



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

“Producción de un inoculante microbiano de *Bacillus subtilis* PC producido en biorreactor y microencapsulado mediante secado por aspersion”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**PRESENTA**

LBT Mariana Sánchez Chávez

**DIRIGIDA POR**

Dr. Carlos Regalado González

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

“Producción de un inoculante microbiano de *Bacillus subtilis* PC  
producido en biorreactor y microencapsulado mediante secado por  
aspersión”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

LBT Mariana Sánchez Chávez

DIRIGIDA POR

Dr. Carlos Regalado González

Dr. Carlos Regalado González  
Presidente

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Secretario

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Vocal

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

Dra. Blanca Estela García Almendárez  
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro. Noviembre 2021.

*Me preguntaron cuál era mi fortuna, les hable de mi familia*

*A mi madre Ma. De Jesus Chávez, a mi esposo Argel Adrian Hernández, a la memoria de mi padre Hector Oscar Sánchez.*

*A mis abuelos Josefina López y la memoria de Ricardo Chávez.*

*Mi amor infinito y mi gratitud eterna.*

## AGRADECIMIENTOS

- Dr. Carlos Regalado González. Por recibirme en su grupo de trabajo, y haberme brindado la oportunidad de reiniciar y terminar mi proyecto, además de su apoyo, por las grandes pláticas.
- Dra. Blanca Estela García Almendárez. Por haber sido mi oportunidad de volver al posgrado y haberme recibido con los brazos abiertos pese a la situación por la que yo atravesaba. Además de su paciencia, diseño y guía en mi proyecto.
- Dr. Eduardo Castaño Tostado. Por su apoyo incondicional para reiniciar mi posgrado, por impulsarme siempre a continuar siendo mi guía ante las adversidades que se iban presentando, así como la calidez humana que lo distinguirá siempre.
- Dra. Sofía María Arvizu Medrano. Por sus grandes consejos, por enseñarme que siempre se puede, y alentarme a seguir adelante, por escucharme durante todo el posgrado y mi regreso sin tener ningún compromiso mas que el propio con el gran ser humano que representa.
- Dr. Aldo Amaro Reyes. Por sus aportaciones a mi tesis y acertadas revisiones.
- Dra. Teresa García Gasca. Por brindarme su apoyo total ante la situación.
- Dr. Edmundo Mercado Silva. Por haber colaborado siempre y haber estado al pendiente de mi regreso al posgrado.
- Francisco González, Isac Rivas, Alejandro Vásquez, Mario Sotelo, Ricardo Merlos, Ivonne Zúñiga, Mayra Maya y Samuel Palacios por acompañarme en los días difíciles.
- Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por la beca de maestría y el apoyo en mi reincorporación al programa.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Producción de fertilizantes	3
2.2 Inoculante microbiano	4
2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.3.1 Crecimiento y desarrollo de <i>B. subtilis</i>	8
2.3.2 Aplicación de <i>B. subtilis</i> en cultivos vegetales	9
2.4 Biorreactor	17
2.4.1 Parámetros y modos de operación de biorreactores	20
2.5 Microencapsulación	23
2.5.2 Tecnología de microencapsulación	23
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GENERAL	29
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Material biológico	30

5.2 Reactivos y medios de cultivo	30
5.3 Geles para electroforesis y solución de tinción	31
5.4 Métodos	31
5.4.1 Conservación de la cepa de <i>B. subtilis</i> PC mediante crioconservación	31
5.4.2 Activación de la cepa	32
5.4.3 Conteo células y esporas	32
5.4.4 Producción a nivel biorreactor	33
5.4.5 Microencapsulación mediante secado por aspersión	34
5.4.6 Estabilidad de la cepa microencapsulada en función de la temperatura	36
5.4.7 Electroforesis desnaturalizante en geles de acrilamida (SDS-PAGE) sistema Tris-Tricina	36
5.5 Diseño experimental	38
5.6 Análisis estadístico	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Caracterización de la dinámica de crecimiento de <i>B. subtilis</i> PC en biorreactor instrumentado	39
6.2 Determinación de los parámetros de temperatura de entrada y velocidad de alimentación para la microencapsulación mediante secado por aspersión	44
6.3 Determinación de la viabilidad a través del tiempo del producto microencapsulado	46
6.4 Determinación de la producción de péptidos antimicrobianos durante el crecimiento de <i>B. subtilis</i> en biorreactor	50
7. CONCLUSIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	54

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página No.
1. Demanda mundial de fertilizantes expresadas en millones de toneladas	3
2. Biofertilizantes promotores de crecimiento de plantas adaptado de (Kour et al., 2020b)	7
3. Eficiencia de microencapsulación de <i>B. subtilis</i> PC bajo distintas condiciones del secador	46
4. Compuestos antimicrobianos producidos por <i>B. subtilis</i> y microorganismos de inhibición	51

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página No.
1. Ciclo de reproducción del genero <i>Bacillus</i> (Villarreal et al., 2018)	9
2. Compuestos antimicrobianos producidos por <i>B. subtilis</i> adaptado de (Caulier et al., 2019)	11
3. Mecanismos de <i>B. subtilis</i> en el control biológico del estrés biótico adaptado de Hashem et al. (2019)	12
4. Estructura de las principales familias de lipopéptidos (Villarreal et al., 2018)	13
5. Degradación de la pared celular de hongos patógenos por enzimas líticas (Villarreal et al., 2018)	14
6. A) Sideróforos como mecanismo de inhibición de Fe <sup>3+</sup> para patógenos. B) Principales estructuras quelantes de sideróforos (Villarreal et al., 2018)	15
7. La bacitracina bloquea el ciclo esencial de lípidos II uniéndose a la UPP (undecaprenil pirofosfato), evitando así la síntesis de pared celular bacteriana adaptado de (Radeck et al., 2016) *PBPs= proteínas de unión a penicilina	16
8. Biorreactor instrumentado modelo Z31011001 Applikon ez- control	18
9. Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> adaptado de (Sahoo et al., 2016)	23
10. Sistema de secado por aspersion adaptado de (Martín et al., 2015)	25
11. Cinética de crecimiento <i>B. subtilis</i> PC. *Abs= absorbancia (densidad óptica), DO= Oxígeno disuelto, rpm= revoluciones por minuto	40
12. <i>B. subtilis</i> PC durante su crecimiento en biorreactor (8 h y 9 h). A la izquierda se observan las células de <i>B. subtilis</i> después de 8 h de crecimiento y a la derecha después de 9 h de crecimiento, las esporas se observan teñidas en verde y señaladas en color verde	43
13. <i>B. subtilis</i> PC durante su crecimiento en biorreactor (10 h y 11 h). A la izquierda se observan las células de <i>B. subtilis</i> después de 10 h de crecimiento y a la derecha después de 11 h de crecimiento, las esporas se observan teñidas en verde y señaladas en color verde	44
14. <i>B. subtilis</i> PC durante su crecimiento en biorreactor (12 h y 24 h). A la izquierda se observan las células de <i>B. subtilis</i> después de 12 h de crecimiento	

y a la derecha después de 24 h de crecimiento, las esporas se observan teñidas en verde y señaladas en color verde	44
<b>15.</b> Microscopía electrónica de barrido de <i>B. subtilis</i> PC microencapsulado mediante secado por aspersión. La micropartícula tiene un tamaño aproximado de 6 $\mu\text{m}$	46
<b>16.</b> Microscopía electrónica de barrido de <i>B. subtilis</i> PC microencapsulado mediante secado por aspersión (5 meses de almacenamiento a 4 °C)	48
<b>17.</b> Estabilidad en el tiempo <i>B. subtilis</i> PC en 4 °C. Los resultados representan la media $\pm$ desviaciones estándar (n = 3). Las medias con diferentes letras mayúsculas representan la diferencia estadística ( $\alpha = 0.05$ )	49
<b>18.</b> Estabilidad en el tiempo <i>B. subtilis</i> PC en 25 °C. Los resultados representan la media $\pm$ desviaciones estándar (n = 3). Las medias con diferentes letras mayúsculas representan la diferencia estadística ( $\alpha = 0.05$ )	49
<b>19.</b> Estabilidad en el tiempo <i>B. subtilis</i> PC en 37 °C, Los resultados representan la media $\pm$ desviaciones estándar (n = 3). Las medias con diferentes letras mayúsculas representan la diferencia estadística ( $\alpha = 0.05$ )	50
<b>20.</b> Gel de electroforesis (extracto libre de células de <i>B. subtilis</i> PC), A la izquierda se observa el gel de electroforesis con un marcador molecular indicando los pesos moleculares en kDa. A la derecha se observa el mismo gel, que fue cortado en tres secciones, *Los carriles 1 y 2 representan el marcador utilizado y el carril 3 contienen el extracto libre de células del cultivo de <i>B. subtilis</i> PC	52
<b>21.</b> Capacidad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> PC en cultivo de <i>M. luteus</i> . A la izquierda se observa un fragmento del gel de electroforesis control. A la derecha se observan los fragmentos del gel marcados en la figura anterior del carril del extracto libre de células. Se observa que el fragmento 2 presenta halo de inhibición. El pozo que se observa en la parte superior corresponde al ELC, el cual presenta efecto inhibitorio sobre <i>M. luteus</i>	52

## RESUMEN

El consumo de alimentos de origen vegetal es muy importante para asegurar la ingesta de nutrientes esenciales y así obtener una dieta saludable. Las rizobacterias como *Bacillus subtilis* actúan simbióticamente con las plantas y ejercen control sobre hongos y bacterias del suelo que afectan a las plantas. Esto debido a la amplia variedad de agentes antimicrobianos que produce y esporas que permiten la resistencia a diversos factores. El objetivo de este trabajo fue la producción a nivel biorreactor de *B. subtilis* PC y su microencapsulación obteniendo así un inoculante microbiano. El microorganismo se creció en un biorreactor instrumentado usando el medio Schaeffer, temperatura de 37 °C, pH 7.0 y 1 vvm de aireación durante 12 h. Se determinó el porcentaje de esporulación, así como la población (UFC/mL) y las constantes cinéticas de crecimiento. Adicionalmente se determinó la presencia de péptidos antimicrobianos derivados del crecimiento del microorganismo, mediante electroforesis con el sistema Tris-tricina. La biomasa obtenida en el biorreactor se homogeneizó utilizando diferentes materiales de pared (proteínas lácteas y maltodextrinas) y finalmente se microencapsularon mediante secado por aspersión. Las condiciones de operación del secador estudiadas fueron: temperatura de entrada de 90 °C, 100 °C, 110 °C y de 90 %, 96 % de aspiración de aire, resultado las mejores 110 °C (temperatura) y 90 % (aspiración de aire con alimentación de 1.4 mL/min). Para evaluar la viabilidad del microorganismo en las microcápsulas se realizó un estudio unifactorial con mediciones repetidas en el tiempo, donde el factor fue la temperatura con tres niveles (4 °C, 25 °C y 37 °C) y tiempo de almacenamiento (1 a 5 meses). Después de 12 h de fermentación se obtuvo una concentración de células de  $1 \times 10^8 \pm 10$  CFU/mL con una tasa específica de crecimiento de  $0.03 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ , y un tiempo de duplicación de  $22.57 \pm 0.60$  min. En cuanto al rendimiento de sólidos después de la microencapsulación este fue de  $69.0 \pm 2.0$  % con un porcentaje de viabilidad del 100 %. Así mismo se observó que las células microencapsuladas presentan mayor estabilidad en el tiempo que las células sin microencapsular, independientemente de la temperatura de almacenamiento. A 37 °C la población de células libres disminuyó en 2 log respecto a las microencapsulas después de 5 meses de almacenamiento. Se encontró que *B. subtilis* PC tiene actividad antimicrobiana, que, basados en su estudio electroforético, está asociado posiblemente a los péptidos subtilina y bacitracina.

