucosa por parte de *B. licheniformis*, debido a que en el experimento anterior se observó que la cepa produce un polímero insoluble en el medio. El objetivo de este experimento consistió en encontrar la concentración mínima a la cual no se formara el polímero en el medio. Se realizó previamente un cultivo de *B. licheniformis* en medio LB-P líquido incubado a 37 °C durante 48 h. Este cultivo se empleó como inóculo. Para el

experimento de asimilación de glucosa, se empleó el medio MMV usando glucosa como fuente de carbono con las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 3, y 4 g/L. Se prepararon triplicados de 300 mL del medio por cada concentración de glucosa. Luego, los matraces se inocularon con 30 mL del cultivo de *B. licheniformis* preparado previamente y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se reportó la presencia de polímero y la densidad óptica (DO) como indicador de la producción de biomasa.

6.2.2.3. Determinación del medio LB adecuado para *B. licheniformis*.

Debido a que se tenían dos formulaciones del medio Luria-Bertani, fue necesario determinar en cuál de los dos medios se promueve mayor producción de biomasa, conservación de las células de manera bacilar y la menor formación de polímero.

Se evaluaron los medios LB-P y LB-T a tres temperaturas: 25, 30 y 37°C. Se prepararon duplicados de 150 mL de medio para cada temperatura y cada medio. Después de esto, se inoculó cada matraz con una asada grande de *B. licheniformis* crecido en medio sólido LB-T durante 48 h. Posteriormente, los matraces se incubaron a las condiciones establecidas durante 48 h. Se reportó la presencia de polímero, la turbidez en el medio y la morfología celular en cada réplica.

6.2.2.4. Determinación de la temperatura óptima de crecimiento y seguimiento del enquistamiento celular de *B. licheniformis*.

Debido a que en la literatura se reportan distintas temperaturas para el crecimiento de *B. licheniformis*, se realizó un experimento para determinar la temperatura a la cual se obtiene la mayor producción de biomasa para un medio determinado. Se

evaluaron tres temperaturas: 25, 30 y 37 °C. Se utilizó el medio MMV con ácido málico como fuente de carbono, preparando duplicados de 600 mL del medio para cada temperatura. Se inoculó cada matraz con tres asadas grandes de *B. licheniformis* crecido en medio MMV sólido durante 48 h y se homogeneizó con un agitador magnético. Después de esto, se incubaron los matraces a las temperaturas establecidas. Se tomaron muestras de 8 mL por duplicado cada 8 h para la determinación de la densidad óptica y el monitoreo de la morfología celular. La densidad óptica se evaluó en un espectrofotómetro HACH-DR5000 a 610 nm, empleando agua destilada como blanco. Finalmente, se obtuvo la curva de crecimiento de biomasa para cada réplica y se describió el cambio de morfología celular durante la incubación.

6.2.3. Crecimiento y adaptación de *B. licheniformis* en el medio MMV con melazas.

6.2.3.1. Aclimatación inicial al medio MMV con 4 g/L de melazas. Se realizó un experimento para determinar la capacidad de *B. licheniformis* para crecer en un medio enriquecido con melazas de caña de azúcar. Se monitoreó el crecimiento y el cambio de morfología durante la incubación. A partir de este cultivo se comenzó la adaptación de la cepa al medio.

Se empleó el medio MMV con 4 g/L de melazas. Se preparó un cultivo por duplicado con 600 mL de medio. El medio se inoculó con 3 asadas grandes de la cepa cultivada en caja Petri con el medio LB-T a 30 °C. Luego, los matraces se agitaron con la ayuda de un agitador magnético para homogeneizar el inóculo en el

medio y se incubaron a 30 °C. Se tomaron muestras de 8 mL por duplicado cada 6 h para obtener la densidad óptica y se monitoreó la morfología celular del microorganismo. La incubación se detuvo cuando se observó la fase de muerte celular en base a los datos de densidad óptica del medio.

Se reportó el cambio en la morfología celular y las curvas de crecimiento de *B. licheniformis* durante la incubación. Estos cultivos se reinocularon en cajas Petri con medio LB-T, las cuales sirvieron de inóculo para la adaptación de la cepa a un medio con una concentración mayor de melazas (MMV con 5 g/L).

6.2.3.2. Adaptación de *B. licheniformis* al medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas. Se preparó un solo lote de 900 mL de medio MMV empleando inicialmente 5 g/L de melazas. Se tomaron dos muestras de 8 mL de medio sin inocular para emplearlos como blanco durante la determinación de la densidad óptica. De manera subsecuente, el medio se inoculó con cuatro asadas grandes del cultivo en caja Petri de la cepa aclimatada a 4 g/L de melazas en medio LB-T y se homogeneizó empleando un agitador magnético. Posteriormente, el medio se dividió en dos réplicas de 400 mL, las cuales se incubaron a 30 °C. Se tomaron muestras por duplicado de 8 mL cada 12 h para evaluar la densidad óptica y monitorear la morfología celular del microorganismo. Por otro lado, se empleó la técnica de HPLC para investigar los cambios en la composición del medio de los tres azúcares principales de las melazas: sacarosa, fructosa y glucosa. La incubación se detuvo cuando se observó la fase de muerte celular en base a los datos de densidad óptica del medio.

Se repitió el procedimiento anterior para incrementos subsecuentes en la concentración de melazas: 8, 11 y 14 g/L de melazas, empleando en cada uno el cultivo anterior como inóculo para la adaptación a la siguiente concentración de melazas.

Se determinó la concentración máxima de melazas a la cual ocurre un aumento en el crecimiento de *B. licheniformis*. Una vez obtenida esta concentración, se realizó un monitoreo de los azúcares presentes mediante HPLC en éste medio durante la incubación de *B. licheniformis*, para realizar una inspección del aprovechamiento de los sustratos antes y después de la adaptación.

6.2.4. Análisis del crecimiento de la cepa de *B. licheniformis* adaptada, en el medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas.

Una vez adaptada la cepa de *B. licheniformis* al medio enriquecido de melazas, se realizó un experimento para evaluar el comportamiento de la bacteria a las distintas concentraciones de melazas ensayadas. Esto debido a que se observó que una vez adaptada, la bacteria ya no producía polímero y el crecimiento ocurría de manera más rápida con respecto al crecimiento observado en los periodos de adaptación. La metodología empleada fue la siguiente:

Se prepararon lotes de 800 mL del medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas conforme se reporta en el punto 6.1.2.4. Los lotes se inocularon con 4 asadas grandes de un cultivo en caja Petri con crecimiento abundante de *B. licheniformis* en medio LB-T sembrado 48 h antes del experimento. La biomasa se dispersó de manera homogénea mediante un agitador magnético y posteriormente

los lotes se dividieron en dos réplicas de 400 mL y se incubaron a 30 °C. También se prepararon 150 mL de cada medio para emplearse como blanco.

Se tomaron muestras de 10 mL por duplicado cada 6 h, con las cuales se determinó la biomasa por densidad óptica. Asimismo con las muestras inicial y final se determinó la cantidad de azúcares totales mediante la técnica de Dubois especificada en la Sección 6.2.1.3 y el color mediante colorimetría (Sección 6.2.1.4).

6.2.5. Análisis del crecimiento en reactor piloto de la cepa adaptada en el medio MMV con 11 g/L de melazas.

6.2.5.1. Biorreactor empleado para la producción de biomasa. Una vez adaptada la cepa de *B. licheniformis* al medio rico en melazas, se evaluó la producción de biomasa de esta cepa en un reactor piloto de 3 L 2F300B (SEV, Puebla, México). Este equipo cuenta con cuatro deflectores, un agitador magnético, y un tanque enchaquetado de vidrio. Por la chaqueta se hace fluir agua caliente para el control de temperatura. El equipo cuenta con las siguientes entradas y salidas (Figura 15):

1. Entrada del medio.
2. Entrada de aire conectada al difusor.
3. Entrada para el potenciómetro de pH.
4. Tubo encamisado para el sensor de temperatura.
5. Salida de aire.
6. Salida para toma de muestra.



Figura 15. Reactor piloto de 3 L, para el crecimiento de *B. licheniformis*.

A este reactor se le ha incorporado un sistema de control de temperatura y pH, desarrollado y operado vía computador. El sistema de control y adquisición de datos fue diseñado por Edilberto López Pérez, tesista de la Carrera de Ingeniería en Electrónica de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, con el programa *LabView® 2010* (National Instruments, USA).

Para el control de temperatura, el sistema cuenta con una bomba de agua sumergida en un tanque equipado con una resistencia eléctrica. La bomba ayudó a recircular constantemente el agua a través de la chaqueta del reactor. Cuando el sensor de temperatura detecta que la temperatura del reactor es menor a la establecida, el sistema de control activa la resistencia para calentar el reactor. En cuanto se alcanza la temperatura deseada, la resistencia es apagada. La precisión del sistema de control de temperatura es de ± 0.3 °C.

El sistema de control de pH, cuenta con una bomba que dependiendo de la señal detectada por el potenciómetro (Cole-Palmer, USA) en el biorreactor, adiciona KOH al caldo de cultivo con la finalidad de mantener el pH en un valor alrededor de 7 ± 0.1 . Debido a que el biomedio tiende a su acidificación durante el cultivo celular, no se requirió el uso de ácido para el control de pH.

6.2.5.2. Producción de biomasa de *B. licheniformis*

Preparación del inóculo para el reactor. La cepa adaptada de *B. licheniformis* se inoculó en cajas Petri de LB-T y se incubó durante 48 h a 30 °C. Se preparó un lote de 300 mL de medio LB-T y este se inoculó con 2 asadas grandes del cultivo preparado en caja Petri. El medio se incubó durante 24 h a 30 °C. Este cultivo se empleó como inóculo para el reactor.

Puesta en marcha del biorreactor. Se prepararon 3000 mL de medio MMV con 11 g/L de melazas como se describe en el punto 6.1.2.4. El biorreactor se lavó con agua y jabón; posteriormente, se trató con agua destilada hirviendo. Después del vaciado y enfriamiento del reactor, se vertieron asépticamente en el biorreactor los 3000 mL del medio MMV así como el inóculo preparado con anterioridad. Después de esto, el biorreactor se colocó sobre la base de agitación magnética y la agitación se ajustó a 200 rpm. Durante todo el proceso, se mantuvo una temperatura de 30 °C, aireación constante y un pH de 7 ± 0.1 . Se tomaron muestras de biomedio de 10 mL por duplicado cada 2 h para la determinación de biomasa, color y azúcares totales. El tiempo de cultivo fue de 38 h. Una vez transcurrido este

tiempo, el medio de cultivo obtenido se vertió bajo condiciones de esterilidad en un frasco de 3 L y se mantuvo en refrigeración para su uso posterior.

6.3. Meta 3. Producción de inoculantes

La producción del inoculante es fundamental para la aplicación de una bacteria biofertilizante en la rizósfera. En el presente proyecto se evaluaron dos acarreadores distintos para la producción del inoculante: suelo y almidón. La metodología de elaboración se reporta a continuación.

6.3.1. Inoculante con almidón. Se pesaron 1150 g de almidón en doble bolsa de polipapel y se esterilizó a 121 °C durante 30 min. Se esterilizó también una probeta de vidrio de 500 mL y una pala de madera a 121 °C durante 15 min. Después de esto, bajo condiciones asépticas, se mezcló el almidón estéril con 1000 mL del medio de cultivo a emplear como inoculante en un recipiente grande previamente lavado con agua y jabón y limpiado con etanol al 70%. Se mezcló manualmente hasta obtener una pasta uniforme. Posteriormente, la pasta se vertió sobre charolas de acero inoxidable para panificación (previamente lavadas y tratadas con etanol al 70%). Las charolas se colocaron dentro de una campana de flujo laminar durante 15 h hasta obtener un polvo seco. Concluido el secado, el inoculante se recuperó en bolsas de polipapel y se almacenó a 4 °C.

6.3.2. Inoculante con suelo. El suelo se pulverizó en un molino industrial y se realizó un tamizado hasta obtener un polvo con un tamaño de partícula de 44 µm. Luego, se pesaron 1920 g de suelo pulverizado en doble bolsa de polipapel y se esterilizó a 121 °C durante 30 min. Asimismo, se esterilizó una probeta de vidrio de 500 mL y una pala de madera a 121 °C durante 15 min. Después de esto, bajo condiciones asépticas, se mezcló el suelo estéril con 1000 mL del biomedio en un recipiente grande (previamente lavado con agua y jabón y limpiado con etanol al 70%). Se mezcló manualmente hasta obtener una pasta uniforme. Luego, la pasta se vertió sobre charolas de acero inoxidable para panificación (previamente lavadas y tratadas con etanol al 70%). La pasta se secó en una campana de flujo laminar durante 18 h. Una vez seco, el inoculante se recuperó en bolsas de polipapel y se almacenó a 4 °C.

6.3.3. Preparación de la semilla para su aplicación en invernadero. La preparación de la semilla se realizó bajo condiciones asépticas. Se usó semilla híbrida de maíz P4082W donada a este proyecto por la empresa Pioneer Hi-Bred México S.A. Esta semilla se empleó debido a que no recibió ningún tratamiento químico previo a su embarque, lo cual es fundamental para la supervivencia del microorganismo. Las semillas se trataron durante 1 h en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Después de esto, las semillas se lavaron dos veces con agua estéril.

Para el tratamiento de *B. licheniformis* con almidón, se suspendieron 600 g del polvo inoculante en 250 mL de agua estéril y se mezcló con 1200 g de semillas.

Para el tratamiento de *B. licheniformis* con suelo, se suspendieron 600 g del polvo inoculante en 400 mL de agua estéril y se mezcló con 1200 g de semillas. Posteriormente, las mezclas se secaron en una campana de flujo laminar durante 12 h. Las semillas se almacenaron a 4 °C hasta su uso final.

6.4. Meta 4. Evaluación de los inoculantes en cultivos de maíz

La evaluación de los inoculantes de *B. licheniformis* se llevó a cabo en el invernadero del Instituto de Hidrología de la UTM para la producción de maíz bajo condiciones controladas de humedad, temperatura, plagas y enfermedades.

Para determinar la mejor combinación de biofertilizantes y el nivel de fertilización, se consideró como testigo al tratamiento de la semilla sin inoculación con la aplicación de 100% de la dosis de fertilizante químico recomendada para la Región Mixteca que es una dosis de NPK (Nitrógeno-Fósforo-Potasio) de 90-60-00 kg/ha (Fundación Agroproduce Oxaca, A.C. 2007). Los niveles de fertilización evaluados con la adición de biofertilizantes fueron la mitad y la cuarta parte de la dosis de fertilización recomendada para la Región Mixteca (Tabla 7).

Tabla 7. Tratamientos para la validación de biofertilizantes en cultivo de maíz.

Número	Tratamiento	Clave
1	Testigo	Testigo
2	<i>B. licheniformis</i> + Almidón	Li-A
3	<i>B. licheniformis</i> + Suelo	Li-S
4	<i>B. licheniformis</i> -Almidón + 25% Fertilización recomendada	Li-A-25
5	<i>B. licheniformis</i> -Almidón + 50% Fertilización recomendada	Li-A-50
6	<i>B. licheniformis</i> -Suelo + 25% Fertilización recomendada	Li-S-25
7	<i>B. licheniformis</i> -Suelo + 50% Fertilización recomendada	Li-S-50

La validación se llevó a cabo mediante un diseño experimental de bloques completos, realizando cuatro repeticiones por tratamiento, donde la unidad experimental consistió de una planta de maíz en bolsa negra para vivero con volumen de 8 L. El suelo empleado fue un suelo Fluvisol de textura media (franco-arenoso) y eútrico (rico en materia orgánica). La plantación se estableció el 24 de septiembre de 2011. Las variables de respuesta a evaluar fueron el diámetro y la altura de las plantas (a los 3 meses de iniciado el cultivo), así como el contenido de clorofila, y el peso del grano producido.

6.4.1. Contenido de clorofila de las plantas. A los 4 meses de iniciado el cultivo, se midió la cantidad de clorofila en las plantas empleando un equipo FieldScout CM 1000 de Spectrum Technologies, Inc. Este equipo mide la luz reflejada a 700 y a 840 nm para estimar la cantidad de clorofila en las hojas. La luz natural sirve como fuente de iluminación y los cambios en la luz ambiental se corrigen automáticamente por el sensor del equipo. El equipo absorbe y mide la luz ambiental y la reflejada a cada longitud de onda. La clorofila A absorbe a 700 nm y como resultado, la luz reflejada de las hojas a esta longitud de onda es menos intensa que la reflejada a 840 nm.

La luz a 840 nm no es afectada por el contenido de clorofila en las hojas y sirve como indicador de cuánta luz es reflejada debido a las características físicas de las hojas, tales como la presencia de texturas cerosas o con cabellos. El índice de clorofila (en una escala de 0-999) se calcula mediante los datos de la medición de luz ambiental y reflejada; este índice es una medición del ‘verdor’ relativo de las hojas. La medición de clorofila en las hojas se llevó a cabo posicionando el equipo aproximadamente a 45.7 cm de la superficie de las hojas y tomando 4 lecturas por réplica.

6.4.2. Producción de grano. A los 5 meses y dos semanas del inicio del cultivo, se suspendió el riego de las plantas las cuales se cosecharon 14 días después. Los frutos cosechados se colocaron en un horno de circulación de aire a 69 °C durante 7 días para finalmente realizar el pesado del grano en una balanza analítica marca Ohaus.

6.4.3. Análisis estadístico empleado. Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se empleó el software *SAS System Ver 8*. (SAS Institute Inc., USA) para Windows XP. Se realizaron análisis ANOVA con diseños de un solo factor y un nivel de significancia del 95% para evaluar si existió o no diferencia significativa entre los distintos tratamientos evaluados sobre las variables de respuesta determinadas.

Posteriormente se llevaron a cabo la pruebas de Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$) para la comparación de medias. Esta prueba detecta la posibilidad de que alguna diferencia de medias haya sido declarada falsamente significativa (Herrera Haro y Barreras Serrano 2005). Con esta evaluación se logró establecer la diferencia estadística entre los tratamientos del biofertilizante evaluados en los cultivos de maíz.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Aislamiento y conservación de *B. licheniformis*

El crecimiento del cultivo en el medio ATCC: 838 fue considerablemente lento. Sin embargo, el empleo de este medio permitió el aislamiento de un conjunto de microorganismos fijadores de nitrógeno. Este grupo consistió básicamente de dos cepas microbianas, *B. licheniformis* y otra cepa que no fue identificada pero que al microscopio se observó como cocos *Gram* negativos tras evaluarse por tinción de *Gram*. Al resembrar esta mezcla microbiana en el medio LB-RC se observó que *B. licheniformis* es capaz de pigmentarse con el colorante presente en el medio. Se observó que la bacteria de estudio formó una sola colonia junto con el otro microorganismo presente. Las colonias se pigmentaron de color rosa debido a que mientras *B. licheniformis* se pigmenta de rojo escarlata, el otro microorganismo no (Figura 16). Esta característica fue reportada previamente por Rojas et al. (2001), quienes observaron que *B. licheniformis* y *Phyllobacterium spp.* son capaces de formar un solo tipo de colonia en medio sólido.



Figura 16. Crecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno en medio LB-RC.

Para lograr la separación de *B. licheniformis* de la otra bacteria, se empleó el medio NFb-RC, que promovió un crecimiento más rápido de la cepa que en el medio ATCC:838. Aunado a esto, la pigmentación característica de la bacteria sirvió para la identificación en la caja Petri. Al emplear este medio y llevar a cabo una resiembra continua del cultivo en cajas Petri, eventualmente se encontraron algunas colonias de color rojo escarlata, como se muestra en la Figura 17a. Al analizar estas colonias al microscopio se observó que consistían exclusivamente de bacilos (*B. licheniformis*). Así pues, se empleó una serie de resiembras para lograr su completo aislamiento. Cada siembra consistió en resembrar las colonias rojo escarlata en medio NFb-RC fresco, seguido por una incubación en medio LB líquido para fortificar las células. De esta manera se logró la separación de los dos tipos de microorganismos al final de tres ciclos de resiembras. En la Figura 17b se muestra una caja Petri con crecimiento exclusivo de *B. licheniformis*, donde se

observa un color rojo escarlata en toda el área estriada. Una vez aislada la cepa, ésta se resembró cada 30 días en medio LB-RC para mantenerla activa.

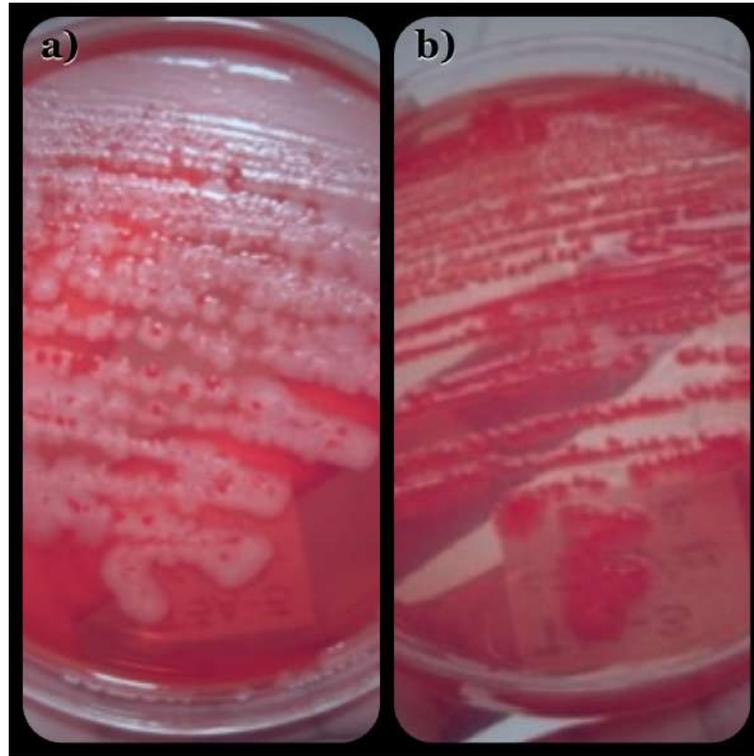


Figura 17. Observaciones de colonias en caja Petri durante el aislamiento de *B. licheniformis*: a) Cultivo de microorganismos fijadores de nitrógeno en el medio NFb-RC. Las colonias de *B. licheniformis* se observan de un color rojo escarlata. b) Cultivo de *B. licheniformis* NFb-RC en forma pura.

7.1.1. Identificación genética de la cepa aislada. La determinación genética se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, con la asesoría del Dr. Adelfo Escalante Lozada. Después la obtención de la secuencia del gen ADNr 16S en el Departamento de Secuenciación del Instituto, se obtuvo la secuencia en el formato FASTA empleando el programa *4Peaks* para MacOSX. La

secuencia se introdujo en el banco de datos del NCBI. Se obtuvo un ajuste del 99% para *B. licheniformis* con número de acceso de NC_006270.3. Asimismo, se obtuvo el árbol filogenético mostrado en la Figura 18.

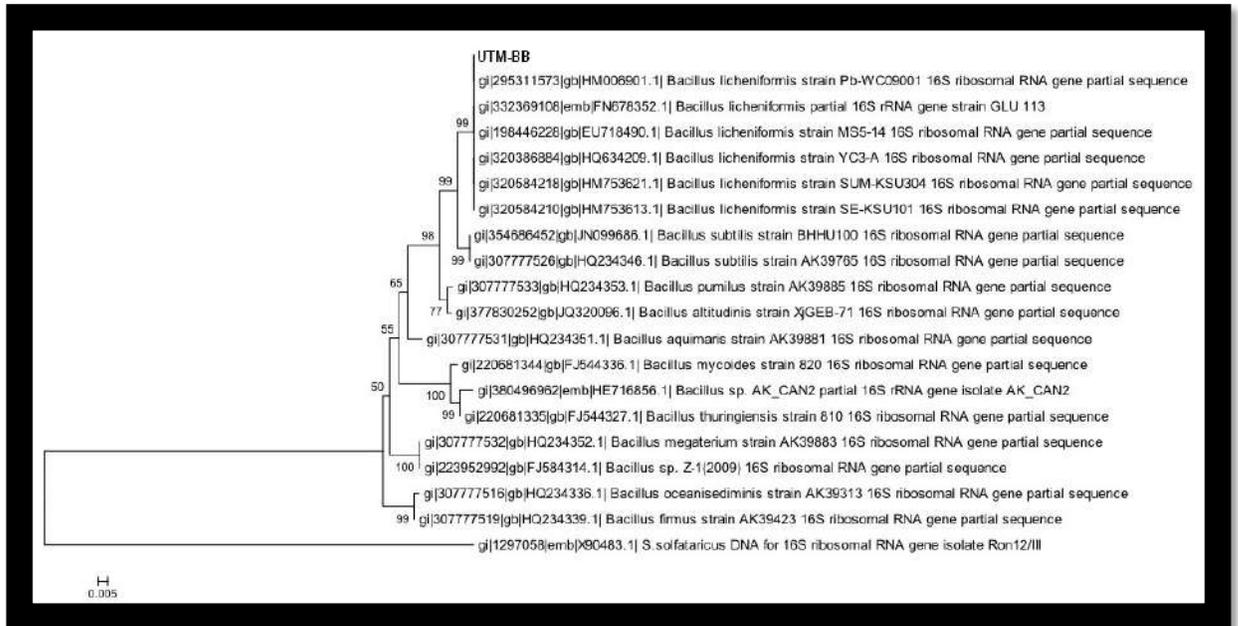


Figura 18. Árbol filogenético de la cepa biofertilizante obtenido a partir de la secuencia del gen ADNr 16S.

7.2. Determinación de las condiciones adecuadas de crecimiento de *B. licheniformis*

7.2.1. Fuente de carbono adecuada para el crecimiento. Se ensayó el crecimiento de la cepa con tres distintas fuentes de carbono: ácido málico, glucosa y glicerol. El empleo de ácido málico provocó una producción de biomasa muy pobre o nula. Los cultivos con glucosa y glicerol presentaron crecimiento bacteriano; sin embargo, se observó un cambio morfológico del microorganismo en estos medios. En la Figura 19, se puede observar a la izquierda la morfología normal del microorganismo (bacilar) y a la derecha se presenta la morfología que presenta *B. licheniformis* en el medio líquido. En el medio líquido las células se elongaron y su forma no es específica. Cuando estas células se reinocularon en medio sólido, se obtuvieron nuevamente los bacilos. A este cambio morfológico de la bacteria se le denominó “enquistamiento celular”.

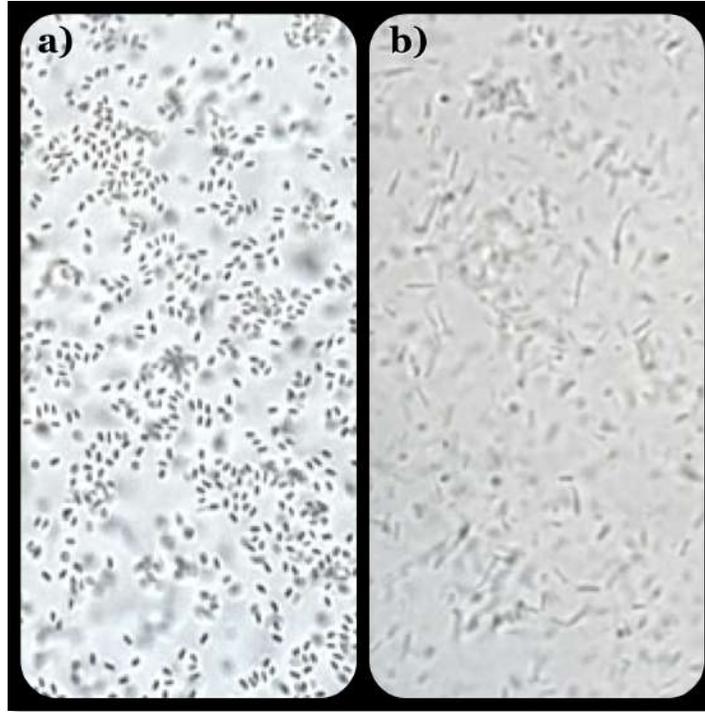


Figura 19. a) Se presentan células bacilares de *B. licheniformis*. b) Células enquistadas de *B. licheniformis*. Magnificación: 1000x.

Aunado al cambio morfológico, *B. licheniformis* también presentó la formación de un polímero sobre la superficie del medio de cultivo. *B. licheniformis* produce comúnmente ácido poli- γ -glutámico; sin embargo, de acuerdo a Whitman (2009) éste polímero es soluble en agua. Kaynar y Beyatli (2009) reportaron una cepa de *B. licheniformis* capaz de producir el polímero insoluble poli- β -hidroxibutirato. De acuerdo a esto, es probable que el producto observado sea dicho polímero. La formación de este polímero se observa en la Figura 20.

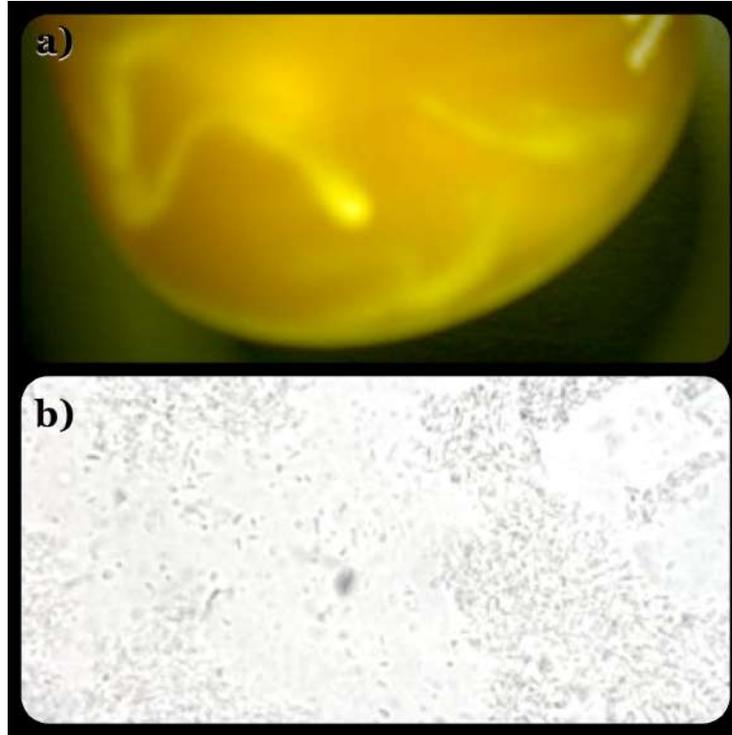


Figura 20. Formación de polímero en cultivos con la adición de glucosa como fuente de carbono. a) Polímero producido por *B. licheniformis* en medio LB-P con glucosa. b) Polímero con una magnificación de 1000x.

En la Figura 20 se observa que el polímero se forma alrededor de células enquistadas. Consecuentemente, es probable que al ser *B. licheniformis* un microorganismo habitante del suelo, el cambio de un medio de cultivo sólido a líquido provoque la transformación morfológica y la producción del polímero para lograr su supervivencia.

A simple vista se observó una mayor producción de polímero así como mayor turbidez en el medio enriquecido con glucosa que en el enriquecido con glicerol. Por tal razón, a partir de este estudio se puede concluir que la mejor fuente de carbono fue la glucosa, que pudo ser asimilada de manera adecuada por *B.*

licheniformis, a pesar de promover el crecimiento enquistado y la producción de polímero.

Después de esto, se realizó un análisis para evaluar el crecimiento de *B. licheniformis* a distintas concentraciones de glucosa. A partir de este estudio se obtuvo que el medio a la concentración de 4 g/L de glucosa fue el que presentó la mayor densidad óptica, con un valor de 0.085 ± 0.005 ; mientras que a concentraciones de 3, 2, y 1 g/L se alcanzaron DO de: 0.035 ± 0.004 , 0.035 ± 0.006 y 0.028 ± 0.006 , respectivamente. Con estos resultados se puede deducir que a pesar de que la célula cambia morfológicamente y se promueve la producción de polímero, el microorganismo es capaz de crecer en estas condiciones. Se observó una relación proporcional entre la concentración de glucosa y la densidad óptica, lo que indica que el medio enriquecido con glucosa en el intervalo de concentración usado no fue inhibitorio para las células. Con esto se puede concluir que el microorganismo es capaz de producir biomasa a partir de células enquistadas de manera alterna a la producción de polímero.

En base a estos resultados se planteó que es posible adaptar la cepa al medio, intentando promover el reajuste del metabolismo microbiano para asimilar mejor los nutrientes del medio y promover una mayor producción de biomasa. Tal adaptación sería muy deseable en la medida en que se redujera el enquistamiento celular y la producción del polímero, mejorando así la producción de *B. licheniformis* en forma bacilar.

7.2.2. Medio LB adecuado para *B. licheniformis*. El medio LB se empleó frecuentemente debido a que es un medio enriquecido para el crecimiento general de bacterias. Se encontraron dos formulaciones de este medio que se nombraron como LB-T (Tilak et al. 2010) y LB-P (Puerta y Ureña 2005). La diferencia principal entre estas dos formulaciones es la cantidad de NaCl empleado ya que mientras la formulación propuesta por Tilak et al. (2010) incluye 2.5 g/L de NaCl, Puerta y Ureña (2005) proponen la adición de 10 g/L de NaCl al medio. En estudios posteriores se evaluó cuál de los dos medios promovía un mayor crecimiento y la menor formación de polímero; es decir, cuál de los dos medios era menos inhibitorio para el crecimiento de la cepa. Después de la incubación en ambos medios, se observó que el medio LB-T promueve una producción menor de polímero en todas las réplicas. También, al observar el polímero producido en las réplicas incubadas a 30 °C con una magnificación de 1000x, se observó que éste estaba constituido por células bacilares. Por tanto esta condición de cultivo promovió una mayor estabilidad celular dado que no hubo cambios en la morfología de la cepa a diferencia de las células cultivadas a otras temperaturas. En base a estos resultados, en adelante se empleó el medio LB-T como cultivo de enriquecimiento celular.

7.2.3. Selección de la temperatura óptima de crecimiento. Para esto se empleó el medio MMV empleando ácido málico como fuente de carbono, según se especifica en el punto 6.2.2.4. En la Figura 21 se observa que en general, el crecimiento fue significativamente mayor cuando la incubación se llevó a cabo a 30 °C y el crecimiento menor se dio a una temperatura de 37 °C.

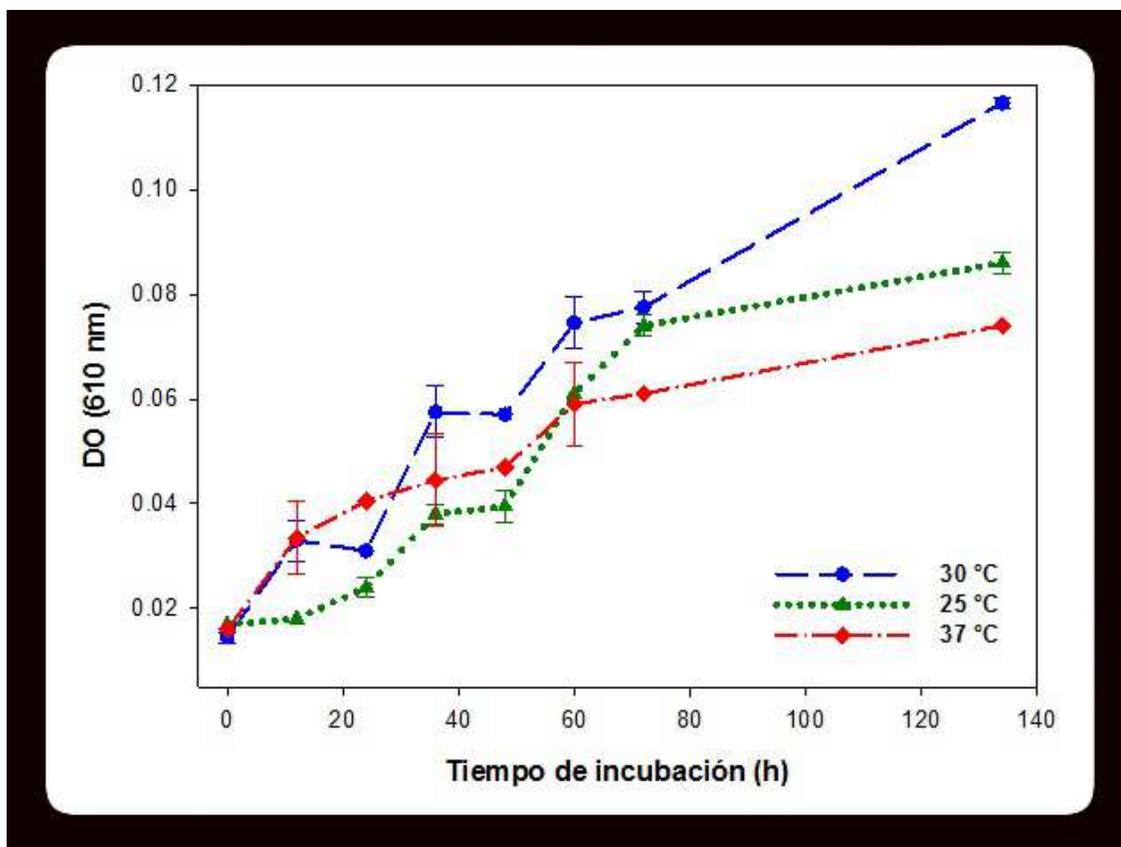


Figura 21. Crecimiento de *B. licheniformis* en medio MMV con ácido málico como fuente de carbono (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

Asimismo en las réplicas incubadas a 25 y 37 °C no se observó la formación de polímero, a diferencia de las réplicas a 30 °C (Figura 22). Con esto se corrobora también que a 30 °C se activa la formación de polímero.