**Palabras clave:** *B. subtilis*, inoculante microbiano, microencapsulación, biorreactor.

## SUMMARY

The consumption of vegetable origin foods is very important to ensure the intake of essential nutrients to achieve a healthy diet. Rhizobacteria such as *Bacillus subtilis* act symbiotically with plants as microbial inoculants, showing an inhibitory effect on fungi and soil bacteria that affect plants. The objective of this work was the growth of *B. subtilis* PC in a bioreactor, and its microencapsulation to obtain a microbial inoculant. An instrumented bioreactor added with Schaeffer medium was inoculated with *B. subtilis* PC, temperature 37 °C and pH 7.0. The sporulation extent and viable cells population (CFU/mL) were evaluated and the growth kinetic constants were determined during 12 hours of fermentation time. The presence of antimicrobial peptides from secondary metabolites produced during *B. subtilis* growth was determined by electrophoresis with the Tris-tricine system. The microencapsulation process was conducted at the highest cells concentration by mixing with whey protein concentrate and maltodextrins, acting as wall materials before spray drying. The operating conditions of the dryer were inlet temperatures of 90 °C, 100 °C, 110 °C and 90% and 96 % air suction and feeding of 1.4 mL/min. To evaluate microbial viability within the microcapsules a unifactorial design was used with repeated measurements over time, using temperature as the factor at three different levels (4 °C, 25 °C and 37 °C), for 1 to 5 months. High cells concentration ( $1 \times 10^8 \pm 10$  CFU/mL) was obtained after 12 h of fermentation with a specific growth rate of  $0.03 \pm 0.002$  min<sup>-1</sup> and a doubling time of  $22.57 \pm 0.60$  min. Regarding the cellular yield after microencapsulation was  $69.0 \pm 2.0$  % with a viability percentage of 100 %. The microencapsulated cells viability over time and at different temperatures is higher than that shown by the cells free culture. At 37 °C, the free cell population decreased by 2 log cycles compared to the microencapsulated cells after 5 months of storage. *B. subtilis* PC was found to have antimicrobial activity, which, based on the electrophoretic study, is possibly associated with the peptides subtilin and bacitracin.

**Keywords:** *B. subtilis*, microbial inoculant, microencapsulation, bioreactor.

### DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos vegetales como parte de la dieta diaria puede reducir el riesgo de algunas enfermedades no transmisibles, ya que los vegetales son ricos en vitaminas, minerales, fibra, entre otros. Además, una dieta rica en vegetales combinada con una dieta baja en azúcares, sodio y grasas contribuye a prevenir problemas de obesidad (OMS, 2016).

De acuerdo a la ONU (2019), se estima que existe una población mundial de 7,700 millones de personas, y se estima que llegaremos a ser 9,700 millones de personas en 2050. Para satisfacer la demanda anticipada de alimentos causada por el incremento de la población se han propuesto varias estrategias, entre ellas el uso excesivo de fertilizantes químicos, pesticidas y herbicidas (Cen et al., 2020).

Sin embargo, a pesar de que los fertilizantes inorgánicos aumentan la producción de alimentos, existen también problemas en su uso, incluida la disminución de contenido de materia orgánica en el suelo (González-Rosado et al., 2014), acidificación del suelo (Zhu et al., 2018), emisión de gases efecto invernadero, y pérdida de la biodiversidad (McGill, 2015), entre otros.

Por ello, la agricultura orgánica, así como la búsqueda de alimentos saludables plantea sustituir los fertilizantes inorgánicos, por estrategias más sustentables, como los inoculantes microbianos.

Numerosos estudios que han demostrado que la aplicación periódica de este tipo de inoculantes puede aumentar las proporciones de macroagregados en el suelo, los niveles de materia orgánica, la densidad de lombrices de tierra y la actividad enzimática, entre otros (Cen et al., 2020), logrando así mantener el rendimiento de los cultivos y la calidad de los alimentos (Tejada & Benítez, 2020).

Para lograr aplicar a nivel comercial los inoculantes microbianos, se requiere contar con cepas microbianas con actividad biológica, procedimientos para cultivarlas en grandes volúmenes, establecer una forma apropiada de aplicación y conocer su estabilidad en el almacenamiento.

Por lo tanto, en este proyecto se propuso la producción de un inoculante microbiano de *B. subtilis* PC microencapsulado en un material de pared que le permitiera sobrevivir al secado por aspersión y se evaluó su viabilidad en función de la temperatura y a través del tiempo. Adicionalmente, se determinó el efecto antimicrobiano de los péptidos que producen durante la fermentación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Producción de fertilizantes

La población mundial creciente demanda una mayor producción de alimentos de origen vegetal y de acuerdo a las últimas cifras disponibles de la FAOSTAT (2013), en ese año se producían más de 1817 millones de toneladas de frutas y verduras. Para lograr este nivel de producción se sabe que se ha recurrido a los fertilizantes inorgánicos, principalmente nitrogenados. Sin embargo, cada año la demanda mundial por los fertilizantes aumenta, la Tabla 1 nos muestra la demanda mundial de fertilizantes inorgánicos ( donde se reportó la demanda mundial de fertilizantes de 2015 a 2017, y se estimó la demanda para 2018 a 2020).

**Tabla 1.** Demanda mundial de fertilizantes expresadas en millones de toneladas (FAO, 2017).

<b>Año</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>
<b>Nitrógeno (N)</b>	110,027	111,575	113,607	115,376	117,116	118,763
<b>Fosfato (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b>	41,151	41,945	43,195	44,120	45,013	45,858
<b>Potasio (K<sub>2</sub>O)</b>	32,838	33,149	34,048	34,894	35,978	37,042
<b>Total</b>	<b>184,017</b>	<b>186,668</b>	<b>190,850</b>	<b>194,390</b>	<b>198,107</b>	<b>201,663</b>

De esta manera la FAO (2017), sostiene que el 50 % de la población mundial depende de los fertilizantes inorgánicos, ya que los orgánicos no son suficientes, por ello se ha propuesto la el uso de inoculantes microbianos, los cuales presentan ventajas (Cen et al., 2020).

## 2.2 Inoculante microbiano

Son productos biotecnológicos basados en microorganismos promotores del crecimiento vegetal que mejoran la absorción y disponibilidad de nutrientes con el objetivo de disminuir el uso de fertilizantes químicos. Para el desarrollo de un inóculo eficiente es importante considerar las interacciones ente el sustrato, la planta y el microorganismo (Creus, 2017).

Entre los inoculantes se encuentran los promotores de crecimiento o biofertilizantes, estos representan una herramienta sustentable para la agricultura orgánica, colonizan los sistemas vegetales (epífitos, endofíticos y rizosféricos) de los cultivos, logrando mejorar la accesibilidad de nutrientes de las plantas aprovechando (Corrales-Ramírez et al., 2017).

Ademas, promueven un mejor desarrollo en la morfología de la planta y la producción de metabolitos, también son aplicados como agentes de control de patógenos a través de la competencia por nutrientes o la producción de metabolitos antimicrobianos (Venegas-González et al., 2019; Sánchez López et al., 2020).

Básicamente los biofertilizantes PGPR (del inglés: plant growth promoting rhizobacteria) ayudan a las plantas en la absorción de nutrientes (hierro, magnesio, nitrógeno, potasio, fósforo) por la asociación que logran en la región rizosférica cuando son suministradas a las plantas a través del suelo, así como la regulación de diversos procesos importantes que son causados por el estrés abiótico de la planta, llegando a revertir los mismos (Kour et al., 2020a; b).

Existen distintos tipos de biofertilizantes organizados en categorías como se detalla a continuación:

- Biofertilizantes fijadores de nitrógeno

Son pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, y se componen principalmente de los géneros; *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Rhizobium*. Básicamente se trata de bacterias que viven en las raíces y forman una relación simbiótica con las plantas, estas bacterias cambian el nitrógeno atmosférico a  $\text{NH}_3$ , mismo que será utilizado por las plantas para sintetizar vitaminas, proteínas y compuestos nitrogenados. La conversión de nitrógeno es realizada por una enzima nitrogenasa que se compone de una reductasa que usa hierro como cofactor así como dinitrogenasa con molibdeno y hierro como cofactores (Mahanty et al., 2016).

- Biofertilizantes fijadores de nitrógeno de vida libre

Este tipo de inoculantes fijan el nitrógeno atmosférico, sin ninguna relación simbiótica con las plantas y tampoco requieren de un hospedero. Dentro de este grupo podemos encontrar a *Azotobacter* y cianobacterias. Se ha demostrado que *Azotobacter* es capaz de secretar fitohormonas, vitaminas del complejo B, y compuestos bioactivos que actúan como agentes de control biológico contra patógenos de las raíces (Mahanty et al., 2016).

Por su parte las cianobacterias funcionan excretando fitohormonas, vitaminas, aminoácidos, logrando así mejorar el crecimiento de la planta, además aumentan la capacidad de retención de agua y disminuyen la salinidad del suelo (Kour et al., 2020b).

- Biofertilizantes asociativos simbióticos fijadores de nitrógeno

Dentro de los inoculantes asociativos simbióticos fijadores de nitrógeno más estudiados se encuentra *Azospirillum*, se sabe que fija una gran cantidad de nitrógeno en plantas no leguminosas, produce promotores de crecimiento (ácido indol acético, giberelinas y citoquinas). Uno de los principales efectos de

*Azospirillum* es la modificación de la morfología de la raíz de la planta, mejorando así el crecimiento. También se ha demostrado que *Azospirillum* podría ayudar en la supervivencia de las plantas en condiciones estresantes al inducir cambios en la elasticidad de la pared celular y ajustes osmóticos (Kour et al., 2020b).

- Biofertilizantes solubilizadores de fósforo

El fósforo es uno de los macronutrientes vitales, desempeña una función clave en el crecimiento y desarrollo de los cultivos. En el suelo se puede encontrar en concentraciones de 400 a 1200 mg/kg sin embargo su concentración soluble es muy baja y por ello inasequible para la planta.

Existen dos formas de fósforo en el suelo (orgánica e inorgánica), la forma inorgánica del fósforo se obtiene cuando se ha fertilizado el suelo con sustancias químicas. La forma orgánica se encuentra en los minerales: hidroxiapatita, óxidos hidratados de hierro, aluminio y manganesos, pero son poco solubles, por ello los biofertilizantes solubilizadores de fosforo se encargan de darles solubilidad para ser aprovechados por la planta, existen varios tipos de estos y se pueden ver en la Tabla 2 (Kour et al., 2020b).

- Biofertilizantes solubilizadores de potasio.

El potasio es un nutriente muy importante tanto en el desarrollo como en el crecimiento de las plantas, participa en aproximadamente 60 sistemas enzimáticos diferentes en las plantas, tiene un papel importante en la resistencia a la sequía y enfermedades (Cakmak, 2005).

También está involucrado en la producción de almidón, controlando el crecimiento de la raíz, regula el movimiento de los estomas en la planta. Si el aporte de potasio es insuficiente las raíces de la planta estarán poco desarrolladas, tendrán tasas de crecimiento bajas, semillas pequeñas y por lo tanto disminuirá el rendimiento del cultivo (Kour et al., 2020b).

**Tabla 2.** Biofertilizantes promotores de crecimiento de plantas adaptado de (Kour et al., 2020b).

Biofertilizante	Rasgos que promueven el crecimiento de las plantas						
	N	P	K	Sid	ACC	IAA	GA
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		+				+	
<i>Acinetobacter baumannii</i>		+		+			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		+		+		+	
<i>Aeromonas hydrophila</i>		+				+	+
<i>Arthroderma cuniculi</i>		+		+			
<i>Aspergillus fumigatus</i>				+		+	+
<i>Aspergillus niger</i>		+	+				
<i>Bacillus aerius</i>	+	+		+		+	
<i>Bacillus altitudinis</i>		+			+	+	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+		+		+	
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+		+		+	
<i>Bacillus megaterium</i>		+		+		+	
<i>Bacillus mucilaginous</i>	+	+		+		+	
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+		+		+	
<i>Bacillus thuringensis</i>		+		+		+	
<i>Burkholderia cepacia</i>		+				+	+
<i>Burkholderia gladioli</i>		+				+	+
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		+				+	
<i>Enterococcus gallinarum</i>		+				+	
<i>Fusarium proliferatum</i>		+				+	+
<i>Lecanicillium psalliotae</i>		+		+			
<i>Paenibacillus favisporus</i>		+				+	
<i>Paenibacillus taichungensis</i>		+		+		+	
<i>Pseudomonas entomophila</i>		+				+	
<i>Pseudomonas koreensis</i>		+			+	+	
<i>Pseudomonas luteola</i>		+				+	+
<i>Pseudomonas simiae</i>		+			+	+	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		+				+	
<i>Serratia marcescens</i>		+				+	
<i>Serratia nematodiphila</i>		+		+	+	+	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		+				+	+

N- fijar nitrógeno, P- solubilizador de fósforo, K- solubilizador de potasio, Sid- producción de sideróforos, ACC- 1 aminociclopropano 1 carboxilato desaminasa, IAA- ácido indol 3 acético, GA- ácido giberélico.