Figura 22. Polímero producido por *B. licheniformis* en medio MMV con ácido málico como fuente de carbono.

En general la tendencia de la producción de biomasa es creciente, aunque existe mucha variabilidad en las primeras horas de incubación. Las diferencias del crecimiento a las distintas temperaturas se vuelven más evidentes a partir de las 48 h de incubación.

Por otro lado, se monitorearon los cultivos al microscopio con una magnificación de 1000x y se observó que, en general, las células permanecen en su estado bacilar sólo durante las primeras 12 h. Posterior a este tiempo de incubación, se observó una mezcla de bacilos y células enquistadas, con presencia mayoritaria de células enquistadas. Las células permanecieron así hasta el final de

la incubación en todos los tratamientos. Con estos experimentos se determinó que la temperatura ideal para la producción de biomasa es de 30 °C y se comprobó que la bacteria tiene la capacidad de crecer en estado enquistado.

7.3. Crecimiento y adaptación de *B. licheniformis* en el medio MMV enriquecido con melazas

7.3.1. Crecimiento de *B. licheniformis* en medio MMV con 4 g/L de melazas. Una vez encontrada la temperatura adecuada para el crecimiento de *B. licheniformis*, y tomando en cuenta que ésta bacteria es capaz de crecer aún en estado enquistado, se planteó iniciar la adaptación de la bacteria en un medio enriquecido con melazas. Primeramente se llevó a cabo una etapa de aclimatación a un medio MMV adicionado con 4 g/L de melazas durante un largo periodo de tiempo. Esta prueba sirvió para evaluar la capacidad de las células para sobrevivir en el medio enriquecido con melazas y para monitorear el cambio en la morfología de la bacteria. La preparación de los cultivos se llevó a cabo conforme se reporta en el punto 6.2.3.1. El tiempo total de incubación fue de 221 h.

A las 18 h de incubación se observó la formación de polímero sobre la superficie del medio, por lo que antes de cada muestreo se realizó una agitación del medio con la finalidad de homogeneizar la muestra y dispersar los flóculos formados. A las 165 h de incubación se observó la dispersión total de los flóculos y el enturbiamiento del medio. En el análisis al microscopio se observó que a las 6 h

el microorganismo comenzó a cambiar morfológicamente a su estado enquistado. En la Figura 23a, se observa a *B. licheniformis* en su estado bacilar al inicio de la incubación; en la Figura 23b se observan las formas celulares enquistadas a las 6 h de incubación.

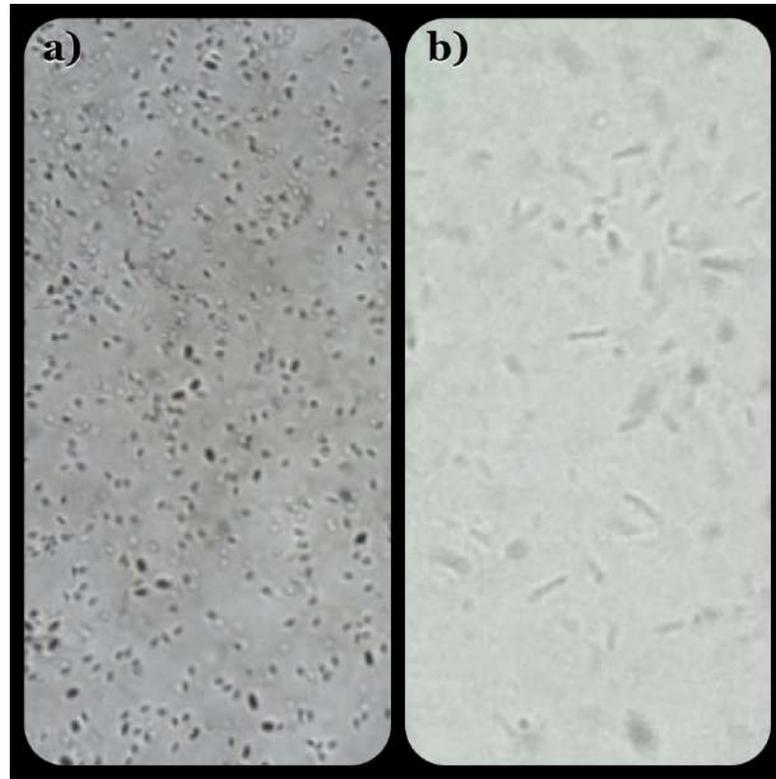


Figura 23. *B. licheniformis* en medio MMV con 4 g/L de melazas. a) Cultivo justo después de la incubación; b) Estado enquistado de la bacteria después de las 6 h de incubación.

(Magnificación: 1000x).

Se observó también que al final de la incubación el medio ya no contenía polímero y las células regresaron a su estado bacilar (Figura 24). El medio se resembró en cajas Petri con medio LB-RC como paso intermedio para su subsecuente adaptación al medio MMV con 5 g/L de melazas.

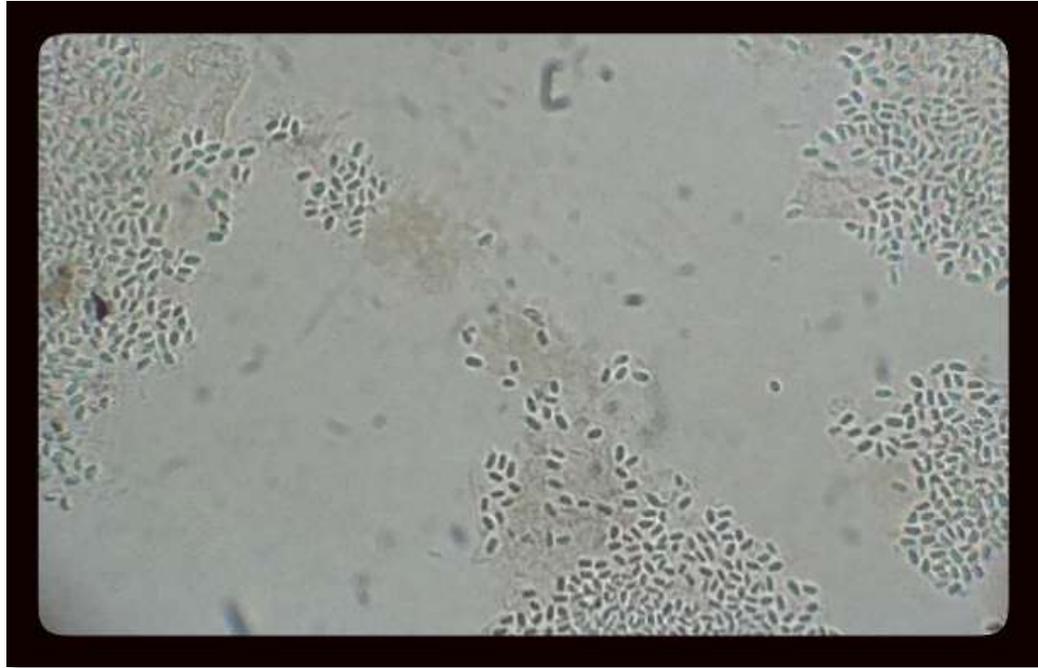


Figura 24. *B. licheniformis* en medio MMV con 4 g/L de melazas observado a las 221 h de incubación. (Magnificación: 1000x).

7.3.2. Crecimiento de *B. licheniformis* en medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas. Los procesos de adaptación se llevaron a cabo durante largos periodos de tiempo debido a que se observó que el cultivo produce polímero al comienzo de la aclimatación. Sin embargo, se observó que a medida que el tiempo de incubación avanza, la bacteria degrada este polímero y regresa a su forma bacilar para seguir creciendo.

Así pues, el cultivo con 5 g/L de melazas se incubó durante 192 h a 30 °C alcanzando una DO de 0.415 ± 0.029 . A las 18 h de incubación se observó el enquistamiento celular (Figura 25) y la producción de polímero sobre la superficie del medio. El polímero producido se observó al microscopio con una magnificación

de 1000x (Figura 26), observándose la presencia de las bacterias en forma enquistada. Al final de la incubación (192 h) se observó que las bacterias regresaron a la forma bacilar característica (Figura 27). Este cultivo se empleó para el análisis de consumo de sustrato que se reportará en una sección posterior. Asimismo, se empleó como inóculo para la adaptación de *B. licheniformis* a 8 g/L.



Figura 25. Células enquistadas de *B. licheniformis* en medio MMV con 5 g/L de melazas observado a las 18 h de incubación (Magnificación: 1000x).

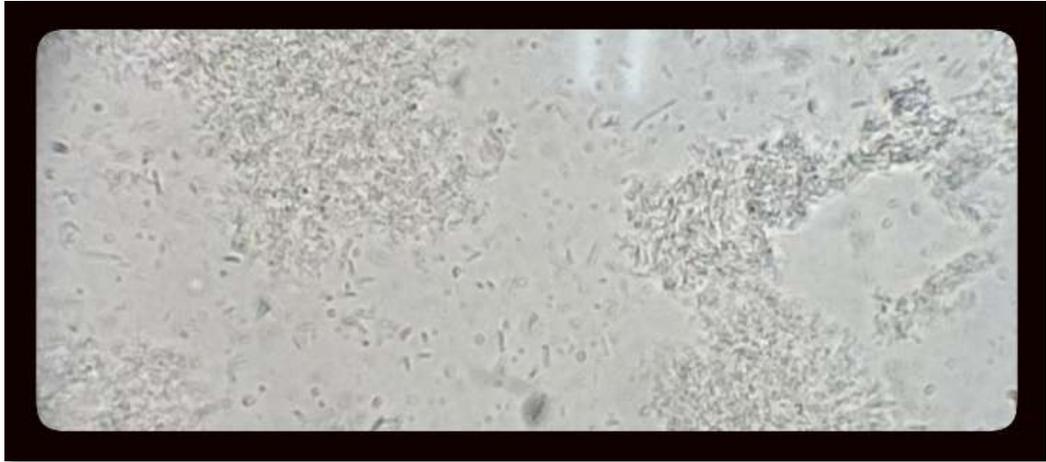


Figura 26. Células enquistadas de *B. licheniformis* en medio MMV con 5 g/L de melazas formando el polímero observado en la superficie del cultivo (Magnificación: 1000x).

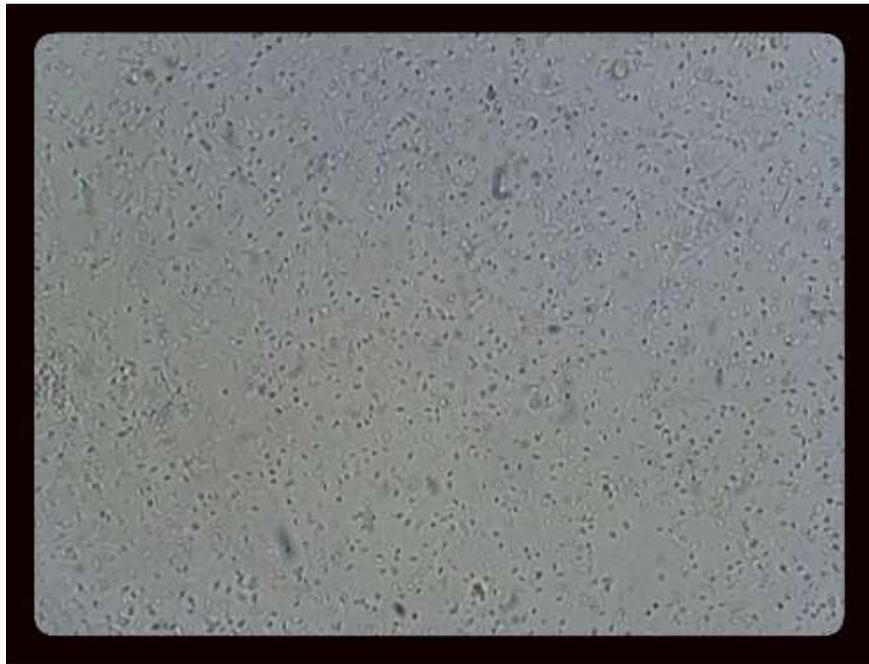


Figura 27. *B. licheniformis* en forma de bacilos cortos medio MMV con 5 g/L de melazas al final de la incubación (192 h) (Magnificación: 1000x).

El cultivo en MMV con 8 g/L de melazas se incubó durante 365 h a 30 °C, alcanzando una DO de 0.673 ± 0 . Se observó que durante las primeras 24 h ocurrió la producción de polímero y el enquistamiento celular. En la Figura 28 se muestran los flóculos que se observaron después de agitar el medio. Después de las 100 h de incubación la bacteria comenzó a regresar a su estado bacilar, eliminándose así también la presencia del polímero en el medio (Figura 29). Este cultivo se empleó como inóculo para la adaptación del microorganismo al medio MMV con 11 g/L de melazas.

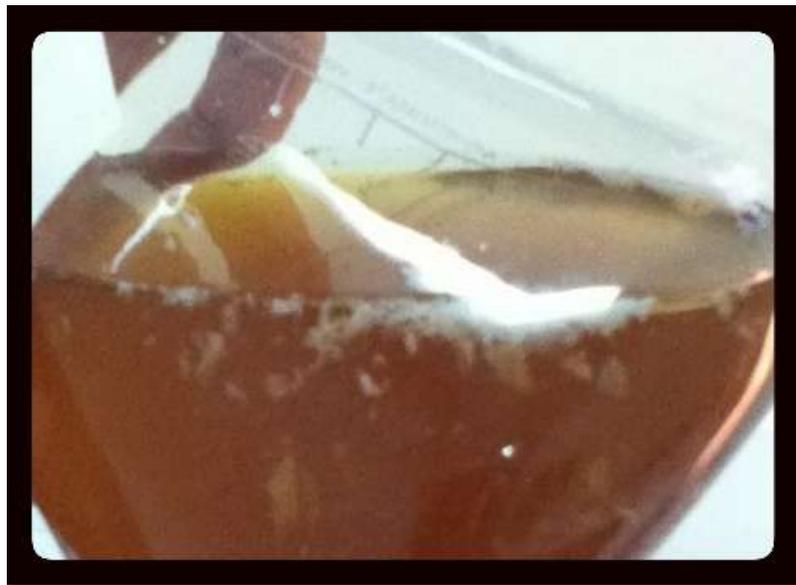


Figura 28. *B. licheniformis* en medio MMV con 8 g/L de melazas. Se observa la producción de polímero en el medio.

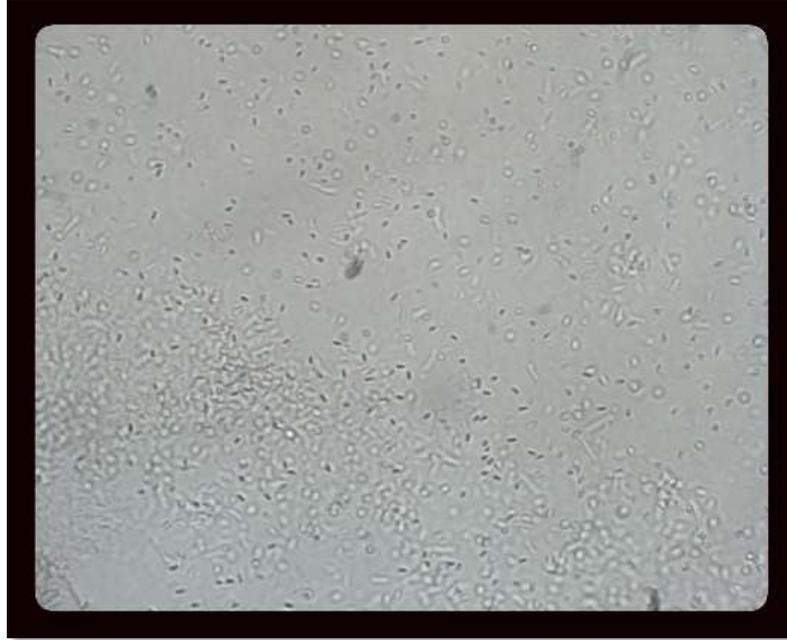


Figura 29. *B. licheniformis* en medio MMV con 8 g/L de melazas al final de la incubación (356 h). Células en forma de bacilos cortos (Magnificación 1000x).

El cultivo de *B. licheniformis* con 11 g/L de melazas se incubó durante 684 h a 30 °C, alcanzando una DO de 1.011 ± 0.023 . Durante la incubación se observó que el cultivo ya no presentó la producción de polímero; sin embargo, se pudo apreciar una etapa en la que las células sufrieron cambios morfológicos. El enquistamiento celular ocurrió únicamente durante las primeras 45 h de cultivo. Posteriormente, la bacteria regresó a su estado bacilar y así permaneció durante el resto de la incubación. A las 18 h se observó un cambio drástico en el color del medio, pasando de un color café oscuro a un café más claro y turbio por la producción de biomasa. Con este caldo se inóculo el medio MMV con 14 g/L de melazas.

El cultivo de *B. licheniformis* en el medio MMV con 14 g/L no presentó un crecimiento adecuado de la cepa, ya que después de las 500 h de incubación la DO

no fue mayor a 0.170. A pesar de esto, la bacteria permaneció en estado bacilar durante todo el proceso de incubación. Los resultados observados en este cultivo demuestran que la concentración de 14 g/L de melazas en el medio resultó inhibitoria para el microorganismo. Por lo tanto, la cantidad máxima de melazas para la producción de biomasa de *B. licheniformis* en el medio MMV es de 11 g/L.

En la figura 30 se muestran las curvas de crecimiento de la adaptación de *B. licheniformis* al medio MMV con 5, 8 y 11 g/L de melazas. Así como su velocidad de producción de biomasa (r_x), obtenida dividiendo la DO_{MAX} entre el tiempo de incubación en el que se alcanzó esta DO, sin tomar en cuenta la fase *lag* de crecimiento. Se puede observar que en el cultivo a 5 g/L el crecimiento ocurrió prácticamente en el estado enquistado. Este comportamiento puede indicar que *B. licheniformis* se inhibió inicialmente en el medio promoviendo tanto la producción de polímero como el enquistamiento celular. Sin embargo, a lo largo de la incubación, la bacteria fue capaz de crecer incluso en este estado alcanzando así su punto máximo de producción de biomasa. Posteriormente, hacia el final de la incubación, la bacteria regresó a su estado bacilar (Figura 30a).