### 2.3 *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* es un microorganismo Gram positivo propio del suelo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, esto es gracias a la facilidad que presenta para vivir en un amplio rango de temperatura (15 °C hasta 55 °C), presenta formación de esporas, tasa de crecimiento alta y puede sobrevivir en condiciones de altas concentraciones salinas de hasta 7 % (p/p) NaCl (Hashem et al., 2019).

*B. subtilis* es capaz de formar esporas como medio de defensa a diversos tipos de estrés (Khardziani et al., 2017) y permanecer así por largos periodos de tiempo, así como de sintetizar metabolitos que estimulan el crecimiento de las plantas, actuando como biofertilizante y también previene la infección por patógenos (Radhakrishnan et al., 2017).

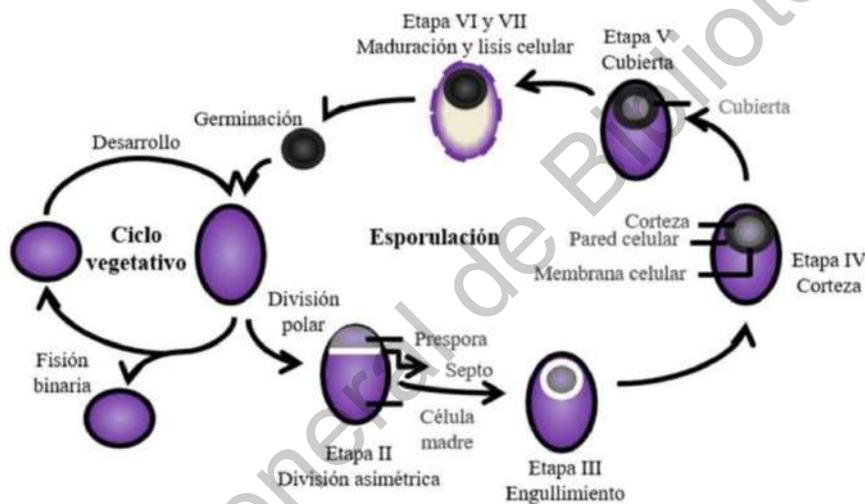
#### 2.3.1 Crecimiento y desarrollo de *B. subtilis*

Entre las características principales de este microorganismo destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, morfología bacilar, movilidad flagelar y tamaño variable (0.5 a 10 µm). Su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, y presenta un intervalo de temperaturas de crecimiento óptimo (30 a 45 °C).

La capacidad de producir esporas es lo que le da al microorganismo la facilidad de diseminación y prevalencia en ecosistemas. Las esporas se forman en la segunda fase del ciclo de vida (Figura 1), el cual se conforma de dos partes: el crecimiento vegetativo y una fase de esporulación; se sabe que la bacteria crece de manera exponencial mediante fisión binaria (Villarreal et al., 2018).

La fase de esporulación comienza como una estrategia de supervivencia ante el estrés (escasez de nutrientes, sobre población, salinidad, temperatura, pH), de esta manera durante el ciclo vegetativo se inicia la formación de endosporas, lo cual implica una división celular asimétrica, dando lugar a la formación de dos

compartimentos (célula madre y la inmersión de una preespora). Después, esta preespora es engullida por la célula madre y forma una célula hija; durante las siguientes etapas la preespora es recubierta por capas protectoras (componentes proteicos, peptidoglicano y una pared que reside abajo de ésta, seguido por deshidratación y la maduración final de la preespora. Finalmente la célula madre se lisa y muere, liberando a la endospora. Esta endospora puede permanecer viable en el ambiente hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Monteiro et al., 2008; Villarreal et al., 2018).



**Figura 1.** Ciclo de reproducción del género *Bacillus* (Villarreal et al., 2018).

### 2.3.2 Aplicación de *B. subtilis* en cultivos vegetales

Las raíces de las plantas están rodeadas por una ligera capa de suelo, la cual se conoce como rizósfera y es el lugar donde se lleva a cabo de absorción de nutrientes, además es el sitio donde suceden importantes actividades químicas, físicas y biológicas. Por ello es que la aplicación de *B. subtilis* a la rizósfera mejora la tolerancia al estrés biótico y abiótico de la planta (Hashem et al., 2019).

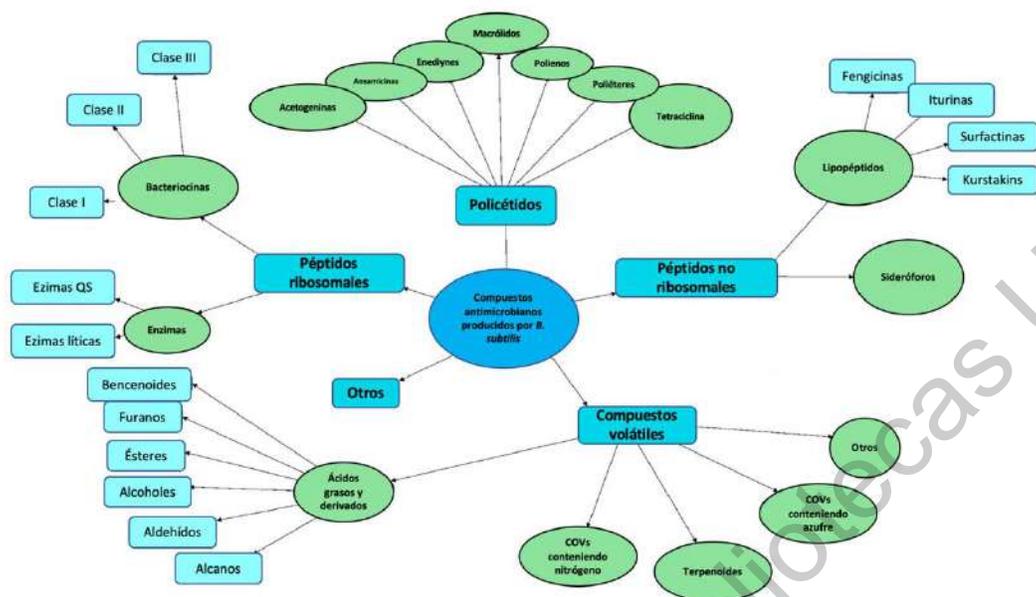
Esta inducción de resistencia por parte de *B. subtilis* a la planta implica la expresión de genes y hormonas específicas como la ACC (aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa), que se encarga de degradar el precursor de etileno ayudando así a aliviar el estrés de las plantas, manteniendo la homeostasis. *B. subtilis* también produce algunos compuestos orgánicos volátiles que ayuda a las plantas a resistir el ataque de patógenos. Secreta exopolisacaridos y sideróforos que inhiben el movimiento de iones tóxicos y ayudan a mantener el equilibrio iónico, además de promover el movimiento del agua en la planta (Hashem et al., 2019).

#### 2.3.2.1 Colonización de raíz

El genoma de *B. subtilis* codifica para diez quimiorreceptores conocidos como ligandos, que perciben aminoácidos, carbono y oxígeno, los cuales le permiten encontrar un entorno específico en las raíces de las plantas. Para lo anterior se requiere la activación de las señales de quimiotaxis las cuales tardan entre 4 y 8 h una vez que ha sido inoculada y requiere de 24 h para formar una biopelícula (Hashem et al., 2019).

#### 2.3.2.2 Actividad de biocontrol

*B. subtilis* produce metabolitos antimicrobianos, antibióticos y enzimas hidrolíticas que pueden ser utilizados como sustitutos de químicos y plaguicidas sintéticos. Se estima que del genoma de *B. subtilis* el 4 % - 5 % está dedicado a la producción de compuestos antimicrobianos, éstos compuestos se han categorizado en clases, y estas clases se han dividido en subclases de acuerdo con su ruta biosintética (Figura 2) (Caulier et al., 2019).

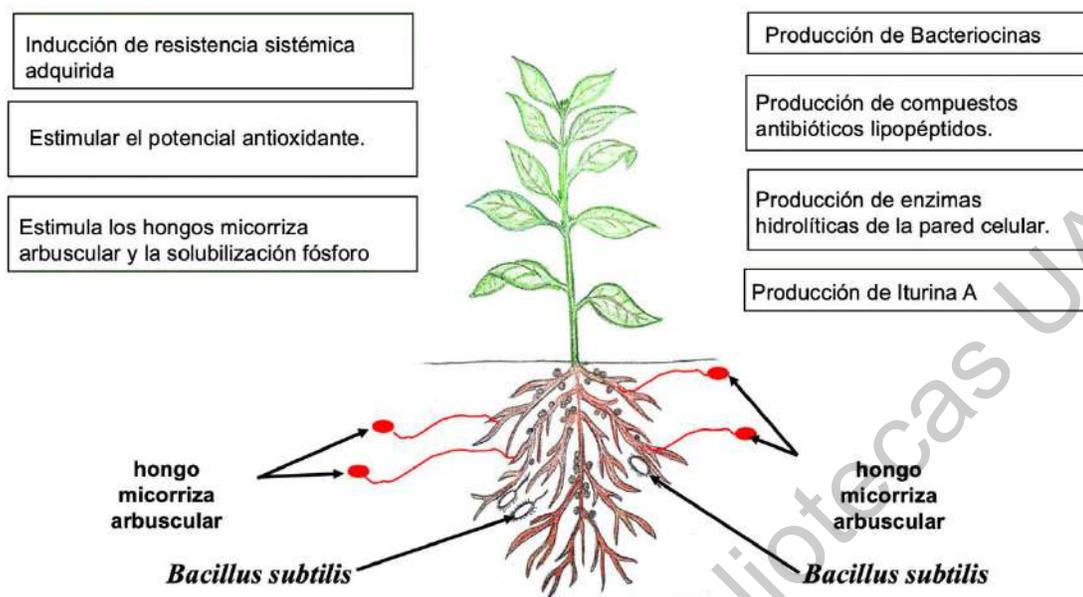


**Figura 2.** Compuestos antimicrobianos producidos por *B. subtilis* adaptado de (Caulier et al., 2019).

*B. subtilis* es capaz de modificar su entorno para favorecer su desarrollo, sin embargo, su capacidad de control biológico depende de tres factores:

- Vulnerabilidad del anfitrión
- Virulencia de patógenos
- El entorno

Se sabe que *B. subtilis* activa la resistencia sistémica inducida (ISR) del huésped que la ocupa, aumentando así la resistencia de la planta a los patógenos. La Figura 3 muestra algunos mecanismos de biocontrol de *B. subtilis* (Hashem et al., 2019).



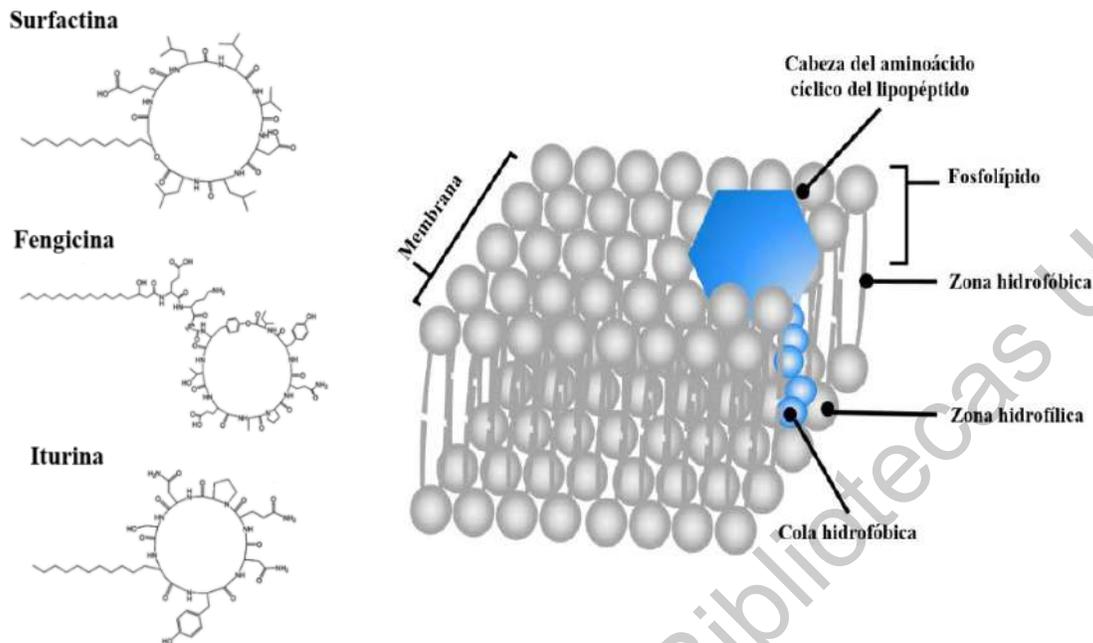
**Figura 3.** Mecanismos de *B. subtilis* en el control biológico del estrés biótico adaptado de Hashem et al. (2019).

Entre los mecanismos de control biológico más estudiados podemos encontrar:

- Producción de lipopéptidos

Los lipopéptidos (LPs) consisten estructuralmente de un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi o  $\beta$ -amino, clasificándose en tres familias (iturinas, fengicidas y surfactinas), de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud de ácido graso (Figura 4) (Villarreal et al., 2018).

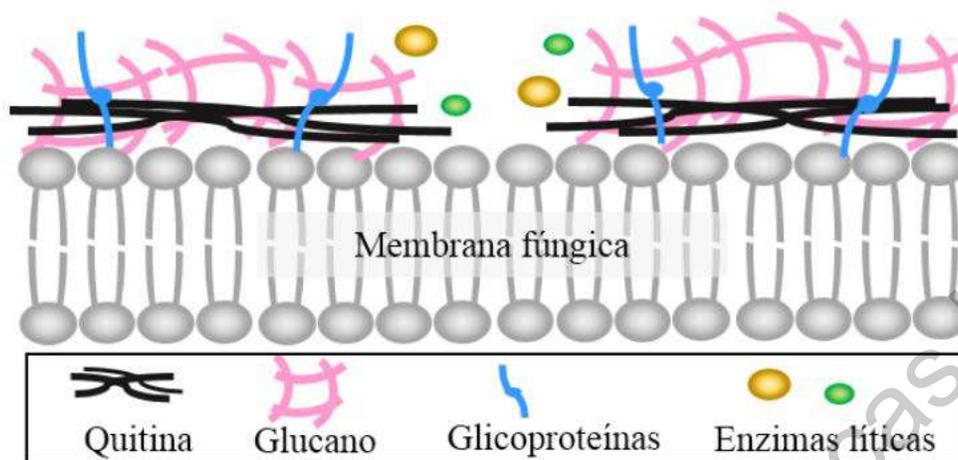
Estas familias han sido estudiadas por su capacidad antifúngica y antibacteriana, la cual tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, ocasionando la muerte de los organismos patógenos (Figura 4). Debe mencionarse que los lipopéptidos también influyen en la regulación de procesos para la motilidad y formación de biopelículas de *B. subtilis* (Villarreal et al., 2018).



**Figura 4.** Estructura de las principales familias de lipopéptidos (Villarreal et al., 2018).

- Producción de enzimas líticas

Las enzimas líticas (quitinasas y  $\beta$ -glucanasas) son enzimas capaces de degradar los principales polisacáridos de la pared celular de los hongos fitopatógenos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos. Se sabe que los hongos tienen una pared celular conformada por glicoproteínas y polisacáridos, entre otros. La fracción de polisacáridos puede comprender hasta un 80 % de la pared celular de los hongos (quitina 10 % -20 % y glucano 50 % -60 %), observar Figura 5 (Villarreal et al., 2018).

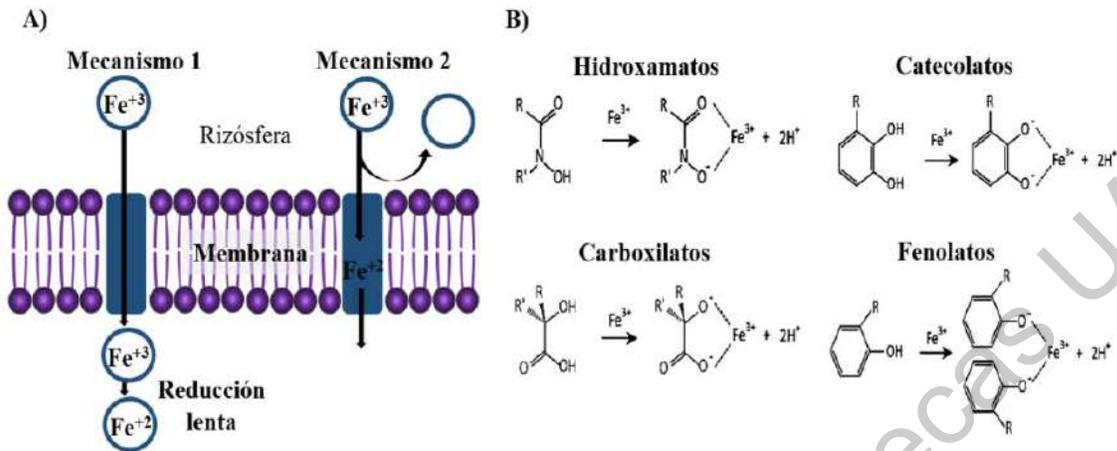


**Figura 5.** Degradación de la pared celular de hongos patógenos por enzimas líticas (Villarreal et al., 2018).

- Producción de sideróforos

Los sideróforos son metabolitos secundarios que actúan como secuestrantes o quelantes de hierro, formando complejos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo a través de la membrana celular de *B. subtilis*.

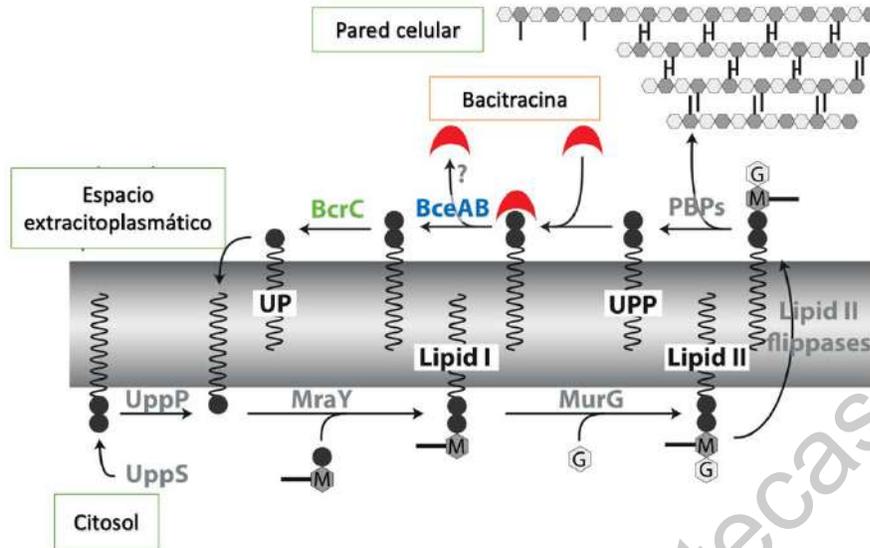
De esta manera *B. subtilis* puede utilizarlo por dos mecanismos; ya sea directamente mediante el complejo formado  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo o bien, reducido extracelularmente a complejos  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 6A). Los sideróforos se clasifican en función de su principal grupo quelante en: hidroxamatos (utilizando ácidos hidroxámicos), catecolacos (anillos de catecol), carboxilatos y fenolatos (Figura 6B). Estos sideróforos ocasionan que el  $\text{Fe}^{3+}$  no se encuentre disponible para los microorganismos patógenos cuyo crecimiento es altamente dependiente de este metal (Villarreal et al., 2018) .



**Figura 6.** A) Sideróforos como mecanismo de inhibición de  $Fe^{3+}$  para patógenos.  
 B) Principales estructuras quelantes de sideróforos (Villarreal et al., 2018).

- Producción de bacitracina

La bacitracina es un antibiótico producido por *B. subtilis* contra bacterias Gram positivas inhibiendo la formación de la pared celular de estas, pues actúa sobre la translocación del portador lipídico, precursor de los peptidoglicanos en el ciclo del lípido II, importante para la biosíntesis de la pared celular (Figura 7) (Awais et al., 2007; Radeck et al., 2016; Caulier et al., 2019).



**Figura 7.** La bacitracina bloquea el ciclo esencial de lípidos II uniéndose a la UPP (undecaprenil pirofosfato), evitando así la síntesis de pared celular bacteriana adaptado de (Radeck et al., 2016) \*PBPs= proteínas de unión a penicilina.

- Producción de subtilina

La subtilina pertenece a los lantibióticos de la clase 1 de las bacteriocinas. La producción de subtilina es una respuesta a la densidad celular y a la reducción de nutrientes, generando un modo de acción contra bacterias Gram positivas.

Por una parte pueden inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias diana mediante la unión al lípido II, el principal transportador de subunidades de peptidoglicano a través de la membrana celular interna. Por otro lado, el lípido II puede usarse como una molécula de acoplamiento para insertar el lantibiótico en la membrana que conduce a la formación de poros y finalmente a la muerte celular (Caulier et al., 2019).

Es importante mencionar que se ha encontrado que subtilina es estable al calor, Qin et al. (2019) observaron que subtilina es estable a altas temperaturas, en el estudio se observó que después de 30 min de tratamiento térmico a 80 °C se mantiene un

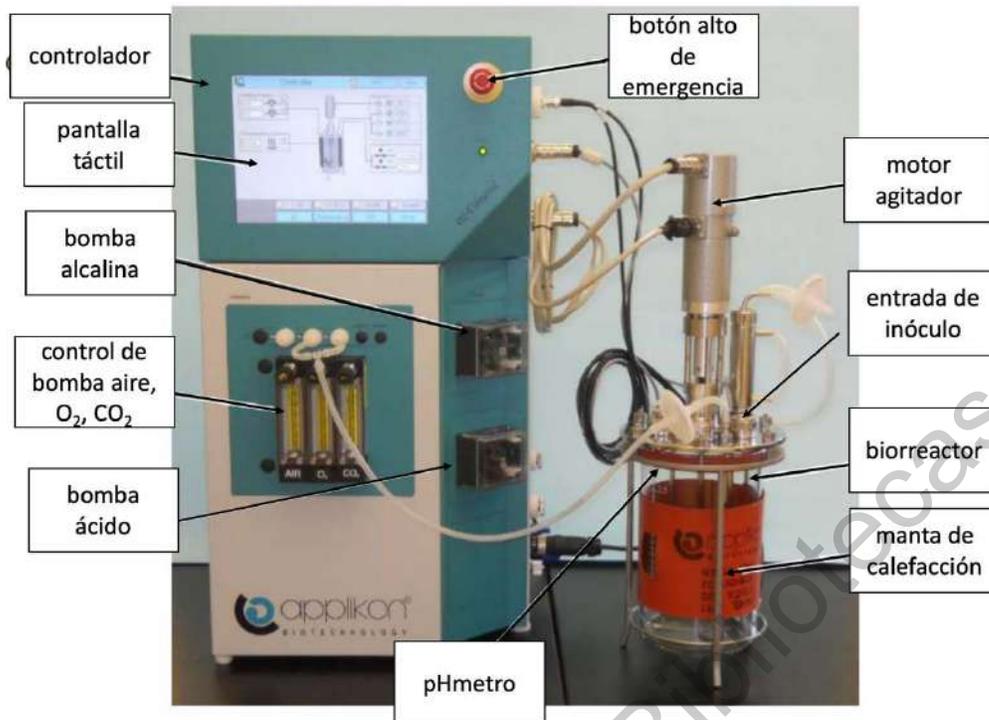
97 % de la actividad antibacteriana, y a 121 °C durante 20 min se mantiene un 54 %.