En el cultivo a 8 g/L (Figura 30b), se observa que la etapa de enquistamiento fue más corta, lo cual puede indicar que *B. licheniformis* se adaptó de mejor manera al medio enriquecido con melazas (menor tiempo de inhibición que el cultivo anterior). Por último, en el cultivo a 11 g/L se observó que la etapa de enquistamiento es muy corta, no ocurre la formación de polímero y se alcanza una cantidad mayor de biomasa respecto a los cultivos de adaptación a 5 y 8 g/L de melazas (Figura 30c). La presencia de bacilos durante la mayor parte del tiempo de

incubación en este medio indica que muy probablemente la bacteria se adaptó de manera eficiente al medio enriquecido con melazas.

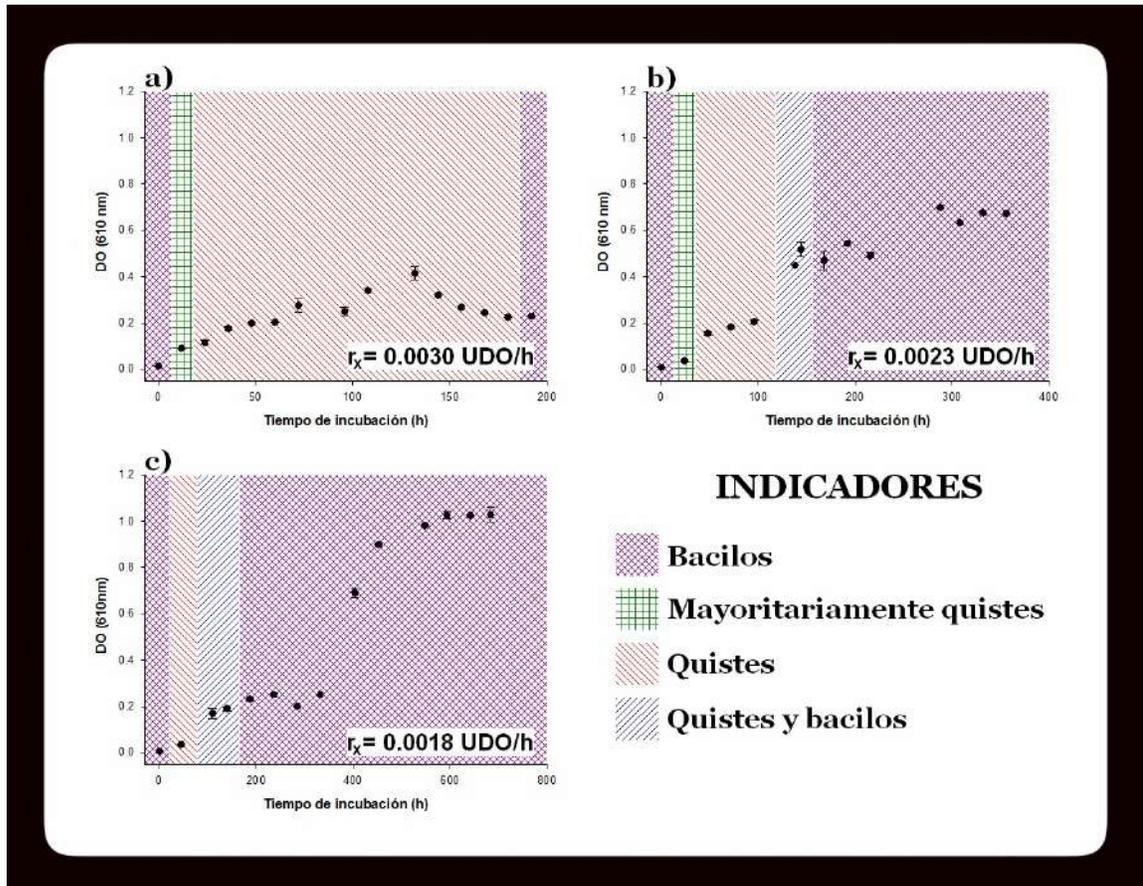


Figura 30. Crecimiento de *B. licheniformis* en medio MMV. a) Crecimiento a 5 g/L de melazas. b) Crecimiento a 8 g/L. c) Crecimiento a 11g/L. Se muestra el estado morfológico de las bacterias durante el cultivo y su velocidad de producción de biomasa (r_x) en unidades de densidad óptica por hora (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

Al inicio del cultivo en medio enriquecido con melazas la producción total de biomasa era muy pobre debido al cambio morfológico de la bacteria y a la

producción de polímero. En cuanto al cambio morfológico, se pudo observar que *B. licheniformis* es capaz de producir biomasa incluso en estado enquistado. El enquistamiento desapareció al final del proceso de adaptación, donde se observó claramente que las bacterias ya no cambiaron de estado. Durante este periodo, las bacterias permanecieron como bacilos la mayor parte del tiempo de incubación. Por otro lado, se pudo observar que la producción del polímero redujo la producción de biomasa de manera importante. Durante la producción de polímero las células se unieron entre sí para formar la capa de polímero. Esto causó que la distribución de las células en el medio no fuera uniforme, con lo que la producción de polímero pudo ser un factor de gran relevancia en la reducción de la productividad celular. Como se indicó anteriormente, al final del proceso de adaptación (cultivo con 11 g/L de melazas) ocurrió el cese de la formación del polímero. Tomando en consideración que la formación de polímero indica la falta de adaptación de la bacteria al medio, se puede aseverar que al final del proceso de cultivo por lote, *B. licheniformis* fue capaz de adaptarse adecuadamente al medio enriquecido con 11 g/L de melazas.

Por otra parte, en la Figura 30 se observa que la velocidad de producción de biomasa va disminuyendo conforme la cepa se adapta a las distintas concentraciones de melazas en el medio. Sin embargo éste efecto en la velocidad puede ser resultado del proceso de adaptación de la cepa al medio. Es decir que, al inocular el microorganismo a una concentración mayor de sustrato, la bacteria necesita también más tiempo para reajustar su metabolismo hacia la nueva constitución de nutrimentos del medio, lo cual influye en la velocidad de producción de células.

7.4. Análisis genético de las cepas de *B. licheniformis* adaptadas al medio enriquecido con melazas

Debido a que el proceso de adaptación de la cepa se realizó durante un largo periodo de tiempo, al final de la adaptación se corroboró mediante técnicas moleculares que el microorganismo adaptado era efectivamente *B. licheniformis* para descartar cualquier posible contaminación que pudiera haber ocurrido durante el proceso de adaptación. Para esto, se realizó la extracción y amplificación del gen ADNr 16S de la cepa de *B. licheniformis* adaptada a 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas conforme a las secciones 6.1.4.1 y 6.1.4.3. Posteriormente, se llevó a cabo la digestión del gen de acuerdo a la Sección 6.1.4.4 y se realizó la electroforesis de las cuatro muestras en gel de agarosa para analizar el patrón de bandeo obtenido (Figura 31). Cuando entre dos muestras se obtienen patrones de bandeo distintos se concluye que las dos cepas analizadas son genéticamente distintas; por otro lado, si el patrón de bandeo es igual entre las muestras se puede concluir que ambas cepas pertenecen a la misma especie bacteriana.

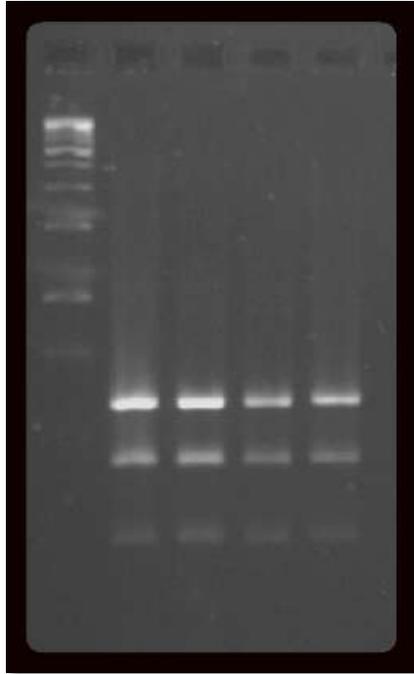


Figura 31. Patrón de bandeo de las cepas de *B. licheniformis* adaptadas al medio enriquecido con melazas. A la izquierda se muestra el marcador y a su derecha los patrones de bandeo del gen ADNr 16S de las cepa adaptadas a 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas respectivamente.

Considerando que el patrón de bandeo para cada muestra fue el mismo (Figura 31), se puede concluir que todas las cepas adaptadas a los medios enriquecidos con melazas pertenecen a la especie *B. licheniformis*. De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que los cambios observados en la morfología, en el consumo de sustrato y en la producción de biomasa durante el proceso de adaptación son debidos a los ajustes metabólicos del microorganismo durante este proceso.

7.5. Análisis de la asimilación de sustrato de la cepa de *B. licheniformis* adaptada al medio enriquecido con melazas

Una vez adaptada la cepa al medio enriquecido con melazas se llevó a cabo un análisis para evaluar el cambio en el metabolismo de la bacteria durante el proceso de adaptación. Para esto, se condujeron dos experimentos: 1) evaluación del cambio en el consumo de azúcares de la cepa adaptada y la no adaptada mediante análisis por HPLC; 2) inoculación de la cepa adaptada en el medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas, evaluándose la DO, el cambio en el color del medio y el contenido de azúcares totales al inicio y al final de la incubación.

7.5.1. Análisis del consumo de azúcares de la cepa *B. licheniformis* adaptada al medio enriquecido con melazas en comparación con la cepa no adaptada. Durante el proceso de adaptación de *B. licheniformis* al medio MMV enriquecido con 5 g/L de melazas, las muestras se analizaron mediante HPLC por triplicado, según lo reportado en la Sección 6.2.1.2 para evaluar el consumo de azúcares. Asimismo, una vez adaptado el microorganismo, se monitoreó el consumo de azúcares en el medio MMV con 11 g/L de melazas. En la Figura 32 se muestra el crecimiento de biomasa de ambos experimentos.

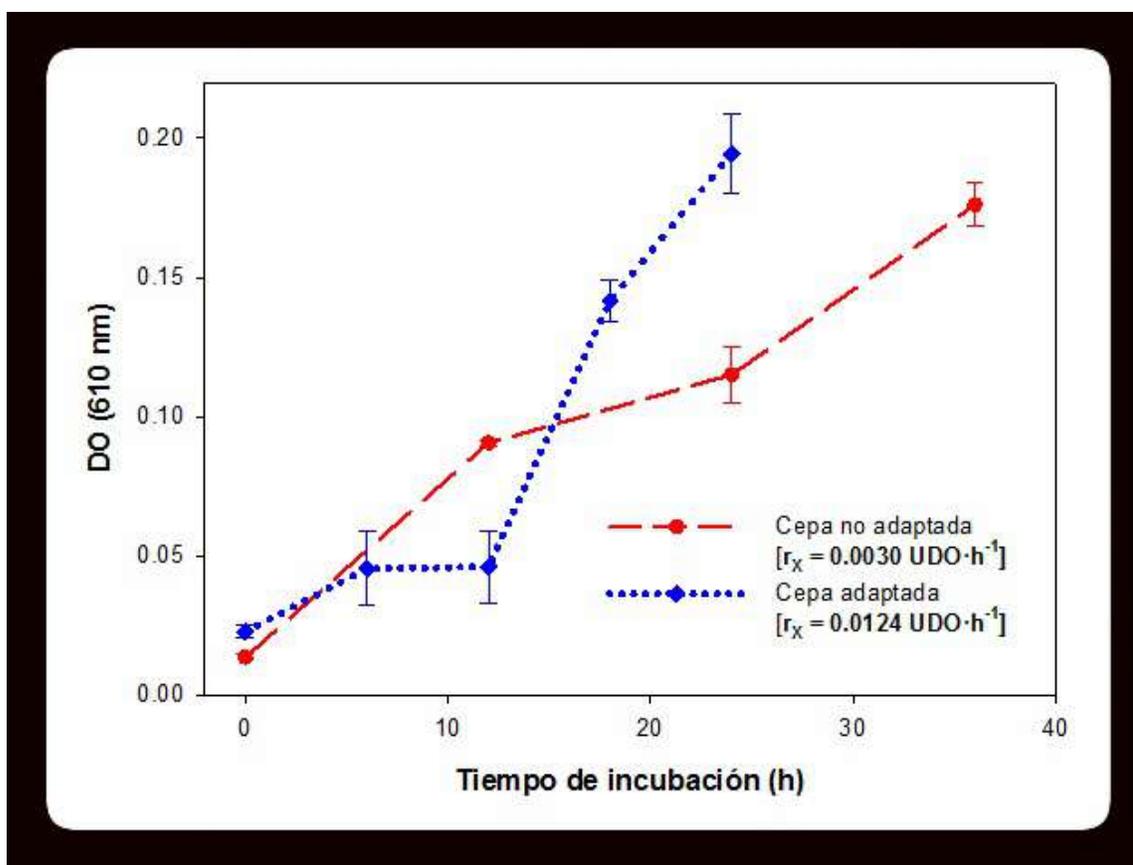


Figura 32. Crecimiento de la cepa de *B. licheniformis* adaptada y no adaptada a melazas en medio MMV con 5 y 11 g/L de melazas respectivamente (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

7.5.1.1. Análisis del consumo de sustrato de la cepa de *B. licheniformis* no adaptada. Se hizo un análisis de los cambios en la composición de azúcares durante el cultivo de la cepa no adaptada en el medio MMV con 5 g/L (Figura 33). Al inicio de la incubación (Figura 33a) se puede observar que el azúcar principal es la sacarosa con un tiempo de retención (t_R) de 13.8 min. Asimismo se alcanza a observar un pequeño pico de fructosa a un t_R de 19 min. A las 36 h de incubación (Figura 33b) la fructosa desaparece totalmente mientras que la sacarosa disminuye

ligeramente y se comienza a formar un pico a un t_R de 23.3 min (compuesto no identificado). Posteriormente, a las 72 h de incubación (Figura 33c), se observa una disminución del pico de sacarosa, un incremento del compuesto desconocido ($t_R = 23.3$ min) y la formación de un nuevo pico a un t_R de 15.66 min que al parecer se trata de glucosa cuyo ($t_R = 16$ min). A partir de este tiempo y hasta el final de la incubación (180 h de incubación, Figura 33d) la constitución de azúcares permanece constante.

Con lo anterior, se puede decir de manera general que *B. licheniformis* promovió la hidrólisis de la sacarosa (sólo hasta cierta cantidad) y fue capaz de usar la fructosa como fuente de carbono, ya sea como tal o mediante una biotransformación intermedia, previa a su asimilación (lo que podría explicar el compuesto con un $t_R = 23.3$ min). Se puede notar también que la bacteria no metabolizó la glucosa producida en la hidrólisis, por lo que esta quedó remanente en el medio. Un aspecto interesante es que a partir de las 72 h no se observó una disminución en el pico de sacarosa. Esta observación contrasta con el hecho de que la máxima DO observada ocurrió a las 132 h de cultivo (datos no mostrados). Es posible que el crecimiento de biomasa posterior a las 72 h haya ocurrido gracias a que el microorganismo empleó al biopolímero como fuente de sustrato.

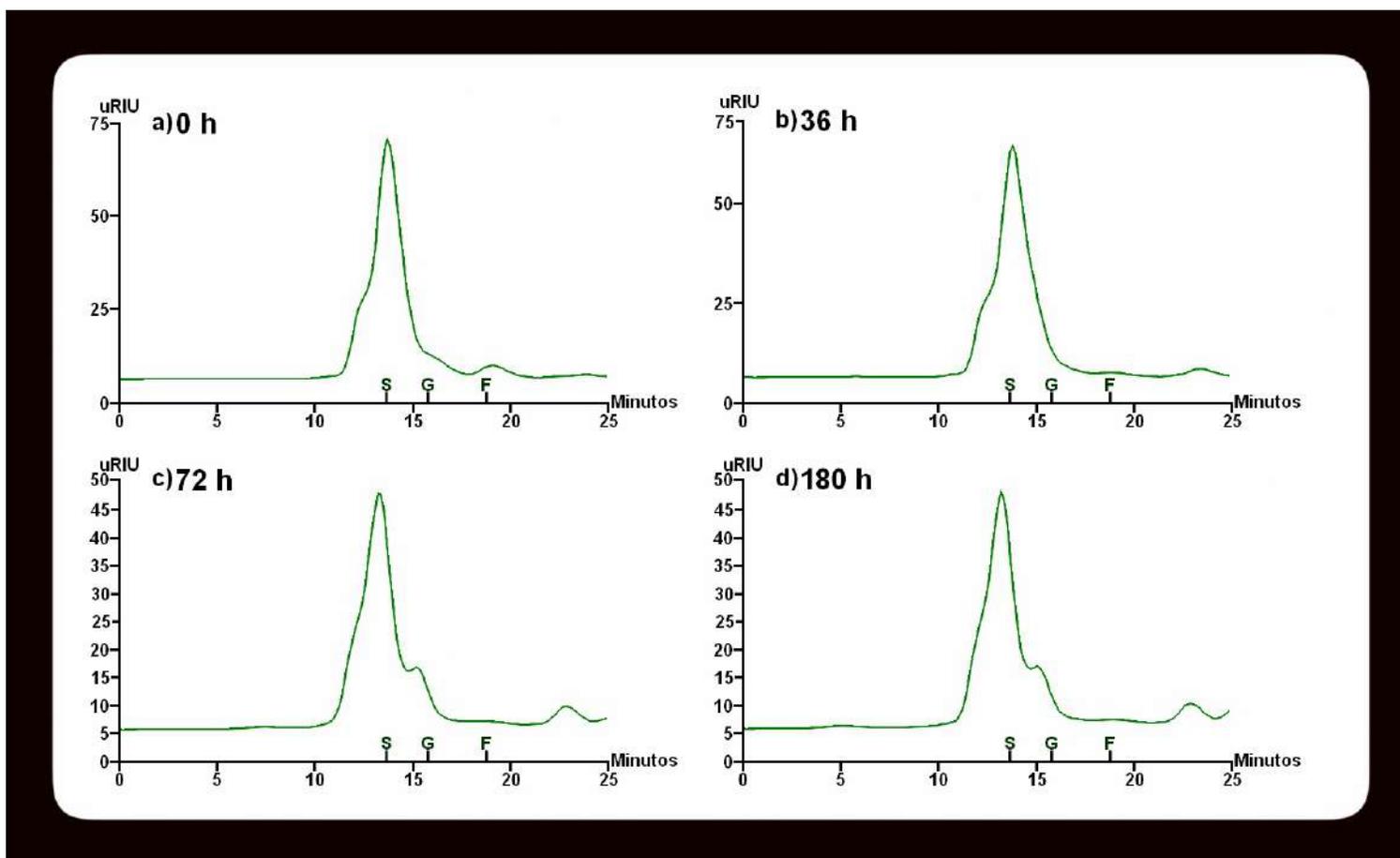


Figura 33. Análisis de azúcares consumidos por la cepa de *B. licheniformis* no adaptada, en el medio MMV con 5 g/L de melazas, a diferentes tiempos de cultivo: a) 0 h. b) 36 h. c) 72 h. d) al final de la incubación (180 h). En el eje x, se indican los t_R de los estándares de azúcares: S.- sacarosa, G.- glucosa, F.- fructosa.

7.5.1.2. Análisis del consumo de sustrato de la cepa de *B. licheniformis*

adaptada. En la Figura 34 se presentan algunos cromatogramas de las muestras del cultivo con 11 g/L de melazas con la cepa de *B. licheniformis* ya adaptada al medio. Al inicio del cultivo (Figura 34a) se observa un perfil similar al del inicio del cultivo sin adaptación (Figura 33a): un pico de sacarosa y un pico de fructosa. Hacia las 12 h de incubación (Figura 34b) el pico de fructosa desaparece totalmente, el pico de sacarosa disminuye considerablemente y comienza la formación de un nuevo compuesto (t_R de 18.1 min).

Posteriormente, a las 18 h de incubación (Figura 34c) el pico de sacarosa se divide en dos picos: uno desconocido con un $t_R = 13.2$ min y otro con un $t_R = 15.8$ min identificado como glucosa. Asimismo, se obtuvo un pico a un $t_R = 19.6$ min correspondiente a la fructosa. También se observa la formación de un pico alrededor de los 23 min, similar al observado en el análisis del cultivo a 5 g/L (Figura 33c). A las 24 h de incubación (Figura 34d), se observa que únicamente el pico de glucosa disminuye. En este punto del cultivo el microorganismo empleó la glucosa o la biotransformó para alcanzar su máxima producción de biomasa (Figura 32).

De las 24 a las 42 h de incubación (Figura 34e) ocurre una biotransformación, ya que el pico remanente de glucosa y el pico observado a un $t_R = 13.2$ min forman un producto que se observa a un $t_R = 14.6$ min. Es importante señalar que esta etapa corresponde a la fase de muerte del microorganismo (datos no mostrados). En este punto del cultivo celular, el compuesto formado ya no es asimilado por la bacteria. Lo mismo ocurrió para los demás compuestos

remanentes en la muestra. Al final de la incubación (Figura 34f), se observa que únicamente se acentuó la síntesis del producto con un $t_R =$ de 14.6 min.

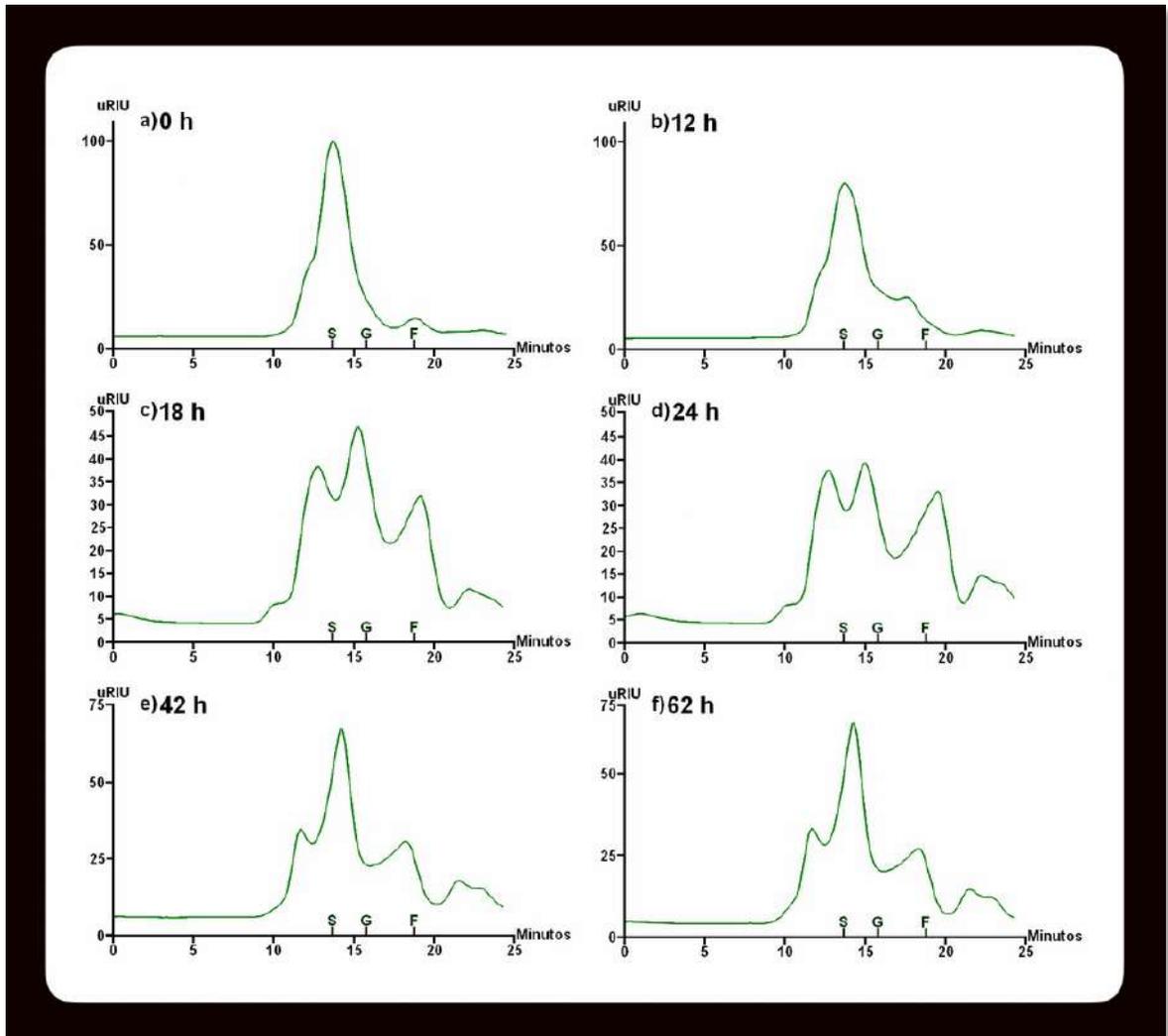


Figura 34. Análisis de azúcares consumidos por la cepa de *B. licheniformis* adaptada, en el medio MMV con 11 g/L de melazas, a diferentes tiempos de cultivo: a) 0 h. b) 12 h. c) 18 h. d) 24 h. e) 42 h. f) 62 h. En el eje x, se indican los t_R de los estándares de azúcares: S.- sacarosa, G.- glucosa, F.- fructosa.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que antes de la adaptación *B. licheniformis* hidroliza la sacarosa y posteriormente utiliza la fructosa como fuente de carbono. Asimismo la cepa probablemente utiliza el biopolímero sintetizado en las primeras horas de incubación o las melanoidinas presentes en el medio para alcanzar su punto máximo de producción de biomasa. Una vez adaptado, el microorganismo no sólo fue capaz de metabolizar fructosa (al principio del cultivo), sino que también aprovechó los productos obtenidos a partir de la hidrólisis de la sacarosa. A partir de esto, el microorganismo produjo 5 distintos compuestos; de los cuales, el identificado como glucosa, le permitió alcanzar el punto máximo de producción de biomasa. Después de esto, la cepa no fue capaz de asimilar los demás compuestos formados. Esto indica que *B. licheniformis* modificó su metabolismo de tal manera que logró emplear a uno de los derivados de los sustratos presentes como fuente alternativa de carbono con respecto a la fructosa.

7.5.2. Crecimiento de la cepa de *B. licheniformis* adaptada en medio MMV con 5, 8, 11 y 14 g/L de melazas. En la Figura 35 se observan las curvas de crecimiento de los cultivos de *B. licheniformis* a distintas concentraciones de melazas. Se puede observar que en general el crecimiento total es menor en comparación con el crecimiento observado durante la adaptación (Figura 30); los datos más altos estuvieron alrededor de 0.4 de absorbancia. Sin embargo, el crecimiento de la cepa adaptada se da a una velocidad mayor. Al evaluar este aspecto, se debe tomar en cuenta que la cepa adaptada ya no produce

polímero al inocularse en el medio. El polímero influía en dos aspectos sobre las curvas de crecimiento: 1) elevando la densidad óptica, al interferir los flóculos poliméricos en la medición de la absorbancia; y 2) continuando la producción de biomasa en las fases avanzadas de cultivo, aunque a velocidades de producción de biomasa muy bajas: 0.0018 - 0.003 UDO·h⁻¹. Esta producción de biomasa se debe posiblemente a que durante esta etapa el polímero era usado por el microorganismo como una fuente alternativa de carbono.

Se puede notar que el mejor crecimiento se dio en el cultivo de *B. licheniformis* en el medio MMV con 11 g/L. A pesar de que el cultivo con 14 g/L resultó en cantidades similares a las del medio con 11 g/L, esta concentración no se tomó en cuenta debido a que implica la adición de mayor cantidad de sustrato para conseguir la misma cantidad de células.

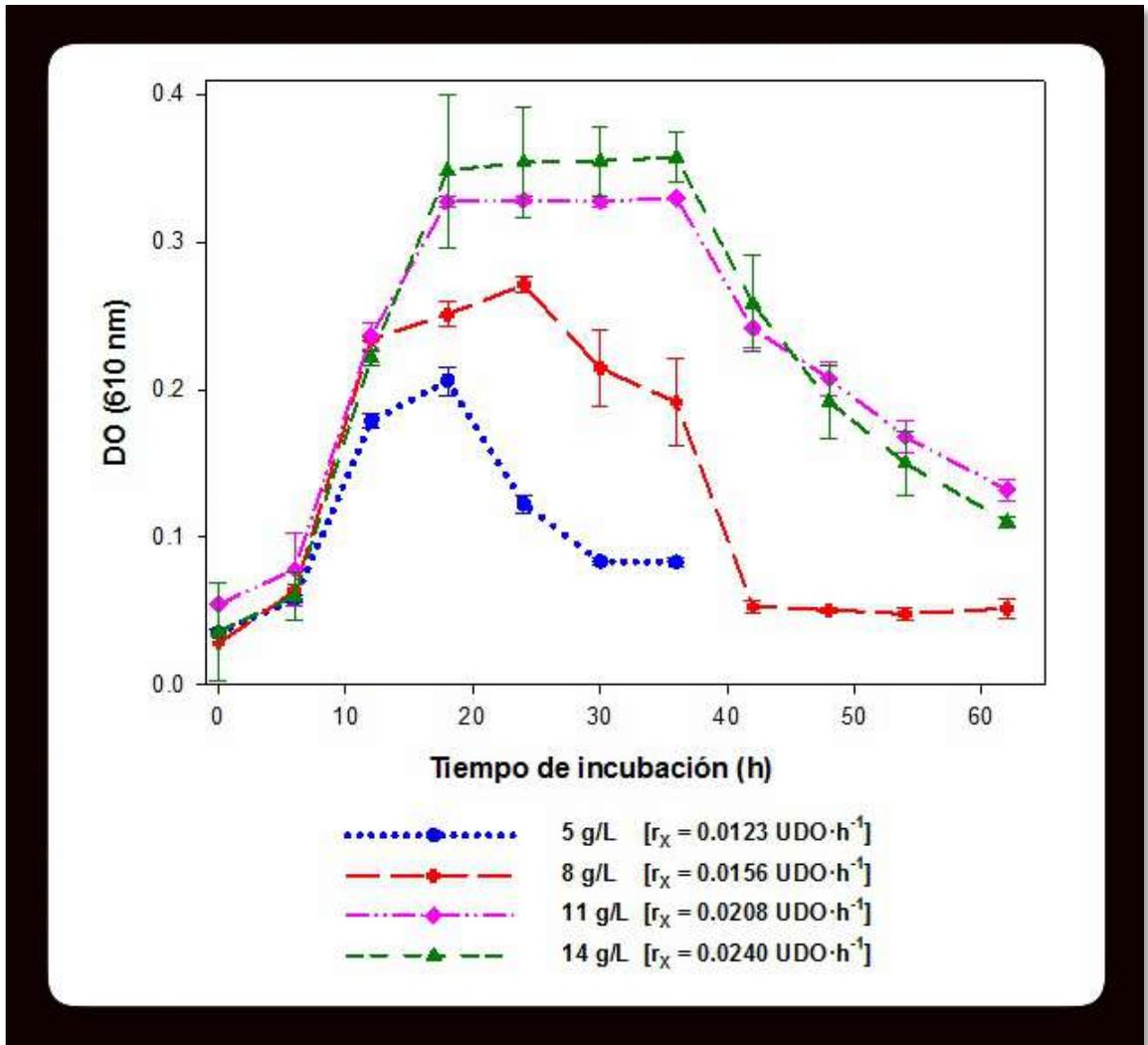


Figura 35. Crecimiento de la cepa de *B. licheniformis* adaptada a melazas en el medio MMV a distintas concentraciones de melazas (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

7.5.2.1. Análisis del consumo de azúcares. Se cuantificó la cantidad de azúcares totales en los medios a distintas concentraciones de melazas previo a la inoculación y al final de los cultivos (Figura 36).

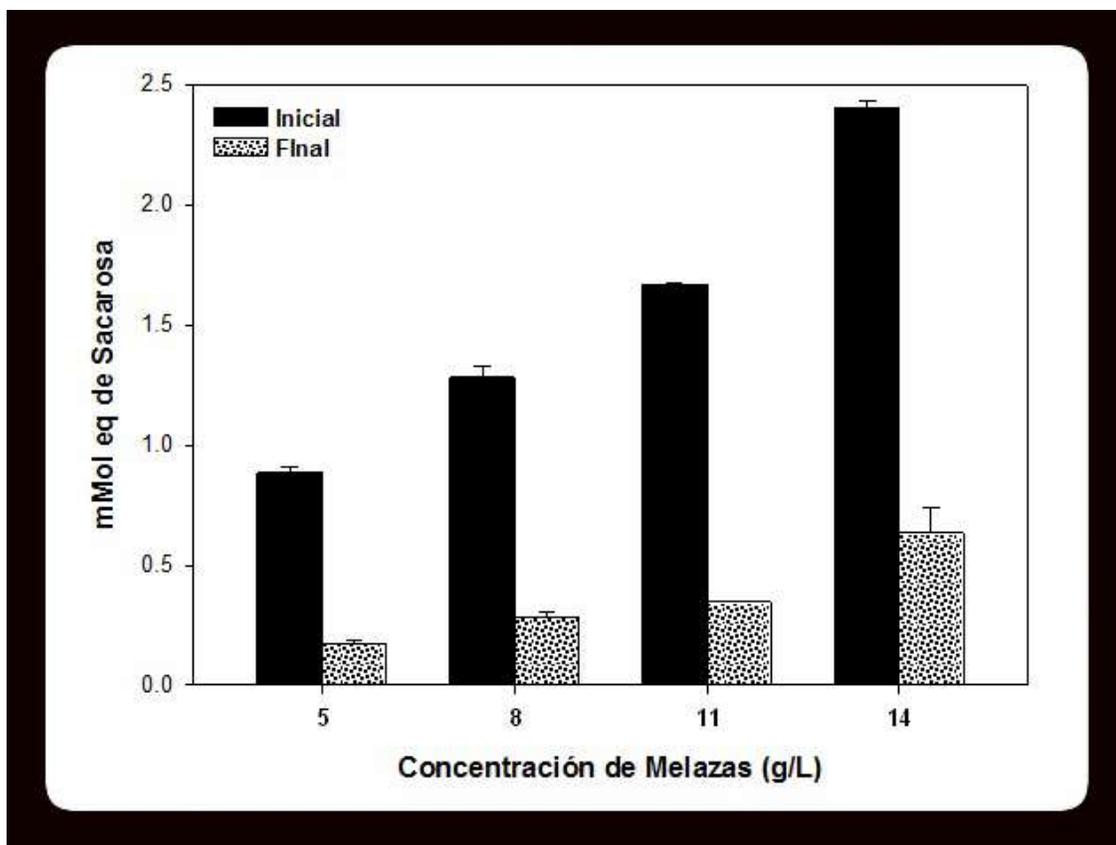


Figura 36. Concentración inicial y final de azúcares en el medio MMV a distintas concentraciones de melazas (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

En general, se puede observar que existen remanentes de sacarosa, fructosa o glucosa en el medio, así como otros derivados que no fueron identificados pero que se sabe de su presencia por los resultados de HPLC (Sección 7.5.1). El porcentaje de consumo de azúcares y el rendimiento de biomasa de los cultivos se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Consumo de sustrato y rendimiento celular por parte de *B. licheniformis* en medio MMV con distintas concentraciones de melazas.

Concentración de melazas	Consumo de sustrato (%) [intervalo de confianza del 95%]	Y_{x/s} (UDO/mmol eq de Sacarosa) [Intervalo de confianza del 95%]
5 g/L	80.766 ± 1.456	0.249 ± 0.004
8 g/L	78.155 ± 1.704	0.251 ± 0.005
11 g/L	79.219 ± 0.207	0.250 ± 0.001
14 g/L	73.716 ± 4.400	0.202 ± 0.012

En base a la Tabla 8, se puede observar que *B. licheniformis* consume prácticamente el mismo porcentaje de azúcares en todos los medios, a excepción del cultivo de 14 g/L de melazas en el cual parece haber menor consumo de sustrato. No obstante, el intervalo de confianza empleado indica que hubo mucha variabilidad en la utilización de azúcares. De igual manera podemos observar que el rendimiento de biomasa es similar en todos los cultivos a excepción del cultivo de 14 g/L.

Esto puede indicar que al emplear 14 g/L de melazas en el medio MMV ocurre cierta inhibición de las capacidades metabólicas del microorganismo debido a algunos otros componentes presentes en las melazas. Es probable que debido a esto, la cepa se logró adaptar únicamente hasta 11 g/L de melazas.