#### 2.4 Biorreactor

Los biorreactores son dispositivos en los cuales se lleva a cabo una reacción o proceso biológico, especialmente a una escala industrial, comúnmente combinan un organismo vivo con un medio ambiente que contiene medios de cultivo celular (Kaasi & Jardini, 2016).

Son utilizados en las áreas de bioprocésamiento y en la mejora u optimización de un proceso biológico. El campo del bioprocésamiento puede agruparse en tres categorías principales las cuales son: biofarmacéuticos, químicos industriales y ayuda para la gestión ambiental (Kaasi & Jardini, 2016).

A continuación, en la Figura 8 se muestran las partes básicas de un biorreactor instrumentado.



**Figura 8.** Biorreactor instrumentado modelo Z31011001 Applikon ez- control.

Los biorreactores se pueden dividir en las siguientes categorías de acuerdo a la organización de sus flujos de masa:

- Biorreactores por lotes

También conocido como de alimentación discontinua, en este tipo de biorreactor el sustrato se suministra en lotes a una cantidad de células o microorganismos en una concentración inicial para dar paso a la biotransformación del sustrato por parte de ellos. Finalizando una vez el sustrato sea totalmente transformado. Se trata de un proceso simple y ampliamente utilizado tanto en laboratorios como en escalas industriales (Kresnowati & Chen, 2011).

- Biorreactores semicontinuos

En los biorreactores semicontinuos o “fed-batch”, la adición de los sustratos a transformar se da de manera continua o parcialmente sin que exista salida o efluentes del sistema. El objetivo de este tipo de reactor es el de mejorar las condiciones o rendimientos del proceso fermentativo, manteniendo una cantidad

determinada de sustrato en el medio, teniendo como principal limitante la capacidad o el tamaño del reactor (Kresnowati & Chen, 2011).

- Biorreactores continuos

En este tipo de biorreactor el suministro de sustrato se da de manera continua y de manera paralela, se procede al retiro de los productos generados. Con estas características, es posible el obtener condiciones de crecimiento y transformación de los microorganismos en un estado estacionario, siendo esto favorable para la producción constante e identificación de condiciones óptimas de producción (Kresnowati & Chen, 2011).

Aunque cada biocatalizador inmovilizado puede aplicarse a diferentes tipos de biorreactores, es importante seleccionar un método de inmovilización y un biorreactor adecuado al proceso de fermentación correspondiente para el funcionamiento óptimo del sistema. Por ello los biorreactores también se pueden clasificar en tres tipos según la organización del flujo dentro del aparato y el movimiento de la fase sólida (Kostov et al., 2020).

- Biorreactores con mezcla de la fase sólida

Una alternativa a la fermentación sumergida son las fermentaciones en estado sólido debido a la alta demanda productos bioactivos. Sin embargo, sigue teniendo desventajas en el escalamiento debido a la falta de un diseño escalable para que haya una mayor eficiencia en la distribución de calor, masa y poder controlar las condiciones asépticas (Arora et al., 2018).

- Biorreactores con fase sólida fija

La parte fija a la estructura de la cámara del reactor es el medio portador, por lo cual puede lavarse por flujo contracorrientes para evitar obstrucciones. En este tipo de reactores es importante evitar flujos turbulentos para evitar una distribución desigual del sustrato en reactor al igual que el agotamiento de oxígeno por la formación de bolsas (Pulkkinen et al., 2019).

- Biorreactores con superficie móvil

En los reactores de fase móvil tienen una mayor aplicación para el tratamiento de aguas residuales. Tiene un movimiento mecánico o mediante aire comprimido que provocan en movimiento del medio portador generado un lavado entre si y proporcionando oxígeno al medio. Una de las ventajas de este tipo de reactores es la fácil operatividad y baja pérdida de carga (Pulkkinen et al., 2019).

#### 2.4.1 Parámetros y modos de operación de biorreactores

Al tratarse de proceso de transformación de sustratos por el crecimiento de microorganismos, se ven involucrados diferentes parámetros ligados a ellos a manejar con la finalidad de identificar las mejores condiciones del proceso. Es necesario comprender las características nutricionales celulares de mayor relevancia como lo es el pH, la temperatura y el oxígeno para generar un proceso de cultivo óptimo. Sin embargo, existen otros parámetros que también son muy relevantes, por ejemplo, en un entorno dinámico con agitación la mecánica de fluidos causada por el impulsor también juega un papel importante en el cultivo celular. Así mismo ajustar los parámetros adecuadamente desde un inicio es fundamental, si esto no se lleva a cabo es probable tener un retraso en el crecimiento del cultivo celular. No es suficiente analizar el efecto individual de cada uno de nuestros parámetros, ya que estos actúan de manera conjunta y sinérgica, por lo tanto es necesario utilizar tecnologías de alto rendimiento para analizar dichas interacciones entre variables (Abraham, 2016).

#### 2.4.1.1 pH

Uno de los factores más importantes que propician la unión de las células y su distribución y crecimiento constante en el biorreactor es precisamente el pH del medio de cultivo. El pH adecuado para el cultivo celular dentro del biorreactor normalmente es conservado por una solución amortiguadora a base de bicarbonato disuelto con CO<sub>2</sub>. Pero a medida que el cultivo celular crece, también aumentan ciertos metabolitos ácidos como el ácido láctico, por esta razón el cultivo se acidifica y como resultado de esto sería necesario agregar una base (Abraham, 2016).

#### 2.4.1.2 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más delicados ya que el rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos suele ser estrecho. Si estos son cultivados a una temperatura por arriba de la ideal se podría afectar la expresión de proteínas o la síntesis de metabolitos y en el caso en el que la temperatura sea baja el cultivo crecerá de manera muy lenta (Zhong, 2011).

#### 2.4.1.3 Oxígeno disuelto

El suministro de oxígeno juega un papel crucial en el crecimiento celular y la formación de productos. Es por ello que este elemento es siempre una preocupación mayor al momento de ajustar los parámetros en un biorreactor. La saturación de oxígeno es determinada por tres factores principales: la tasa específica de consumo de oxígeno, la concentración celular y el coeficiente volumétrico de transferencia. A mayor densidad celular mayor consumo de oxígeno, es por esto que un aspecto crítico del diseño experimental en el biorreactor es tener un coeficiente de transferencia de oxígeno adecuado. Algunos de los factores que influyen en el coeficiente de transferencia son: la velocidad de agitación, la composición del medio, las propiedades del biocatalizador, la tasa de aireación (Zhong, 2011).

#### 2.4.1.4 Velocidad de agitación

La velocidad de agitación es un factor que afecta directamente a transferencia de masa de la interfaz y la transferencia de oxígeno a la fase líquida. Se ha observado que al aumentar la velocidad de agitación aumenta la velocidad de transferencia de oxígeno debido al incremento de burbujas. Sin embargo, la formación de vórtices restringe la velocidad de agitación (Reyes et al., 2016; Tajssoleiman et al., 2019).

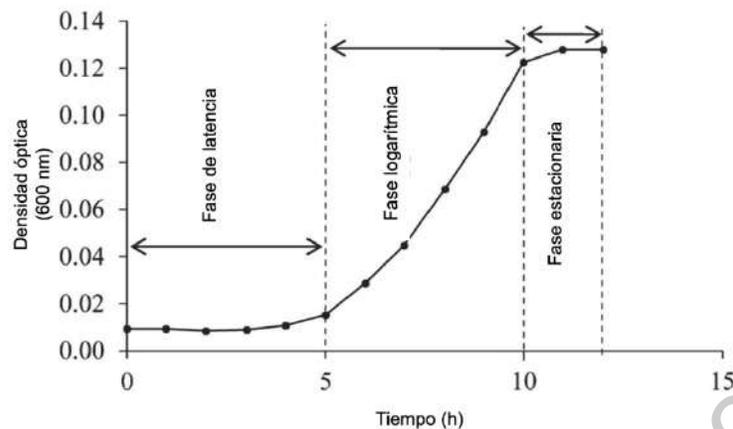
#### 2.4.1.5 Impulsor

Los impulsores crean una zona de flujo intenso y alto corte para obtener distribuciones uniformes de las mezclas. El diseño de los impulsores va a determinar el tipo de flujo que se va a generar, es importante considerar el diseño para obtener consumo de potencia, además de tener una relación lineal con la velocidad de agitación, la energía de la mezcla y la aireación (Ramírez-Muñoz et al., 2016; Tajssoleiman et al., 2019).

#### 2.4.1.6 Cinética de crecimiento de *B. subtilis*

Se ha reportado la cinética de crecimiento de *B. subtilis*, donde en la fase de latencia existe una población de  $\sim 10^1$  cel/mL, y es en la fase logarítmica cuando comienza a incrementar la población  $\sim 10^3$  cel/mL, y esta fase alcanza su máximo crecimiento con  $10^6$  cel/mL). Cuando llega a una concentración de  $10^7$  cel/mL el número células viables comienza a bajar (Sahoo et al., 2016).

La Figura 9 muestra la fase de latencia, logarítmica y estacionaria. Podemos observar el crecimiento celular a través de las etapas de crecimiento gracias al cambio (aumento) en la densidad óptica



**Figura 9.** Cinética de crecimiento de *B. subtilis* adaptado de (Sahoo et al., 2016).

## 2.5 Microencapsulación

La microencapsulación es un proceso en el cual sustancias activas se recubren de materiales que forman una cápsula extremadamente pequeña. Es una tecnología que se ha usado en la industria cosmética, farmacéutica, agroquímica y alimentaria, siendo principalmente usada para aceites, aromas, microorganismos, vitaminas, entre otros; cabe mencionar que el tamaño de una microcápsula varía (entre 0.2 a 5,000  $\mu\text{m}$ ). El éxito de esta tecnología debe a la correcta elección del material de pared, la forma de liberación del núcleo y la metodología de microencapsulación. La microcápsula actúa como película protectora del núcleo, es decir, del contenido de la misma, de esta manera aísla el núcleo evitando el efecto de su exposición inadecuada (Silva et al., 2014).

### 2.5.2 Tecnología de microencapsulación

La microencapsulación se puede realizar mediante métodos como la extrusión, coacervación, liofilización y secado por aspersion. La extrusión es conocida por ser de bajo costo y muy simple. Implica preparar una solución de hidrocoloide a la que se le agregan los microorganismos y esto se extruye a través de una jeringa dando

como resultado la formación gotas que caen en una solución que formará las cápsulas (Martín et al., 2015).

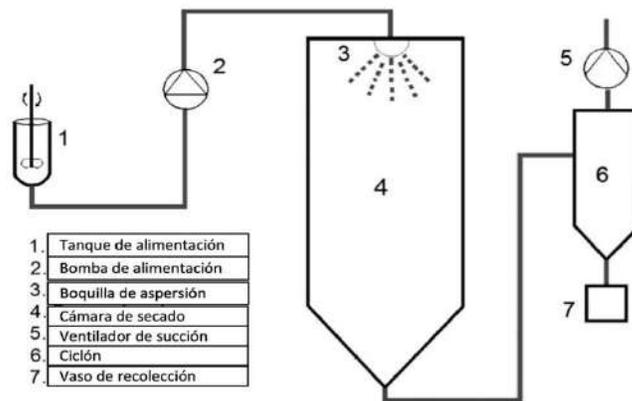
La coacervación se refiere a la separación de fases de coloides liófilos, en microgotas líquidas en lugar de agregados. Aunque este método tiene una eficiencia de encapsulación muy alta, el proceso resulta altamente costoso y complejo, por lo que no se prefiere el uso a escala industrial (Soukoulis & Bohn, 2018).

La liofilización es un método en donde el agua se elimina de una solución congelada a través de la sublimación a presión reducida bajo condiciones de vacío, dando lugar a productos secos de alta calidad. A pesar de su alta eficiencia generalmente no se usa a gran escala puesto que es un proceso muy largo en tiempo y gasto de energía (Barbosa et al., 2015).