7.5.2.2. Análisis del cambio de color durante la incubación. Las melanoidinas son compuestos no pirolíticos formados por las reacciones de Maillard entre aminoácidos y azúcares reductores en presencia de humedad y calor

(Repetto y Camean 1995). Estas sustancias coloridas van desde el amarillo claro hasta el café oscuro, o incluso negro. La gama de colores formados se debe a una amplia absorción del espectro visible por parte de diversos cromóforos. Su estructura química es muy compleja; se ha demostrado la presencia de numerosos dobles enlaces de aminoácidos y distintos grupos heterocíclicos (Dergal 1993). Estos compuestos son los encargados del color característico de las melazas de la caña de azúcar, y su presencia en éste y otros efluentes agroindustriales, provoca que su tratamiento se complique al emplear procesos biológicos (Singh 2006). No obstante se han reportado investigaciones en las cuáles se emplea *Bacillus* spp. y *B. licheniformis* para degradar estos compuestos coloridos (Chandra et al. 2008; Bharagava et al. 2009; Bharagava y Chandra 2010).

Se realizó la evaluación del color del medio antes y después del crecimiento de *B. licheniformis* en los medios a distintas concentraciones de melazas para evaluar el consumo de melanoidinas por parte del microorganismo. Asimismo, es interesante conocer si hay una relación entre el consumo de melanoidinas y la producción de biomasa. En la Tabla 9 se reportan los valores de L^* , a^* , y b^* de los medios antes y después del crecimiento de *B. licheniformis*.

Tabla 9. Cambios de color en el medio MMV antes y después de la incubación de *B. licheniformis*.

Melazas	Color previo a la inoculación			Color al final de la incubación		
	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
5 g/L	20.110	-1.497	7.733	24.373	-2.293	6.395
	±0.027	±0.005	±0.023	±0.365	±0.000	±0.090
8 g/L	21.000	-1.510	12.307	27.743	-2.648	12.787
	±0.027	±0.018	±0.037	±1.136	±0.030	±0.513
11 g/L	21.037	-0.603	18.067	26.463	-1.573	20.145
	±0.011	±0.011	±0.030	±0.462	±0.042	±0.039
14 g/L	16.530	1.673	19.520	22.510	0.188	22.983
	±0.037	±0.021	±0.037	±0.740	±0.104	±0.522

Los datos fueron obtenidos empleando un intervalo de confianza del 95%

En base al comportamiento observado en la Tabla 9 se comprueba que en general existe un cambio de color después de que *B. licheniformis* crece en el medio enriquecido con melazas. El aumento en el parámetro *L** indica que el medio se tornó más claro. Por otro lado el aumento del parámetro *b** indica que el color tiende más hacia el amarillo, mientras que la disminución en el valor *a** indica que el medio se tornó más verde (en la escala negativa) o menos rojo (en la escala positiva). Con esto se puede decir que *B. licheniformis* logra aclarar (reducir el valor de *L**) el medio enriquecido con melazas, por lo que se puede inferir que este microorganismo puede ser capaz de metabolizar las melanoidinas presentes en el medio.

Un parámetro que puede contribuir a establecer la diferencia del color de los medios antes y después del crecimiento de *B. licheniformis*, es la diferencia de color denominada ΔE que se determina con la siguiente ecuación (Muñoz 2011):

$$\Delta E = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (4)$$

Donde el subíndice 2 representa al medio previo a la inoculación y el subíndice 1 corresponde a las muestras después de la incubación de *B. licheniformis* en el medio. En base a esta ecuación se obtuvieron los resultados reportados en la Tabla 10.

Tabla 10. Valor ΔE de los medios enriquecidos con melazas después del crecimiento de *B. licheniformis*.

Concentración de Melazas	ΔE (\pmDesviación estándar)
5 g/L	4.541 \pm 0.228
8 g/L	6.872 \pm 0.835
11 g/L	5.892 \pm 0.322
14 g/L	7.067 \pm 0.651

Se establece que el ojo humano percibe la diferencia entre dos colores cuando el valor de ΔE es mayor a 1 (Schwiegerling 2004). Por lo tanto se concluye que el color del medio antes y después del crecimiento de *B. licheniformis* es significativamente

distinta para los estándares de visión humana. Esto a su vez nos lleva a la conclusión de que *B. licheniformis* es capaz de asimilar metabólicamente las melanoidinas del medio, posiblemente para su mantenimiento o crecimiento. Estos resultados están de acuerdo con Bharagava et al. (2009) y Bharagava y Chandra (2010), que aislaron una variedad de *B. licheniformis* capaz de degradar las melanoidinas presentes en los efluentes de la producción de etanol.

7.6. Ensayo en reactor de la cepa adaptada empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas

Se llevó a cabo el cultivo por lote de la cepa adaptada en un reactor de 3 L empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas. En la Figura 37 se muestra la curva de crecimiento de *B. licheniformis* en el reactor. El tiempo total de cultivo fue de 38 h, alcanzándose una DO de 0.6695 ± 0.0005 al final del experimento.

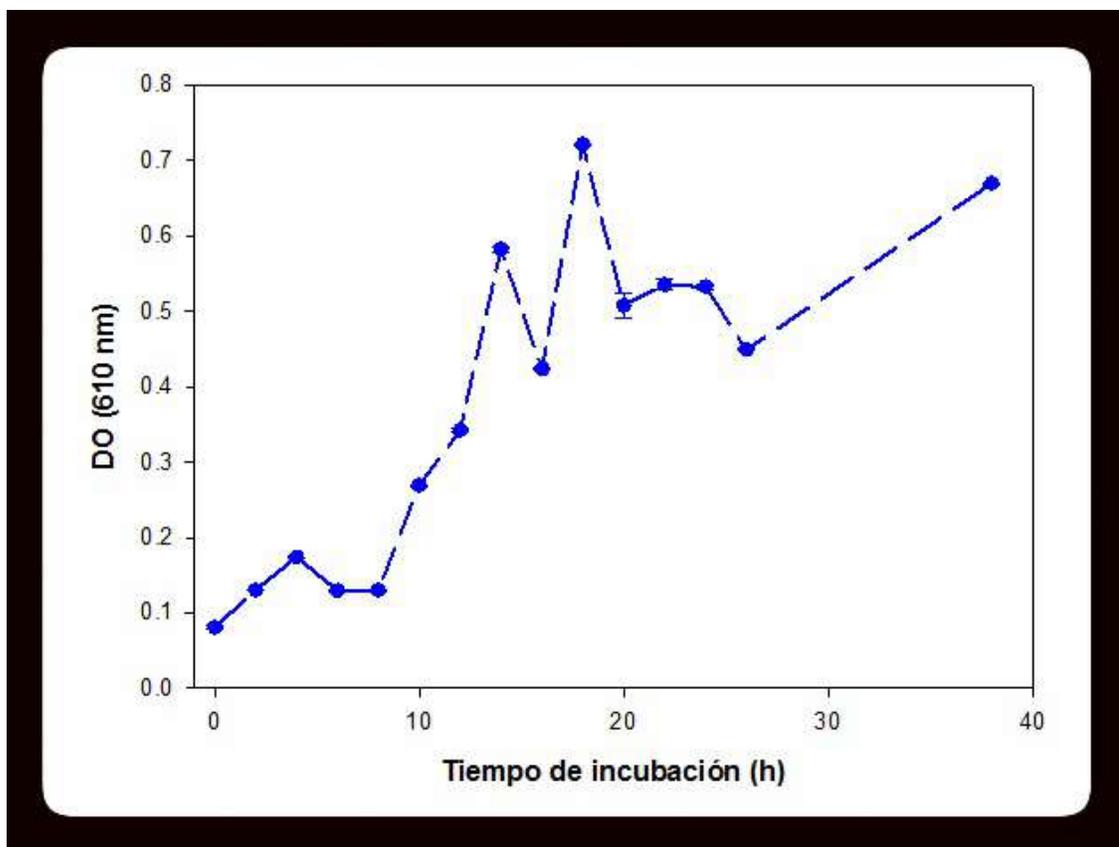


Figura 37. Crecimiento de la cepa de *B. licheniformis* en reactor por lote de 3 L usando el medio MMV con 11 g/L de melazas (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

Se puede observar que se alcanzó prácticamente el doble de biomasa respecto a los ensayos en matraz ($DO_{\text{máx}} = 0.33$). Es evidente que el control del pH y la agitación constante, dos factores sobre los cuales no se tiene control en los ensayos en matraz, contribuyeron a obtener un mayor rendimiento de biomasa de *B. licheniformis* en el reactor.

El porcentaje de consumo de sustrato fue del $88.956\% \pm 0.029$ y el rendimiento celular ($y_{X/S}$) fue de 0.4910 ± 0.0001 UDO/mmol eq de sacarosa (con un intervalo de confianza del 95%). Esto representa aproximadamente un aumento

del 9.7% en el consumo de azúcares respecto al cultivo en matraz, lo cual provoca la elevación de la producción de biomasa en un 100%. Con estos resultados podemos concluir que empleo del biorreactor agitado con control de temperatura y pH empleado contribuyó de manera efectiva a elevar el rendimiento de biomasa optimizando el consumo de sustrato en el medio.

A cada intervalo de muestreo se midió el color del medio después de centrifugar la biomasa. Los cambios en los parámetros L^* , a^* y b^* durante la corrida en el reactor se muestran en las Figuras 38, 39 y 40. En la Figura 38 se puede observar que la luminosidad del medio descendió durante la corrida del reactor, indicando que el medio se tornó más oscuro a medida que ocurría el cultivo celular. Este comportamiento es contrario a los resultados obtenidos en matraz (Tabla 9), donde se observó que para todos los medios ensayados el valor de L^* aumenta desde el punto de la inoculación hasta el final de la incubación, indicando un cambio en el medio de oscuro a claro.

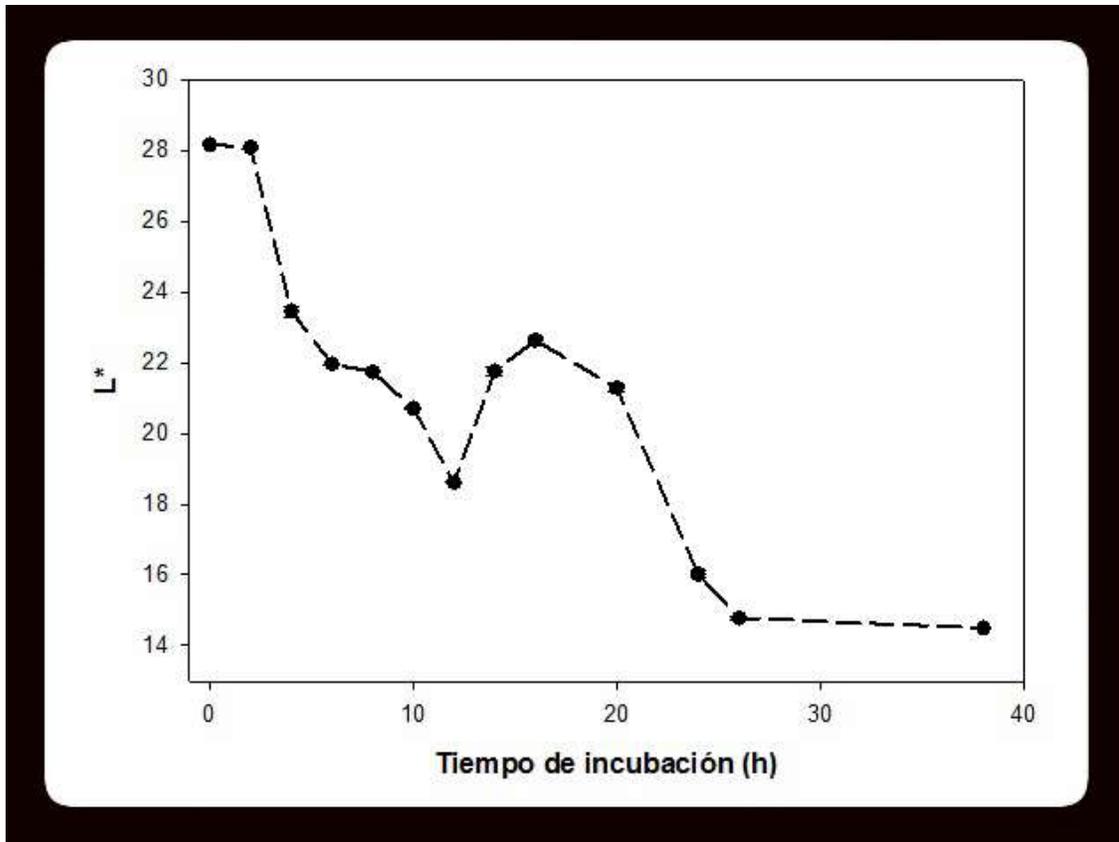


Figura 38. Cambios en el parámetro de color L^* durante la incubación en reactor empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

En la Figura 39 se observa el comportamiento del parámetro de color a^* que indica primero una disminución de los tonos rojos del medio en el intervalo de tiempo de las 4 a las 8 h, pasando de un valor de a^* de 0 a -0.9. Este comportamiento es similar al observado a nivel matraz. Sin embargo, después de las 8 h ocurre un enrojecimiento continuo del medio hasta el final del cultivo alcanzando un valor final de $a^* = 1.1$. Este comportamiento también es contrario al observado en los ensayos en matraces (Tabla 9), en los que el valor de a^* disminuyó desde el punto

de la inoculación hasta el punto final de la incubación para todas las concentraciones.

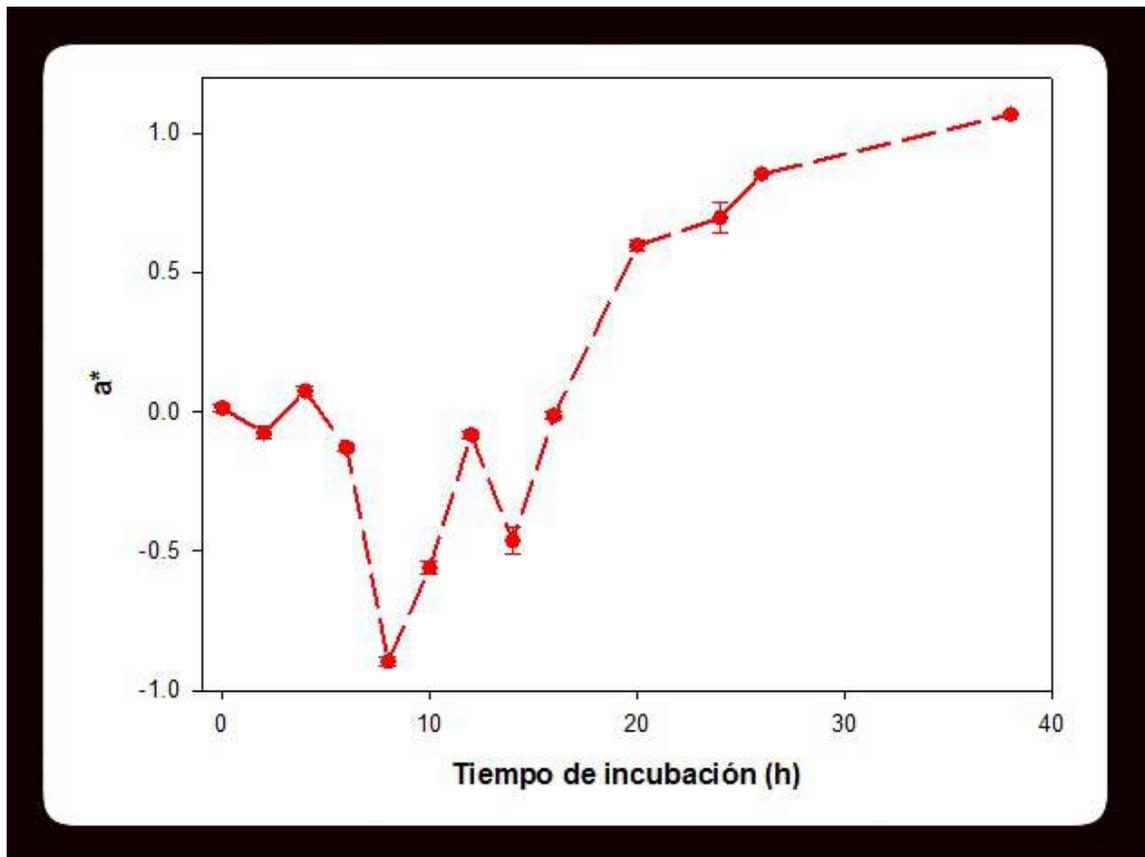


Figura 39. Cambios en el parámetro de color a^* durante la incubación en reactor empleando en el medio MMV con 11 g/L de melazas (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

En la Figura 40 se observa el comportamiento del parámetro de color b^* a lo largo del periodo de incubación. En general se observa una tendencia decreciente, que indica que el color cambia del amarillo ($+b$) hacia el azul ($-b$). Esta tendencia vuelve a ser opuesta a los resultados de los ensayos en matraz (Tabla 9), aunque en

ambos casos el comportamiento de este parámetro no sigue una tendencia definida.

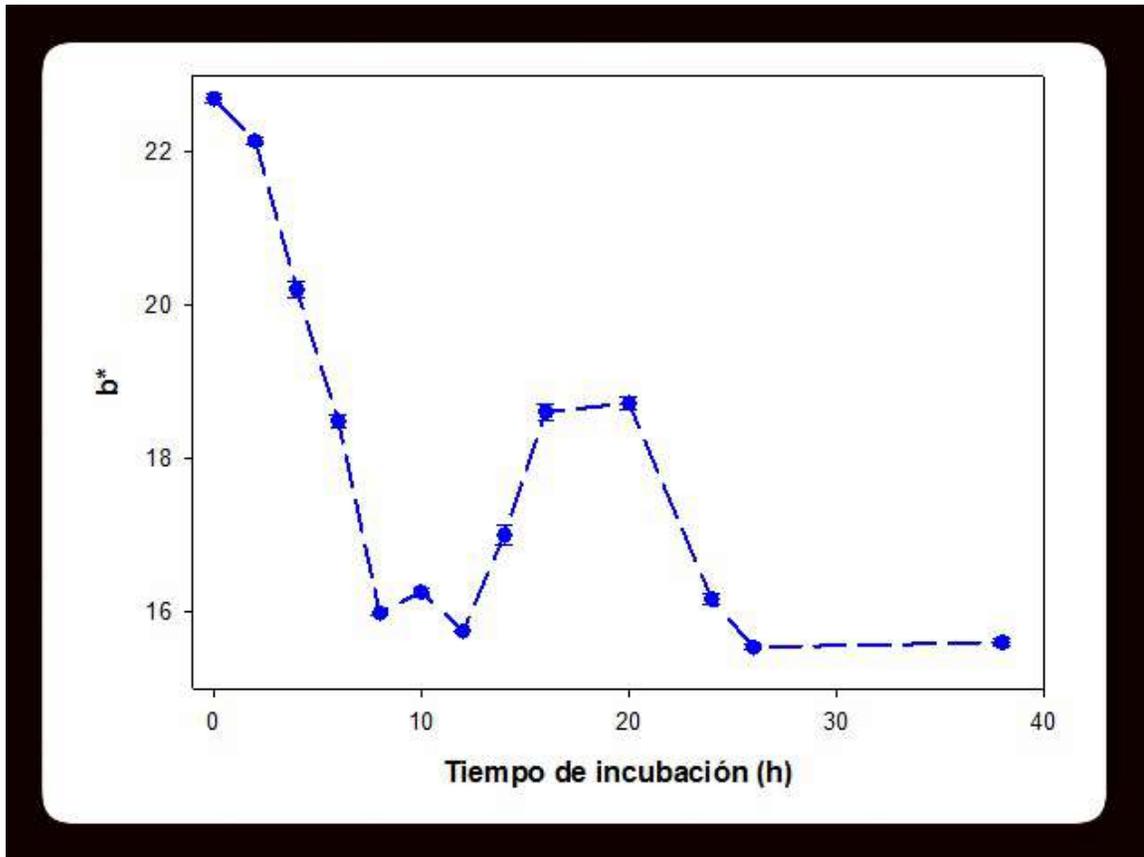


Figura 40. Cambios en el parámetro de color b^* durante la incubación en reactor empleando el medio MMV con 11 g/L de melazas (Las barras de error corresponden a un intervalo de confianza del 95%).

En base a los parámetros CIELab observados se puede concluir que el medio en general se torna más oscuro y más rojizo durante el crecimiento de *B. licheniformis* en reactor. Esto podría indicar que la bacteria no consume las sustancias coloridas presentes en el medio.

A pesar de que estos resultados son contradictorios en relación a los resultados en matraz, se debe notar que en el cultivo en reactor hubo una mejor utilización de los azúcares presentes en el medio así como un crecimiento mejorado de la biomasa con respecto a los experimentos en matraz. De acuerdo a lo anterior, se puede hacer la hipótesis de que el hecho de que las condiciones en el reactor ayudaron a optimizar el consumo de los azúcares (o de sus productos de biotransformación) presentes en el medio, provocó que *B. licheniformis* no empleara las melanoidinas como fuente de carbono y por tal razón el medio no sufrió un esclarecimiento durante el desarrollo del cultivo en el reactor.

Por otra parte, hacia las 38 h de incubación se observó que el cultivo alcanzó el punto máximo de producción de biomasa. En este punto también se determinó que la cantidad de azúcares se encontraba ya en cantidades residuales en el medio. Este resultado ayuda a reforzar la hipótesis anterior, pues al parecer el microorganismo contó con azúcares necesarios durante el tiempo de cultivo celular evaluado.

7.7. Producción de inoculantes

7.7.1. Inoculante con almidón. Se obtuvieron 1130 g de inoculante con almidón. Este inoculante se almacenó en doble bolsa de polipapel y se almacenó a 4 °C para prevenir contaminación. En la Figura 41 se muestra el secado que se llevó a cabo para la obtención del polvo.



Figura 41. Preparación del inoculante usando almidón como acarreador. a) Se observan las charolas de aluminio sobre las que se llevó a cabo el secado del material. b) El polvo una vez seco.

7.7.2. Inoculante con suelo. Se obtuvieron 1900 g de inoculante con suelo seco, el cual se almacenó en doble bolsa de polipapel a 4 °C. En la Figura 38 se observa la pasta de suelo sobre las charolas de acero, previo al secado.



Figura 42. Inoculante usando suelo como acarreador previo al secado tangencial.

La preparación de las semillas para la inoculación en campo, se llevó a cabo conforme a la Sección 6.3.3. De esta manera se obtuvo la semilla impregnada de inoculante, la cual se empleó para el estudio en cultivos de maíz.

7.8. Evaluación de los inoculantes en cultivos de maíz

7.8.1. Altura y diámetro de la planta. En la Tabla 11 se muestran los promedios y desviaciones estándar de las mediciones de altura y diámetro de las plantas, evaluados a los tres meses de iniciado el cultivo. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). El tratamiento de *B*.

licheniformis con almidón como acarreador y sin fertilización química no produjo las plantas suficientes para poderse tomar en cuenta en el análisis estadístico.

Tabla 11. Resultados de altura y diámetro de la planta a los 3 meses del cultivo en invernadero.

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (cm)
Testigo	132.500 ^{ab} ± 6.801	1.0675 ^{abc} ± 0.1300
Li-A-25	157.500 ^a ± 7.228	1.0025 ^{abc} ± 0.1099
Li-A-50	146.750 ^{ab} ± 15.254	1.3950 ^a ± 0.1408
Li-S	88.750 ^c ± 17.398	0.8800 ^{bc} ± 0.1573
Li-S-25	145.000 ^{ab} ± 13.096	1.3600 ^a ± 0.1903
Li-S-50	140.000 ^{ab} ± 7.649	1.2375 ^{abc} ± 0.1882
DMS*	32.815	0.4047

DMS = Diferencia mínima significativa.

Las diferencias significativas entre los tratamientos se denotan por superíndices diferentes.

La altura de la planta fue el parámetro de crecimiento más sensible a los diferentes tratamientos, por lo que a continuación se realiza la discusión en relación a este parámetro. En la Tabla 11 se puede observar que el tratamiento en el que no se empleó fertilizante químico (Li-S) mostró un crecimiento muy pobre con respecto

al testigo (100% de fertilización). Asimismo es notable que no hay ninguna diferencia significativa en el crecimiento con respecto al acarreador utilizado (almidón o suelo).

Por otra parte, se observa que las alturas de las plantas de los tratamientos de *B. licheniformis* con los niveles de fertilización de 25 y 50% de la dosis recomendada para la Región Mixteca son estadísticamente iguales al testigo. Esto indica que si se emplea cualquiera de estos dos tratamientos, se puede obtener un crecimiento igual al del testigo.

7.8.2. Clorofila. Las mediciones y la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) se muestran en la Tabla 12. El tratamiento de *B. licheniformis* en almidón sin fertilización química (Li-A) no presentó las réplicas suficientes para tomarse en cuenta en el análisis.

Tabla 12. Índice de clorofila en la plantas de maíz a los 5 meses de cultivo.

Tratamiento	Unidades
Testigo	174.000 ^a
Li-A-25	171.250 ^a
Li-A-50	172.750 ^a
Li-S	88.500 ^c
Li-S-25	140.000 ^b
Li-S-50	145.000 ^b
DMS*	24.929

DMS = Diferencia mínima significativa.

Las diferencias significativas entre los tratamientos se denotan por superíndices diferentes.

En la Tabla 12 se puede observar que las muestras del tratamiento sin fertilizante químico presentan un contenido de clorofila significativamente menor con respecto al contenido del testigo. Asimismo, los tratamientos en los que se empleó *B. licheniformis* con almidón como acarreador mostraron una concentración de clorofila igual al testigo (100% de la dosis de fertilización química recomendada). Por otro lado los tratamientos de *B. licheniformis* con suelo resultaron en niveles de clorofila significativamente menores al testigo.

7.8.3. Producción de grano. Los resultados de la producción de grano y el análisis de comparación de medias de Tukey se muestran en la Tabla 13. El tratamiento de *B. licheniformis* con almidón como acarreador y sin fertilización

química (Li-A) no produjo los suficientes frutos para ser considerado en los resultados.

Tabla 13. Peso del grano de maíz al final del cultivo en invernadero.

Tratamiento	Peso de grano producido (g)
Testigo	23.500 ^{cb}
Li-A-25	13.500 ^d
Li-A-50	43.250 ^a
Li-S	6.250 ^e
Li-S-25	14.000 ^d
Li-S-50	21.250 ^c
DMS*	6.428

DMS = Diferencia mínima significativa.

Las diferencias significativas entre los tratamientos se denotan por superíndices diferentes.

El tratamiento en el que no se empleó fertilización química resultó en rendimientos de grano mucho menores que los obtenidos para el testigo. Asimismo, se observa que al emplear *B. licheniformis* con almidón como acarreador y un 50% de fertilización química se obtuvo la máxima producción de grano, obteniéndose un rendimiento significativamente mayor al del testigo. Se pudo notar también que existe diferencia significativa entre el empleo de almidón ó suelo como acarreador cuando se emplea un 50% de la fertilización química recomendada, siendo significativamente mejor el almidón.

7.8.4. Efectividad de los tratamientos biofertilizantes. Se puede concluir que el hecho de que las plantas sin fertilización química hayan mostrado crecimientos y rendimientos muy pobres, demuestra que el empleo de biofertilizantes por sí solo en los cultivos no garantiza el crecimiento de las plantas puesto que es necesario cierto aporte nutrimental al suelo para sostener el crecimiento de la planta. Por esta razón se vuelve necesaria la adición de determinada concentración de fertilización para que el biofertilizante pueda promover una mayor absorción de éstos nutrientes y así contribuir a la optimización en el rendimiento de los cultivos.

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en determinar en qué porcentaje se puede reducir la utilización de fertilizantes químicos, para con ello reducir la contaminación del suelo y los costos de fertilización. A partir del análisis de resultados, se concluye que mediante el uso de *B. licheniformis* se puede reducir la dosis de fertilización química hasta en un 50% del valor recomendado para la Región Mixteca.

En el estudio se determinó que el uso del inoculante más el 25% de la dosis de fertilización química ayudó a lograr resultados estadísticamente similares en cuanto al crecimiento de la planta de maíz. Por otro lado, se puede lograr un rendimiento en la producción de grano estadísticamente mayor al testigo siempre y cuando se utilice la formulación de *B. licheniformis* empleando almidón como acarreador y el 50% de la fertilización química recomendada para la Región Mixteca.

8. CONCLUSIONES

8.1. Características de la cepa de *B. licheniformis* aislada

A partir de una muestra de suelo rizosférico se pudo aislar una cepa bacteriana identificada como *B. licheniformis* con un porcentaje de identidad del 99% con *B. licheniformis*, mediante el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S. La temperatura óptima de crecimiento de la cepa es de 30 °C.

En medios líquidos el microorganismo es capaz de cambiar de morfología, produciendo células alargadas denominadas “quistes” que al ser reinoculadas en un medio sólido retoman su forma bacilar. El microorganismo es capaz de reproducirse tanto en su forma enquistada como bacilar.

Este microorganismo también produce un biopolímero insoluble cuando es cultivado en diversos medios de cultivo líquidos. De acuerdo a los resultados reportados por Kaynar y Beyalty (2007) este polímero posiblemente es poli- β -hidroxibutirato. Al ser observado al microscopio, el polímero parece conformarse de una red de células bacilares o enquistadas agrupadas entre sí que forman una

capa polimérica que puede ser observable a simple vista sobre la superficie del medio.

La cepa es potencialmente capaz de fijar nitrógeno considerando que para su aislamiento se utilizaron medios de cultivo deficientes de nitrógeno. Por otro lado, *B. licheniformis* es incapaz de crecer en presencia de glicerol y crece pobremente empleando glucosa y ácido málico como sustratos, con la concomitante producción de biopolímero en todos los casos. Se puede utilizar medio LB-T (Tilak et al 2010) como medio de enriquecimiento celular tanto en forma sólida como líquida. La bacteria se pigmenta de un color rojo escarlata en presencia del colorante Rojo Congo en medio sólido.

8.2. Adaptación de la cepa de *B. licheniformis* a un medio enriquecido con melazas

Se logró la adaptación de la cepa a un medio denominado MMV enriquecido con 11 g/L de melazas. Con este proceso se corroboró que *B. licheniformis* es un microorganismo capaz de reajustar su sistema metabólico a las condiciones del nicho donde se encuentra. Los signos de la adaptación exitosa de la cepa al medio enriquecido con melazas fueron el cese de la producción de biopolímero, el crecimiento en la forma bacilar. También se observó un aumento progresivo de la velocidad de producción de biomasa a medida que se incrementaba la concentración de melazas. Este último aspecto es aún más relevante si se considera

la baja o nula producción de biomasa del microorganismo en estado enquistado. La bacteria adaptada es capaz de crecer adecuadamente en el medio MMV enriquecido con melazas en un rango de 4-14 g/L sin presentar producción de polímero ni enquistamiento celular. La productividad celular óptima de la cepa adaptada de *B. licheniformis* en relación a la biomasa producida y la concentración inicial de sustrato, se obtiene al utilizar 11 g/L de melazas en el medio.

Aspectos de la utilización de la fuente de carbono. La cepa de *B. licheniformis* no adaptada es capaz de hidrolizar la sacarosa sólo hasta cierto nivel residual para emplear únicamente la fructosa producida como fuente de carbono. El rendimiento final de biomasa se da gracias a la posible utilización de una fuente alternativa de carbono. Esta fuente de carbono puede ser el biopolímero producido en la primera parte del cultivo o las melanoidinas presentes en las melazas.

Por otro lado, de manera semejante a la cepa no adaptada, al inicio del cultivo la cepa adaptada parece emplear la fructosa disponible en el medio como fuente principal de carbono. Sin embargo, ésta última hidroliza de manera más efectiva la sacarosa presente en el medio y parece emplear como sustrato tanto la fructosa como la glucosa producida. No obstante, es probable que para la correcta asimilación de la glucosa, la bacteria necesite llevar a cabo algunas biotransformaciones del sustrato. Posiblemente, esto resulta en la producción de algunos otros compuestos que se pudieron apreciar en los cromatogramas pero que no pudieron ser identificados.

En base al análisis de color realizado, se puede concluir que la cepa de *B. licheniformis* adaptada es capaz de utilizar melanoidinas como fuente alternativa de sustrato.

8.3. Características del crecimiento en reactor de la cepa de *B. licheniformis* adaptada a melazas

Cuando *B. licheniformis* se cultiva en reactor, se optimiza hasta en un 100% la producción de biomasa, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los azúcares totales en el medio. Las condiciones del reactor, como son la agitación y el control del pH, ayudaron a mejorar de manera importante la productividad del sistema. Considerando que el parámetro de color L^* se redujo progresivamente durante el cultivo en reactor, se puede decir que ocurrió una reducción en el consumo de las melanoidinas presentes en el medio con respecto a los cultivos en matraz.

8.4. Evaluación de inoculantes en cultivos a condiciones de invernadero

El empleo de *B. licheniformis* por si solo en los cultivos de maíz no garantiza mejores rendimientos en los cultivos. La cepa biofertilizante no es capaz de proveer nutrimentos a la planta; por lo tanto, se necesita forzosamente la presencia de una cierta cantidad de nutrimentos en el suelo para que la bacteria promueva una mejor asimilación de los mismos. El biofertilizante contribuye a la mejora de los rendimientos de los cultivos mediante los mecanismos propios del metabolismo de la bacteria como son la producción de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, el control biológico, entre otros.

Con el uso del biofertilizante de *B. licheniformis* se puede reducir la aplicación de fertilizante químico hasta en un 50% de la dosis recomendada para la Región Mixteca. De los tratamientos realizados se puede concluir que el tratamiento más adecuado es el inoculante bacteriano que emplea almidón como acarreador adicionado con una fertilización química del 50% de la dosis recomendada, considerando que con este tratamiento se logró una productividad del grano estadísticamente mayor a la del tratamiento con 100% de la dosis de fertilización química recomendada para la Región Mixteca.

9. PERSPECTIVAS

En el presente proyecto se lograron abordar algunas de las etapas fundamentales para el desarrollo de inoculantes biofertilizantes a partir de *B. licheniformis*. No obstante, para garantizar tanto la producción sustentable de estos materiales, como su efectividad en los cultivos de maíz, es necesario llevar a cabo algunas investigaciones posteriores a los alcances de este proyecto.

Uno de estos aspectos es conocer los mecanismos de acción biofertilizante por parte de la cepa de estudio, mediante la evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos, de fijación de nitrógeno y de producción de fitohormonas por parte de la bacteria. Otro aspecto relevante es encontrar la modalidad de cultivo en reactor que permita la optimización de la producción de biomasa, así como la separación más adecuada de la misma desde el biomedio y su tratamiento posterior. Para el cultivo en reactor será necesario considerar los aspectos bioquímicos mediando un análisis más detallado del consumo de sustratos y la producción de metabolitos secundarios. El estudio analítico deberá acoplarse al estudio cinético para poder determinar la estrategia de crecimiento adecuada.

Asimismo, es necesario ampliar la investigación en el aspecto de los materiales acarreadores. Esto es, evaluar la supervivencia del microorganismo en

distintos materiales, así como llevar a cabo un análisis de costo-beneficio para definir qué material acarreador es el más adecuado para la producción de biofertilizantes a gran escala. En este sentido resulta atractivo el estudio de la inducción del enquistamiento celular para promover un acarreador natural del inoculante. Otra alternativa interesante es el uso de microencapsulación con materiales que no sean demasiado caros, como las maltodextrinas.

También es necesario ampliar el estudio en invernadero, tomando en cuenta los siguientes factores: 1) Ampliar el número de réplicas a evaluar con la finalidad de disminuir el error estadístico en los resultados. 2) Evaluar distintos porcentajes de fertilización química, con y sin inoculante bacteriano, variando la dosis de fertilización empleada. 3) Finalmente, es necesario llevar a cabo la evaluación del potencial biofertilizante de la bacteria en campo, es decir en parcelas de maíz tanto de la región mixteca como en otras regiones del estado y del país.

10. BIBLIOGRAFÍA

- A.C, F.P.O., 2007. La tecnología, del campo de experimentación a la parcela del productor. *Agroproduce*, p.36.
- Aguilar Rivera, N., Rodríguez Lagunes, D.A. y Castillo Morán, A., 2010. Azúcar, coproductos y subproductos en la diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. *Revista VIRTUALPRO*.
- Ariza, B. y González, L., 1997. *Producción de proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Ashengroph, M. y Nahvi, I., 2012. Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. , pp.553–558.
- ATCC (American Type Culture Collection), ATCC medium: 838 Spirillum nitrogen-fixing medium.
- Bailey, J. y Ollis, D., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals* 2nd ed., New York, United States: McGraw-Hill, Inc.
- Barua, S., Tripathi, S., Chakraborty, A., Ghosh, S. y Chakrabarti, K., 2011. Studies on non-symbiotic diazotrophic bacterial populations of coastal arable saline soils of India. *Indian Journal of Microbiology*, 51(3), pp.369–76.
- Bashan, Y., Holguin, G. y Luz, E., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50, pp.521–577.
- Bharagava, R.N. y Chandra, R., 2010. Biodegradation of the major color containing compounds in distillery wastewater by an aerobic bacterial culture and characterization of their metabolites. *Biodegradation*, 21(5), pp.703–11.