#### 2.5.2.1 Secado por aspersion

Es otra técnica de microencapsulación y tienes varias ventajas en comparación con los métodos mencionados con anterioridad, ya que es económico y efectivo en la protección de materiales. Básicamente esta técnica consiste de la preparación de la emulsión o suspensión del material a encapsular en una solución de encapsulante, la atomización y la deshidratación de las partículas atomizadas. La adecuada selección del atomizador y el agente encapsulante, son factores críticos. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s), finalmente se obtiene un polvo (Islas, 2019).

La Figura 10 muestra las partes básicas de un sistema de secado por aspersion, donde la muestra es colocada en el tanque y es absorbida por la bomba de alimentación, posteriormente en la boquilla de aspersion la muestra sale en forma de microgotas y entra a la camara de secado donde recibe altas temperaturas, finalmente la muestra se recolecta en el vaso de recolección.



**Figura 10.** Sistema de secado por aspersión adaptado de (Martín et al., 2015).

Es importante mencionar que en esta técnica se debe controlar:

- Alimentación del producto
- Flujo de aire
- Temperatura de entrada y salida

Se tiene la ventaja de que se el secador por aspersión se puede operar de manera continua, pero la desventaja de las condiciones inherentes al proceso (altas temperaturas, estrés osmótico, deshidratación y exposición al oxígeno) que podrían dañar ácidos grasos, proteínas intracelulares, ribosomas, DNA y RNA de las bacterias causando su muerte. Por ello es importante conocer las propiedades de la bacteria que se llevará a microencapsular y ajustar los parámetros de secado por aspersión (temperatura de entrada y salida, flujo, presión del aire y tiempo de residencia) (Barbosa et al., 2015; Martín et al., 2015).

#### 2.5.2.1.1 Materiales de pared

Elegir correctamente el material de pared que se utilizará tiene suma importancia, ya que será este quien brinde protección y estabilidad al núcleo de la microcápsula.

Por ello es importante que el material elegido de pared no reaccione con el núcleo y tenga la capacidad de mantener el núcleo dentro de la microcápsula. Una práctica común para seleccionar materiales de pared implica la mezcla de estos, y para ello existen polímeros naturales y sintéticos (Silva et al., 2014):

- Carbohidratos: almidones modificados, almidón, dextrinas, sacarosa, celulosa, quitosano.
- Gomas: goma arábiga, alginato y carragenina.
- Lípidos: ceras, parafinas, monoglicéridos, diglicerol, aceites y grasas hidrogenadas.
- Materiales inorgánicos: sulfato de calcio, silicatos.
- Proteínas: gluten, caseína, gelatina y albúmina.

Los carbohidratos como almidón, la maltodextrina, y proteínas como la obtenida del suero de leche, son las más usadas como materiales de pared, ya que son de bajo costo, generalmente biocompatibles y son reconocidos como seguros. Para los sistemas donde se combinan diversos carbohidratos y proteínas, se ha visto una mayor eficiencia de microencapsulación. Así como la capacidad de tener mayor tiempo de almacenamiento, comparado con la microencapsulación de un solo material (Liu et al., 2019).

Resulta evidente que las propiedades de las películas encapsulantes formadas dependen mucho de la naturaleza del polímero. Una propiedad que se debe considerar en un polímero es su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la cual determina la cohesividad que se logrará al formar la película. Si es calentado por encima de la  $T_g$  las capas de la película se vuelven más cohesivas, esto se debe a que existe una mayor movilidad molecular como efecto de la temperatura lo que impacta en la adhesión de la película en el material a proteger. Debajo de esta temperatura el polímero tiene un comportamiento parecido a un cristal. La  $T_g$  puede disminuirse con la adición de un plastificante, el cual además resultara en reducir la fragilidad de la película y modificará su permeabilidad (Islas, 2019).

#### 2.5.1.1 Proteína de suero de leche

La mezcla de proteínas globulares aisladas de suero de leche, son un residuo que se genera como parte del proceso de producción de quesos. Esta mezcla consta principalmente de tres proteínas:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y albúmina sérica bovina (Corrochano et al., 2018).

Una de las ventajas del uso de las proteínas del suero de leche es que poseen alta capacidad emulsificante y generan microcápsulas de tamaño tan pequeño como  $< 2 \mu\text{m}$ . Pueden utilizarse solas o combinadas con carbohidratos a fin de modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas. El uso de proteínas de suero de leche tiene efecto en la morfología de las microcápsulas logrando que sean más esféricas y tersas (Islas, 2019).

#### 2.5.1.2 Maltodextrina

La maltodextrina es un almidón hidrolizado mediante un proceso ácido o enzimático que puede ser utilizado como material de pared para encapsular en la industria alimentaria debido a baja viscosidad a alta concentración y a su alta proporción de sólidos y buena solubilidad, además de su buena protección contra la oxidación (Parra, 2011; Souza et al., 2018).

Debido a su baja capacidad emulsificante, debe de ser utilizado en combinación con otros biopolímeros tensoactivos para tener una encapsulación eficaz. El uso de maltodextrina genera una morfología esférica y lisa en las microcápsulas (Amaya-Cano & Salcedo-Galán, 2020).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La población mundial crece cada año, y es de esperar que la sobrepoblación tenga como consecuencia el incremento de la demanda de alimentos, siendo los origen vegetal fundamentales para una dieta saludable. Para satisfacer esta demanda alimentaria anticipada se han propuesto varias estrategias, la más importante es el incremento en la eficiencia de los cultivos. Generalmente esto se logra con el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, los cuales generan numerosas consecuencias, como lo son: la acidificación del suelo y disminución de su contenido de materia orgánica, la emisión de gases efecto invernadero, la pérdida de la biodiversidad, entre otros.

Por ello se plantea la producción de un inoculante microbiano a base de *B. subtilis* PC. Esta bacteria aumenta la fijación de carbono en el suelo, aumenta la capacidad de retención de humedad, mejora la textura del suelo y lo mantiene en condiciones óptimas para cultivo, ayudan a la planta a asimilar los nutrientes, facilitan el crecimiento de la planta en tiempos de sequía, e inhibe algunos patógenos de plantas; por lo que puede ser una alternativa a los fertilizantes y pesticidas químicos.

A fin de aprovechar todas las ventajas que el uso de *B. subtilis* como inoculante y de evitar que el almacenamiento represente gran gasto económico y de tiempo, se propone la microencapsulación de la bacteria, esperando lograr así que conserve su viabilidad durante su almacenamiento y en consecuencia su efecto biológico.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Producir un inoculante microbiano de *Bacillus subtilis* PC microencapsulado mediante secado por aspersión y evaluar la viabilidad durante su almacenamiento.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la dinámica de crecimiento de una cepa de *B. subtilis* PC en biorreactor instrumentado.
- Determinar la producción de péptidos antimicrobianos durante el crecimiento de *B. subtilis* PC en biorreactor, mediante electroforesis Tris-tricina y zimografía.
- Determinar los parámetros de temperatura de entrada y velocidad de alimentación para la microencapsulación con almidones modificados y proteína de suero de leche, mediante secado por aspersión de *B. subtilis* PC
- Determinar la viabilidad celular del producto microencapsulado en un periodo de cinco meses, almacenado a 4 °C, 25 °C y 37 °C.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material biológico

La cepa *B. subtilis* PC, fue proporcionada por la empresa Procobi (Productos de control biológico y nutrición vegetal S.A. de C.V.).

### 5.2 Reactivos y medios de cultivo

El antiespumante grado alimenticio Antifom se obtuvo de PROVISTA (Querétaro, México), extracto de levadura se obtuvo Sigma-aldrich (San Luis, MO, EE. UU.), Glicerol, NaCl, KCl, ácido acético glacial,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$  se obtuvieron de J.T. Baker (Center Valley, PA, EE. UU.), peptona bacteriológica (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), maltodextrina y proteína de suero de leche se adquirieron de Ingredion (SJR, Querétaro, México). El colorante verde malaquita y safranina fueron proporcionados por la empresa PROCOBI (Querétaro, México). La acrilamida, bisacrilamida, Tris-Cl, dodecil sulfato sódico (SDS), persulfato de amonio, tetrametiletilendiamina (TEMED) se obtuvieron de Bio Rad (Hercules, CA, EE. UU.). El azul de Coomassie G-250 se obtuvo de Thermo Fisher (Walthman, MA, EE. UU.). La peptona bacteriológica se obtuvo de Becton Dickinson (México).

Medio Schaeffer modificado: 8 g de caldo nutritivo (Becton Dickinson, México), 1 g de KCl, 0.12 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mL de  $MnCl_2$  (0.1 mM), 0.142 g de  $Na_2SO_4$ , 10  $\mu$ L de  $FeSO_4$  (0.001 mM) para 1 L (pH de 7.0) (Schaeffer et al., 1965).

Caldo Luria: 5 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona caseína, para 1 L (pH de 7.0).

Agua peptonada: para un litro se pesó 1 g de peptona bacteriológica (se obtuvo de Becton Dickinson, Querétaro, México).

Amortiguador de fosfatos de potasio: para 100 mL de agua destilada se pesó 0.66 g de  $K_2HPO_4$  y 0.84 g de  $KH_2PO_4$  y se ajustó a pH 7.0.

### 5.3 Geles para electroforesis y solución de tinción

Gel separador: 9.80 mL de acrilamida al 30 % (p/v) / bisacrilamida al 0.8 % (p/v) , 10 mL de Tris-Cl (1N)/ SDS (0.3 %) a pH 8.45, 7.03 mL de H<sub>2</sub>O HPLC, 3.17 mL de glicerol, 50 µl persulfato de amonio al 10 % (p/v) y 10 µl de TEMED.

Gel concentrador: 1.62 mL de acrilamida al 30 % (p/v) / bisacrilamida al 0.8 % (p/v), 3.10 mL de Tris-Cl (1N)/ SDS (0.3 %) a pH 8.45, 7.78 mL de H<sub>2</sub>O grado HPLC, 25 µl de persulfato de amonio al 10 % (p/v) y 5 µl de TEMED.

Solución de tinción azul de Coomassie G-250: 100 mL de ácido acético, 0.25 g de azul de Coomassie G-250, 900 mL de agua grado HPLC. Solución decolorante: 100 ml de ácido acético glacial, 900 mL de agua grado HPLC (Coligan et al., 2002).

### 5.4 Métodos

#### 5.4.1 Conservación de la cepa de *B. subtilis* PC mediante crioconservación

La conservación se realizó en chaquiras (esferas de vidrio de 2mm) para lo cual, las chaquiras se lavaron con detergente y agua destilada, posteriormente se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico 2 % (v/v) durante 2 h, y se enjuagaron con agua destilada hasta que el pH fue neutro.

Posteriormente se colocaron de 20 a 40 chaquiras de vidrio neutralizadas en viales con tapa de rosca, y se esterilizaron en aire seco a 180 °C durante 1 h en horno (Shel Lab modelo 1350 FX). Se cultivó *B. subtilis* PC en caldo triptona soya (CTS) a pH 7.0, 37 °C (BD Bioxon, México), posteriormente se aislaron las colonias en medio agar soya tripticasa (AST) (BD Bioxon, México). A partir de una colonia aislada se inocularon dos tubos inclinados de medio AST, para verificar la pureza del cultivo.

Se preparó 1 mL de una mezcla de leche 100 % descremada (Nestlé, México) y glicerol, con una concentración final de 10 % (v/v), y se agregaron 0.5 mL de la mezcla al tubo inclinado con el cultivo de *B. subtilis* PC.

Con ayuda del asa se bajó la suspensión de células al fondo del tubo. Se tomó la suspensión con la punta de la micropipeta (20 µL) y se depositó en el vial que contenía las chaquiras estériles.

Se agitó suavemente para asegurar que las chaquiras se cubrieran de la suspensión. Posteriormente se removió el exceso de suspensión y se transfirieron las chaquiras a microtubos Eppendorf de 1.5 mL en la campana de flujo laminar.

Se almacenaron los cultivos en cajas de ultracogelación a -70 °C.

#### 5.4.2 Activación de la cepa

Se activó una chaquira conservada a -70 °C de *B. subtilis* PC en 5 mL de caldo Luria y se colocó en agitador orbital a 300 rpm a 37 °C durante 12 h. Después de la primera activación se inocularon 100 µL del cultivo en 5 mL de caldo Luria durante 6 h a 300 rpm a 37 °C. Transcurrido el tiempo se inocularon 500 µL del caldo fermentado en 25 mL de medio Schaeffer y se incubó por 6 h a 37 °C con agitación de 300 rpm.

#### 5.4.3 Conteo células y esporas

La determinación de la población viable se llevó a cabo mediante el método de vaciado en placa NOM-092-SSA1 (1994). Se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  en agua con diluyente de peptona bacteriológica (1 % p/v), posteriormente se tomó 1 mL por cada dilución y se vació en una caja de Petri, seguido por la incorporación de 20 mL en cada caja de medio Schaeffer con agar bacteriológico (BD, Bioxon, México). Se homogenizó apropiadamente y una vez solidificado se incubó durante 24 h a 37 °C.

El recuento de las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) de acuerdo a lo establecido por el método para la cuenta de bacterias aerobias en la NOM-092-SSA1 (1994).

El recuento de esporas se realizó por conteo directo y se estimó el porcentaje de esporas. A partir de un cultivo activado de *B. subtilis* PC en medio Schaeffer se tomaron 10  $\mu$ l y se realizó la tinción de esporas y de células, posteriormente se realizó el recuento de células bacterianas y de esporas para realizar la estimación del porcentaje de esporulación.

#### 5.4.3.1 Tinción de esporas

Para teñir las esporas de *B. subtilis* PC se utilizó el método de Schaeffer-Fulton, primero se preparó el frotis a partir del cultivo, posteriormente se cubrió la muestra con verde malaquita y se dejó reposar por 1 minuto, una vez transcurrido el tiempo se comenzó a evaporar con ayuda de un mechero el colorante verde malaquita durante 7 minutos, pero siempre manteniendo húmedo el frotis. Finalmente se enjuagó el porta objetos y se agregó safranina durante 1 minuto y se lavó.

#### 5.4.4 Producción a nivel biorreactor

A partir de un cultivo activo de *B. subtilis* PC se inocularon 25 mL de ese cultivo en 2 L de medio Schaeffer en el bioreactor.

Las condiciones del crecimiento en biorreactor instrumentado, modelo Z31011001 (Applikon ez- control. Delft, Holanda) fueron: Temperatura 37 °C, pH 7, velocidad de agitación 400 rpm, flujo de aire constante a 1.5 L aire/[(min)(L caldo cultivo)](vvm). Para el control de nivel de espuma se usó una solución de silicón Antifom FP al 0.01% (v/v). Mediante los sensores se tomaron lecturas del pH, oxígeno disuelto cada hora, durante un periodo de 12 h, así mismo se tomaron muestras cada hora (5 mL) para determinar la dinámica de crecimiento, así como el conteo de esporas.

Para obtener el peso de la biomasa durante cada hora, se tomarón 10 mL del cultivo de *B. subtilis* PC durante el crecimiento en biorreactor y se filtró con ayuda de la unidad de filtración en filtros de membranas de 45mm Isopore obtenidos de Sigma-aldrich (San Luis, MO, EE. UU.) previamente calibrados a peso constante Finalmente cada filtro se dejó secar durante 45 min a 70 °C. El peso de la biomasa se obtuvo por diferencia de peso de los filtros de membrana antes y después de agregar, filtrar y secar los 10 mL de cultivo de *B. subtilis* PC.

#### 5.4.4.1 Obtención de biomasa para la microencapsulación.

Del cultivo procedente del crecimiento en biorreactor se obtuvo la biomasa mediante centrifugación a 4,000 rpm durante 12 min, después se eliminó el extracto libre de células y se realizó el lavado de la biomasa con solución salina al 0.85 % (p/v). Este proceso se repitió dos veces más. Finalmente se eliminó el extracto libre de células y las células fueron suspendidas en 100 mL de amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.0, (1.5 % p/v).

#### 5.4.5 Microencapsulación mediante secado por aspersión

Para realizar la microencapsulación del cultivo de *B. subtilis* se utilizó la combinación de maltodextrina (Amidex 20 DE, CP Ingredientes, SJR, Querétaro, México) (80 % p/p) y concentrado de suero de leche en polvo (70 % en peso de proteína, New Zealand Dairy Board, NZ) (20 % p/p), estos se expusieron a luz UV durante 30 min y posteriormente se agregaron en 100 mL de amortiguador de fosfato de potasio (1.5 % p/v). Esta solución se mantuvo en refrigeración y agitación constante durante 8 h.

Una vez transcurrido el tiempo se mezcló y homogeneizó esta solución con la suspensión celular (5.4.4.1).

La microencapsulación se llevó a cabo en un mini secador por aspersión B-290 (Buchi, Barcelona, España) y se realizó bajo las siguientes condiciones:

Temperatura de entrada: se probaron tres temperaturas de entrada de 90 °C, 100 °C y 110 °C; alimentación de la suspensión de células de 1.4 mL/min, manteniendo el porcentaje de aspiración en 90 % y 96 %. Las cápsulas fueron recolectadas en un frasco estéril de vidrio y almacenadas a -70 °C para su conservación hasta su uso.

La eficiencia de microencapsulación se define como la tasa de supervivencia del microorganismo durante el proceso, calculada según la ecuación propuesta por Nunes et al. (2018):  $E (\%) = (N/N_0) \times 100$ .

Donde N es el número de células viables (log CFU\*g<sup>-1</sup> de sólidos) de microcápsulas, y N<sub>0</sub> es el número de células viables (log CFU\*g<sup>-1</sup> de sólidos) en las soluciones antes de microencapsular.

El rendimiento de microencapsulación se calculó mediante:  $R (\%) = (S_s/S_e) \times 100$ . Donde S<sub>s</sub> son los sólidos de salida (g) del secador y S<sub>e</sub> son los sólidos de entrada (g) al secador.

#### 5.4.5.1 Viabilidad celular

La viabilidad de las células después del secado por aspersion se calculó siguiendo lo reportado por Ma et al., (2015):

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = [(N \cdot S) / (N_0 \cdot W)] \cdot 100$$

Donde:

N= número de células viables después de la microencapsulación (UFC/g).

N<sub>0</sub>= número de células viables antes de la microencapsulación (UFC/mL).

S= Peso de las microcápsulas después del secado (g)

W= Volumen de la suspensión sometida a secado por aspersion (mL).

#### 5.4.6 Estabilidad de la cepa microencapsulada en función de la temperatura

Para determinar la estabilidad de la cepa microencapsulada como una función del tiempo y de la temperatura, se almacenaron 0.25 g del microencapsulado en tubos cónicos a 37 °C, a temperatura ambiente (~25 °C), y en refrigeración (4 °C). Se realizó el conteo celular cada quince días durante los primeros tres meses, posterior a los tres meses el conteo se realizó cada mes hasta llegar a cinco meses, estos recuentos se llevaron a cabo como se describe en la sección 5.4.2

#### 5.4.7 Electroforesis desnaturalizante en geles de acrilamida (SDS-PAGE) sistema Tris-Tricina

A partir del cultivo de *B. subtilis* PC procedente del biorreactor, se obtuvo el extracto libre de células mediante centrifugación a 4,000 rpm durante 12 min. Este extracto se ultrafiltró mediante membranas con punto de corte 10 kDa (Amicon® Ultra-4, Millipore, Darmstadt, Alemania) y posteriormente se concentró por calentamiento a 90 °C. Se obtuvieron alícuotas para determinar péptidos mediante electroforesis.

##### 5.4.7.1 Preparación del gel

En un matraz de destilación de 50 mL se mezcló una solución de acrilamida al 30 % bisacrilamida al 0.8 % (p/v), Tris-Cl / SDS a pH 8.45 y H<sub>2</sub>O. Se agregó glicerol solo al gel separador, se degasificó al vacío de 10 a 15 min, posteriormente se agregó persulfato de amonio al 10 % y TEMED. Se mezcló suavemente, y se usó inmediatamente. Posteriormente en el gel concentrador se puso el peine de teflón y se retiró con cuidado sin rasgar los bordes de los pocillos, cuando el gel ya había solidificado.

Para el gel separador y concentrador se encuentran las cantidades de los reactivos descritas en el apartado de geles para electroforesis 5.3.

#### 5.4.7.2 Separación de la mezcla de proteínas

La muestra de extracto libre de células obtenida previamente, se mezcló con amortiguador muestra de Tris-tricina 6X y se diluyeron los estándares de peso molecular (obtenidos de Bio-Rad) 1:20 en el amortiguador de muestra. Se calentó durante 5 min a 95 °C. Se enfrió y se cargó 5 µL por pozo para el mini gel de una cámara vertical de electroforesis (Hoeffer, CA, EE. UU.). Se llenó la parte superior de la cámara con amortiguador catódico hasta cubrir los pozos, mientras que la cámara inferior se llenó con amortiguador de ánodo, seguido por el montaje de la unidad. Para la separación de péptidos, se comenzó a correr durante 1 h a 30 V (voltaje constante), seguido de 4 a 5 h a 150 V (voltaje constante). Se utilizó un recirculador (Lauda mod. E100, Dresden, Alemania) para mantener la cámara de electroforesis a temperatura ambiente (~25 °C) (Ausubel et al., 2002).

La corrida terminó cuando el colorante azul de bromofenol migró cerca del final del gel separador. Para desmontar el gel se desconectó la fuente de alimentación, se desechó el amortiguador del electrodo y se retiró el amortiguador de la cámara superior.

#### 5.4.7.3 Tinción de la proteína

Se necesitan aproximadamente 0.5 µg de proteína por banda para la detección mediante la tinción de azul de Coomassie G-250. Se colocaron los geles en una solución fijadora durante 30 min. Se tiñeron con solución de azul de Coomassie G-250 durante 1 h. Se aplicó en solución decolorante azul de Coomassie G-250 durante 3 lavados de 15 minutos.

El tiempo máximo de fijación de 45 min y un tiempo máximo de tinción de 1.5 h con solución de tinción azul de Coomassie G-250. Después se destiñó el gel con ácido acético al 10 % (v/v), cambiando la solución cada 30 min hasta que el fondo tuviera una percepción transparente (de tres a cinco cambios) (Ausubel et al., 2002) Finalmente se digitalizó del gel en un fotodocumentador (Alpha Innotech SA-1000, red, CA, EE. UU.).

#### 5.4.7.4 Determinación de la actividad microbiana de los péptidos encontrados mediante difusión en agar

Se utilizó *Micrococcus luteus* como bacteria Gram positiva indicadora. Se vertió en una placa el medio assay al 1 % de agar y se colocó el segmento del gel sin teñir, posteriormente se vertió encima el medio assay al 0.8 %, se permitió que solidificara y se incubó a 30 °C por 48 h. Transcurrido ese tiempo se observó si existían halos de inhibición alrededor del segmentos del gel.

#### 5.5 Diseño experimental

En el estudio de estabilidad de la viabilidad durante el almacenamiento se empleó un diseño unifactorial con mediciones repetidas en el tiempo, donde el factor fue la temperatura con tres niveles (4 °C, 25 °C y 37 °C) y tiempo de almacenamiento (1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses y 5 meses). Se usó como control el cultivo de células de *B. subtilis* PC obtenidas del crecimiento en biorreactor almacenadas a las mismas temperaturas sin microencapsular.