- Bharagava, R.N., Chandra, R. y Rai, V., 2009. Isolation and characterization of aerobic bacteria capable of the degradation of synthetic and natural melanoidins from distillery effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), pp.737–744.
- Bleecker, A.B. y Kende, H., 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, pp.1–18.
- Board, N., 2004. *The Complete Technology Book On Bio-Fertilizer And Organic Farming*, New Delhi, India: National Institute Of Industrial Research.
- Brdar-Jokanovic, M., Ugrinovic, M., Cvikic, D., Pavlovic, N., Zdravkovic, J., Adzic, S. y Zdravkovic, M., 2011. Onion yield and yield contributing characters as affected by organic fertilizers. *Ratarstvo I Povrtarstvo*, 48(2), pp.341–346.
- Brown, T., 2008. *Genomas 3a edición*, Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Campbell, M.K. y Farrell, S.O., 2004. *Bioquímica*, Cengage Learning Editors.
- Canbolat, M.Y., Bilen, S., Çakmakçı, R., Sahin, F. y Aydin, A., 2005. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils*, 42(4), pp.350–357.
- Chandra, R., Bharagava, R.N. y Rai, V., 2008. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource technology*, 99(11), pp.4648–60.
- Chung, S., Lim, J. H. y Kim, S. D., 2010. Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus* strains having *Phytophthora blight* suppression and growth promoting functions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(4), pp.485–492.
- Dale, J.W. y Von Schantz, M., 2002. *From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology*, England: John Wiley & Sons, LTD.
- Day-Lewis, C.M.J., 1989. *HPLC of sugars in factory products. Research project No. D4.*, Solution Mining Research Institute. U.S.A.
- Dergal, S.B., 1993. *Química de los alimentos*, Prentice Hall.
- Diario oficial de la Federación, 1998. *Norma Mexicana NMX-Y-327-1998. Alimentos para animales-Melaza de caña de azúcar (Saccharum officinarum)-Especificaciones.*

- Domenech, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Ramos, B. y Gutierrez-Mañero, J., 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol*, 51(2), pp.245–258.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), pp.350–356.
- Echegaray, O., Carvalho, A., Sato, E. y Aquarone, M., 2000. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: Invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 19, pp.39–50.
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M.A., Edirisinghe, J.N., Kutumbaka, K.K., Koenig, S.S., Huot Creasy, H., Rosovitz, M.J., Riley, D.R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L.D., Pailsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J. y Vary, P.S., 2011. Genome sequences of the biotechnologically important *B. megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *Journal of Bacteriology*, 193, pp.4199–4213.
- Espinosa Azúar, L., 2007. *Ecología molecular* 1st ed., México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
- Ettoumi, B., Radda, N., Borin, S., Daffonchio, D., Boudabous, A. y Cherif, A., 2009. Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *Journal of Basic Microbiology*, 49 Suppl 1, pp.S13–23.
- Fajardo Castillo, E.E. y Sarmiento Forero, S.C., 2007. *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Fan, L., Bo, S., Chen, H., Ye, W., Kleinschmidt, K., Baumann, H. I., Imhoff, J.F., Kleine, M. y Cai, D., 2011. Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, isolated from the Indian ocean. *Journal of Bacteriology*, 193(5), pp.1276–7.
- Fernández-López, C.L., Torrestiana-Sánchez, B., Salgado-Cervantes, M.A., García-Mendoza, P.G. y Aguilar-Uscanga, M.G., 2012. Use of sugarcane molasses “B” as an alternative for ethanol production with wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(4), pp.605–14.
- Fideicomisos instituidos en relación a la agricultura (FIRA), 2008. *El mercado de los fertilizantes en México: Situación actual y perspectivas 2009*, México.

- Financiera Rural, 2011. *Monografía de la melaza de caña de azúcar*. México.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. y Germida, J.J., 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus L.*). *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), pp.358–364.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Grepping, H., Reid, D.M., y Thorpe, T., 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 32(4), pp.272–289.
- Germida, J.J. y Walley, F.L., 1996. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biology and Fertility of Soils*, 23(2), pp.113–120.
- Goldstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1, pp.57–65.
- Goldstein, A.H. y Liu, S.T., 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology*, 5, pp.72–74.
- Gowariker, V., Krishnamurthy, V.N., Gowariker, S., Dhanorkar, M. y Paranjape, K., 2009. *The Fertilizer Encyclopedia*., John Wiley & Sons.
- Gutiérrez-Mañero, F.J., Acero, N., Luchas, J.A., Probanza, A., Mhouachi, J., Tadeo, F.R. y Talón, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(1988), pp.206–211.
- Gálvez, L.O., 1990. *La industria de los derivados de la caña de azúcar*, La Habana, Cuba: ICIDCA MINAZ.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessman, H. y Ryals, J., 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant cell*, 8(4), pp.629–43.
- Hammerschmidt, R. y Kuc, J., 1995. *Induced resistance to disease in plants*., Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Haq-Ikram-ul, M., Ashraf, H., Qadeer, M.A. y Iqbal, J., 2005. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 96, pp.1201–1206.
- Harris, D.C., 2007. *Análisis químico cuantitativo* 3rd ed., España: Reverté.

- Herrera Haro, J.G. y Barreras Serrano, A., 2005. *Análisis estadístico de experimentos pecuarios*. 2nd ed., México.: Colegio de Postgraduados.
- Jensen, G.B. et al., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5(8), pp.631–640.
- Jung, H.K., Kim, J.R., Woo, S.M. y Kim, S.D., 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has a siderophore-producing biocontrol activity. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, pp.94–100.
- Jung, H.K., Kim, J.R., Woo, S.M. y Kim, S.D., 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulose-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanism. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 50, pp.23–28.
- Kannaiyan, S., 2002. *Biotechnology of Biofertilizers.*, New Delhi, India: Springer.
- Kaynar, P. y Beyatli, Y., 2009. Determination of poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. isolated from the intestines of various fishes. *Fisheries Science*, 75(2), pp.439–443.
- Khan, M.S., Zaidi, A. y Musarrat, J., 2009. *Microbial Strategies for Crop Improvement.*, India: Springer.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. y Zhang, S., 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), pp.1259–66.
- Kort, J., 1980. *High pressure liquid chromatography.*, Solution Mining Research Institute. U.S.A.
- Li, H., Zhang, G., Deng, A., Chen, N. y Wen, T., 2011. De novo engineering and metabolic flux analysis of inosine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 33(8), pp.1575–80.
- Lim, J.H., Jung, H.Y. y Kim, S.D., 2009. Development of the microbial consortium for the environmental friendly agriculture by the antagonistic rhizobacteria. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, pp.116–120.
- Lim, J.H. y Kim, S.D., 2010. Biocontrol of *Phytophthora blight* of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 Formulations. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(6), pp.766–773.

- Lim, J.H. y Kim, S.D., 2009. Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxin-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, pp.231–538.
- Llarch, À., Logan, N.A., Castellví, J., Prieto, M.J. y Guinea, J., 1997. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception island, South Shetland archipelago. *Microbial Ecology*, 34(1), pp.58–65.
- MacMillan, J., 2001. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(4), pp.387–442.
- Maheshwari, D.K., 2010. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria.*, Germany: Springer.
- Margulis, L., 1998. The arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), pp.1236–1241.
- Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B.R., 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166, pp.525–530.
- Mikkelsen, S.R. y Cortón, E., 2004. Spectroscopic methods for matrix characterization. In *Bioanalytical Chemistry*. U.S.A.: John Wiley & Sons, LTD, pp. 11–12.
- Morales Ibarra, M., 2007. Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable. *Estudios Agrarios. Revista de la Procuraduría Agraria.*, pp.93–119.
- Morgan, P.W. y Drew, M.C., 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100(3), pp.620–630.
- Murtagh, J.E., 1999. *The alcohol Textbook* 3rd ed., Nottingham, England: University Press.
- Muñoz, A.V., 2011. *Principios de color y holopintura*, Alicante, España: Editorial Club Universitario.
- Nag, A., 2008. *Textbook Of Agricultural Biotechnology*, New Delhi, India: PHI Learning Pvt. Ltd.
- Najafpour, G., 2007. *Biochemical Engineering and Biotechnology.*, United Kingdom: Elsevier.

- Neyra, C., Atkinson, L.A., Olubayi, O., Sadasivan, L., Zaurov, D. y Zappi, E., 1996. Novel microbial technologies for the enhancement of plant growth and biocontrol of fungal diseases in crops. *Cahiers Opt. Méd.*, 31, pp.447–456.
- Okafor, N., 2007. *Modern industrial microbiology and biotechnology*, New Hampshire, United States: Science Publishers.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J. y Klesius, P.H., 2008. *Bacillus licheniformis* isolated during a fish kill is non-pathogenic. *Fisheries Science*, 74(6), pp.1351–1353.
- Paul, E.A., 2007. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd ed., United States: Elsevier.
- Perea, P.C., Artigas, J.M. y Ramo, J.P. i, 2002. *Fundamentos de colorimetría*, Universidad de Valencia, España.
- Peña-Cabriales, J.J., Grageda-Cabrera, O.A. y Vera-Núñez, J.A., 2001. *Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: Uso de las técnicas isotópicas (15N)*. CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.
- Pommerville, J.C., 2011. *Alcama's laboratory fundamentals of Microbiology*. 9th ed., United States: Jones & Barlett Learning.
- Puerta, B.C.J. y Ureña, P.C.P., 2005. *Prácticas de biología molecular.*, Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Rai, M.K., 2006. *Handbook Of Microbial Biofertilizers*, New York, United States: Routledge.
- Repetto, M. y Camean, A., 1995. *Toxicología Avanzada*, Ediciones Díaz de Santos.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., López de León, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jorgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D. y Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10), p.R77.
- Rodicio, M. y Mendoza, M., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en Microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica.*, 22(4), pp.238–245.
- Rodríguez-Cáceres, E., 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), pp.990–1.

- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B.R. y Bashan, Y., 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(2), pp.181–187.
- SAGARPA, 2009. El secretario de Agricultura lanza en Tlaxcala el programa nacional de compras consolidadas.
- Sahin, S. y Gülüm Sumnu, S., 2006. *Physical Properties of Foods*, New York, United States: Springer Science - Bussines Media.
- Saimmai, A., Tani, A., Sobhon, V. y Maneerat, S., 2012. Mangrove sediment , a new source of potential biosurfactant-producing bacteria. *Annals of Microbiology*.
- Saimmai, A., Sobhon, V. y Maneerat, S., 2011. Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), pp.315–35.
- Sandalli, C., Kacagan, M., Canacki, S. y Belduz, A.O., 2008. Cloning, expression, purification and characterisation of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* A1. *Annals of Microbiology*, 58(2), pp.245–251.
- Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis Biotechnology*, Puebla, México: Springer.
- Sapsirisopa, S., Chookietwattana, K., Maneewan, K. y Khaengkhan, P., 2009. Effect of salt-tolerant *Bacillus* inoculum on rice KDML 105 cultivated in saline soil. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, (Special Issue), pp.S69–S74.
- Sareen, R. y Mishra, P., 2008. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, pp.399–405.
- Schwiegerling, J., 2004. *Field guide to Visual and Ophthalmic Optics*. 1st ed., Bellingham, W.A.: Spie Press.
- Selvadurai, E.L., Brown, A.E. y Hamilton, J.T.G., 1991. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biology & Biochemistry*, 23, pp.401–403.
- Sheremet, A.S., Gronskiy, S.V., Akhmadyshin, R.A., Novikova, A.E., Livshits, V.A., Shakulov, R.S. y Zakataeva, N.P., 2011. Enhancement of extracellular purine nucleoside accumulation by *Bacillus* strains through genetic modifications of genes involved in nucleoside export. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(1), pp.65–70.

- Shima, J., Kuwazaki, S., Tanaka, F., Watanabe, H., Yamamoto, H., Nakajima, R., Tokashiki, T. y Tamura, H., 2005. Identification of genes whose expressions are enhanced or reduced in baker's yeast during fed-batch culture process using molasses medium by DNA microarray analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), pp.63–71.
- Silva García, M.C., García Bermejo, M.J., Del Castillo Torres, L., Ania Palacio, J.M. y Gómez Martínez, D., 2006. *Técnicos Especialistas de Laboratorio del Servicio Vasco de Salud-osakidetza.*, España: MAD-Eduforma.
- Singh, H., 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation (Google eBook)*, John Wiley & Sons.
- Skountzou, P., Soupioni, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A., Marchant, R. y Banat, I., 2003. Lead uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. *Process Biochemistry*, 38, pp.1479–1482.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. y Métraux, J.P., 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, pp.235–70.
- Swiecicka, I. y Mahillon, Jacques., 2006. Diversity of commensal *Bacillus cereus* sensu lato isolated from the common sow bug (Porcellio scaber, Isopoda). *FEMS Microbiology Ecology*, 56(1), pp.132–40.
- Thakur, I.S., 2006. *Environmental Biotechnology: Basic Concepts and Applications*, New Delhi, India: I. K. International Pvt Ltd.
- Tilak, K.V.B.R., Pal, K.K. y Dey, R., 2010. *Microbes For Sustainable Agriculture*, New Delhi, India: I. K. International Pvt. Ltd.
- Trivedi, P.R., 2004. *Environmental Pollution And Control*, New Delhi, India: APH Publishing.
- Van Loon, L.C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103(9), pp.753–765.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A. y Pieterse, C.M., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, pp.453–83.
- Vidhyasekaran, P. y Muthamilan, M., 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), pp.67–74.
- Vigneshwaran, C., Shanmugam, S. y Kumar, S.T., 2010. Screening and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* isolated from namakkal poultry farm. *Researcher*, 2(4), pp.89 – 96.

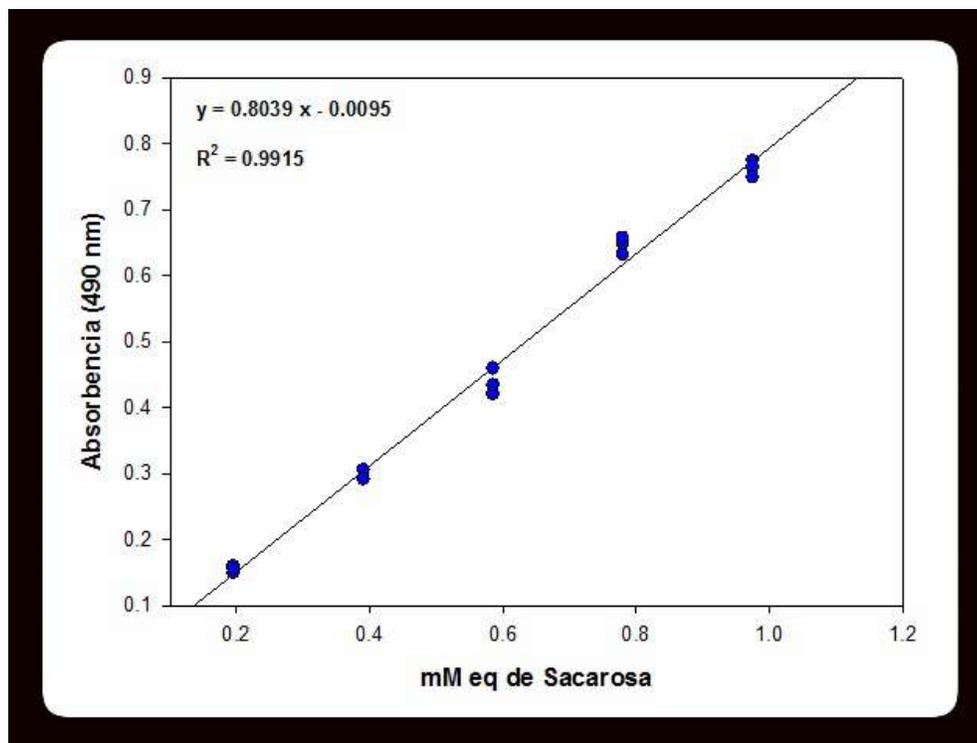
- Viswanathan, R., 1999. *Induction of systemic resistance against red hot disease in sugarcane by plant growth rhizobacteria*. Tamil Nadu Agricultural University. Coimbatore, India.
- Viswanathan, R. y Samiyappan, R., 1999. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease caused by *Collectotrichum falcatum* went in sugarcane. *Proceedings of Sugar Technology Association of India*, 61, pp.24–39.
- Vu, V.H. y Kim, K., 2009. High-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* KV-25 using molasses and corn steep liquor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(12), pp.1603–1611.
- Wei, G., 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(12), p.1508.
- Wei, X., Ji, Z. y Chen, S., 2010. Isolation of halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly-gamma-glutamic acid. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(5), pp.1332–40.
- Whitman, W.B., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.*, United States: Springer.
- Williams, C.M. et al., 1990. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), pp.1509–1515.
- Williams, C.M. y Shih, J.C.H., 1989. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *Journal of Applied Microbiology*, 67(1), pp.25–35.
- Winn, W.C. y Koneman, E.W., 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6e*, United States: Lippincott Williams & Wilkins.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), pp.221–71.
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Smith, D. y Sporns, P., 2005. *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food components*. 1st ed. R. E. Wrolstad et al., eds., New Jersey, United States: John Wiley & Sons, Inc.
- Yao, A. V., Bochow, H., Karimov, S., Boturov, U., Saginboy, S. y Sharipov, A.K., 2006. Effect of FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in

- field tests. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 39(4), pp.323–328.
- Yi, J., Wu, H.Y., Wu, J. y Deng, C.Y., 2012. Molecular phylogenetic diversity of *Bacillus* community and its temporal-spatial distribution during the swine manure of composting. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, pp.411–421.
- Yu, W.B., Gao, S, H., Yin, C.Y., Zhou, Y. y Ye, B.C., 2011. Comparative transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* responding to dissolved oxygen in adenosine fermentation. E. Ben-Jacob, ed. *PloS One*, 6(5), p.e20092.
- Zhang, G., Deng, A., Xu, Q., Liang, Y., Chen, N. y Wen, T., 2011. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin. *Journal of Bacteriology*, 193, pp.3142–3143.
- Çakmakçi, R., Dönmez, M.F. y An, Ü.E., 2007. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, pp.189–199.

11. APÉNDICE

A.1. Curva de calibración para la determinación de azúcares totales.

Se graficó la absorbencia contra la concentración de sacarosa en la serie de diluciones de sacarosa empleadas.



A2. Sistema de Biorreactor empleado en la producción de biomasa de *B. licheniformis*.