#### 5.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se reporta la media  $\pm$  la desviación estándar. Para la comparación de medias de la viabilidad celular, se usó la prueba de Tukey con  $\alpha= 0.05$  para cada temperatura, y se realizó una regresión de la viabilidad como función del tiempo de almacenamiento en cada temperatura, para comparar distintas condiciones de almacenamiento.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

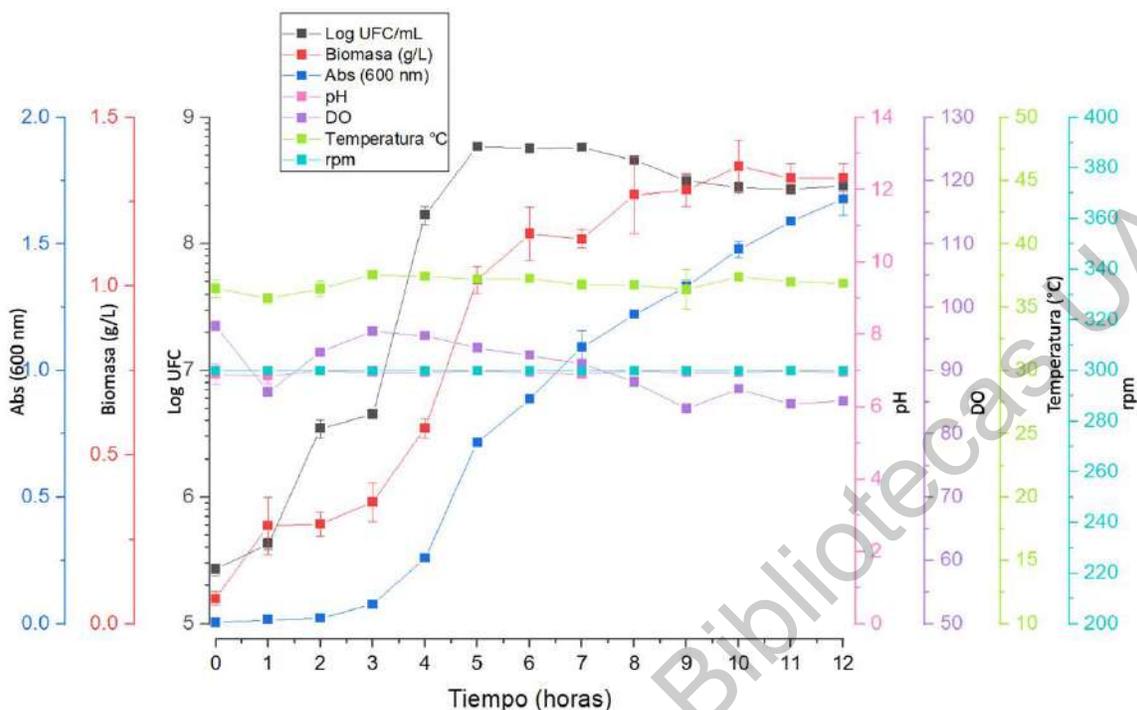
### 6.1 Caracterización de la dinámica de crecimiento de *B. subtilis* PC en biorreactor instrumentado

Para conocer la dinámica de desarrollo de *B. subtilis* PC en biorreactor se realizaron las cinéticas de crecimiento. Después de 12 h de fermentación se obtuvo una alta concentración de células de  $1 \times 10^8 \pm 10$  CFU/mL con una tasa específica durante el crecimiento exponencial de  $0.030 \pm 0.002$  min<sup>-1</sup>, y un tiempo de duplicación de  $22.57 \pm 0.60$  min.

La Figura 11 muestra el promedio de dos corridas independientes en biorreactor que permite observar la variabilidad durante la fermentación. Se puede observar que al inicio de la fase estacionaria se obtuvo  $1.0 \pm 0.1$  g L<sup>-1</sup> de biomasa, esto coincide con lo reportado por Espinosa de los Monteros et al. (2001), quienes a las 5 h encontraron que iniciaba la fase estacionaria con un valor para la biomasa igual a  $0.88$  g L<sup>-1</sup>.

Los parámetros arrojados por el software del biorreactor hasta las 24 h se muestran en el Anexo 1, estos parámetros han sido promediados y acortados hasta las 12 h para complementar la figura 11.

Es posible observar que tras 5 h de crecimiento *B. subtilis* PC termina su fase logarítmica y entra en fase estacionaria (Figura 11). Esta fase se da principalmente por el agotamiento de los nutrientes del medio, del espacio y la acumulación de sustancias nocivas producidas por las mismas células.



**Figura 11.** Cinética de crecimiento *B. subtilis* PC. \*Abs= absorbancia (densidad óptica), DO= Oxígeno disuelto, rpm= revoluciones por minuto.

Para sobrevivir, las células redirigen su metabolismo y fisiología haciendo frente a las condiciones hostiles. *B. subtilis* tiene la capacidad de realizar un proceso de diferenciación celular que conduce a la formación de una espora la cual es metabólicamente inactiva y altamente resistente a diversas condiciones ambientales (Phillips & Strauch, 2002). Estas esporas son capaces de sobrevivir a duras condiciones ambientales, y recuperar su ciclo vegetativo cuando el ambiente es favorable para su desarrollo (Tan & Ramamurthi, 2013).

En la Figura 12 se observa los resultados de la tinción de esporas (color verde), en donde se muestra que hasta las 8 h de cultivo no se presentaba esporulación, mientras que a las 9 h ya inicia la formación de esporas (endoesporas). Después de 10 h de crecimiento se observó que ya el 17 % de las células presentaban esporulación (Figura 13). A las 11 h las esporas ocupaban el 33 % de la población celular presente. Para las 12 h se observó que el 57 % de células se encontraban

como esporuladas y a las 24 h todas las células ya habían esporulado (Figura 14). Se concluye que el tiempo para total para la formación de esporas desde el inicio de su crecimiento y bajo las condiciones ensayadas es de 9 h, por su parte Siebring et al., (2014) mencionan que aunque tiempo aproximado observado para la maduración de esporas es de 7 h, este dependerá siempre de la cantidad de medio y del nivel del inoculo inicial.

En este estudio se observó esporulación hasta las 9 h después del inicio de crecimiento de *B. subtilis* PC. La bacteria crecía de manera logarítmica hasta las 5 h, donde probablemente comienza a tener una falta de nutrientes por la alta concentración celular y 4 h después se observaron esporas.

Los circuitos reguladores interconectados de *B. subtilis* dirigen las alteraciones en la expresión génica que ocurren al entrar en la fase estacionaria, llevando a la célula a lo largo del camino que ha detectado es más ventajoso para la supervivencia en el medio ambiente. La elección depende de la actividad de una elaborada red de transducción de señales. Si la célula se compromete a esporular, una cascada controlada de factores sigma de ARN polimerasa, conduce al desarrollo y liberación de una endospora desde el interior de la célula madre apoptótica (Phillips & Strauch, 2002).

En *Bacillus subtilis*, más de 100 genes están dedicados o son necesarios para el proceso de esporulación. Sin embargo, previo a la esporulación *B. subtilis* cumple las funciones necesarias para recolectar nutrientes alternativos y competir eficazmente con otras especies por los escasos recursos. Durante el estado de transición (fase estacionaria- esporulación), *B. subtilis* expresa varias proteasas extracelulares y otras enzimas degradantes, funciones de transporte y numerosas vías alternativas para buscar (quimiotaxis) y maximizar la utilización de nutrientes. Así mismo una variedad de antimicrobianos se bombean fuera de la célula en un esfuerzo por superar a otras especies microbianas cercanas (Phillips & Strauch, 2002).

La esporulación se considera generalmente como un último recurso al que se debe emprender sólo cuando se han agotado todos los demás intentos de crecer, competir y sobrevivir. Pero al momento que *B. subtilis* inicia la formación de esporas no hay vuelta atrás: si la célula no produce una spora completa en alrededor de 6 a 8 h a 37 ° C en cultivos de laboratorio (Hilbert & Piggot, 2004) la capacidad de propagar su información genética se pierde irremediabilmente.

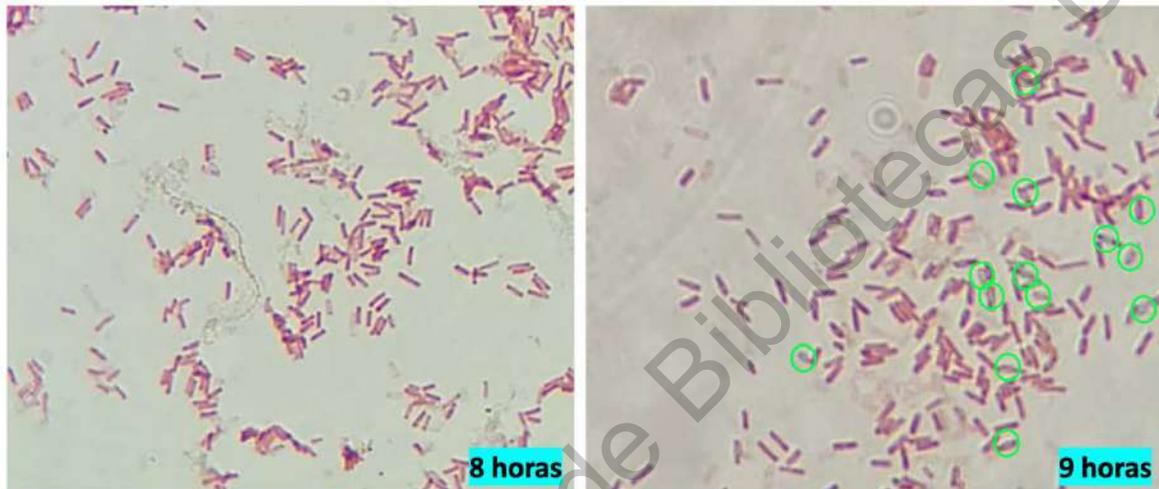
En el suelo el hábitat de *B. subtilis*, donde los nutrientes no suelen ser abundantes, el estado de crecimiento predominante de la célula es probablemente más parecido al estado de transición que al crecimiento logarítmico rápido en laboratorio.

En este sentido cuando la biomasa de un cultivo celular aumenta o los nutrientes son limitantes, ciertos péptidos secretados se acumulan en el medio extracelular y al alcanzar una concentración alta son detectados por receptores de superficie de la célula, los cuales son capaces de iniciar una secuencia de transferencia de grupos fosfato provenientes de ATP a través de histidina quinasas (Kin A, KinB, KinC y KinD) y dos proteínas intermedias, Spo0F y Spo0B, a un factor de transcripción, Spo0A (Sonenshein, 2000).

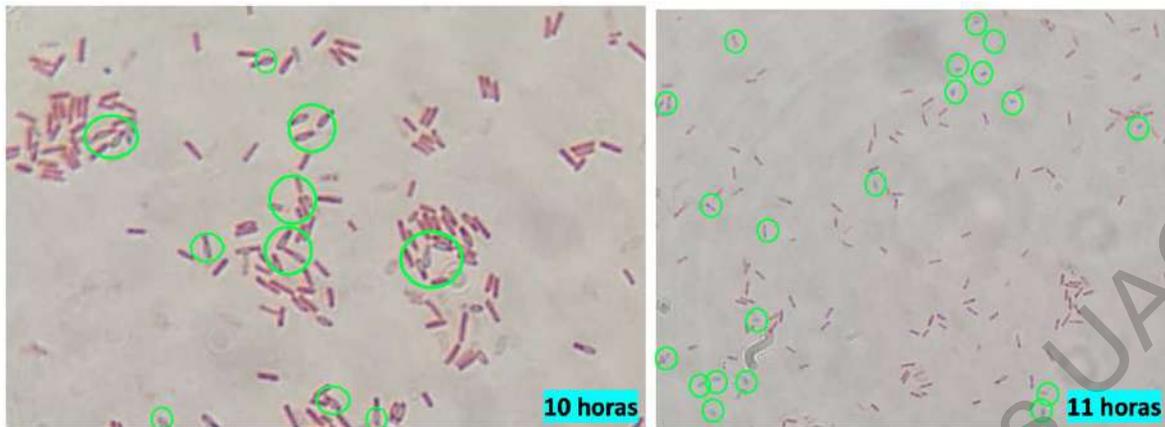
Una vez que Spo0A se encuentra fosforilada (Spo0A ~ P) reprime a abrB, el cual es un gen que codifica para un represor de genes de fase estacionaria, algunos de los cuales son requerido para la esporulación (Sonenshein, 2000).

La mayoría de los genes reprimidos por abrB también están controlados por uno o más reguladores adicionales que permiten que la célula responda a múltiples señales fisiológicas además de la densidad de población, como lo es la limitación de nutrientes, que induce a *B. subtilis* a iniciar la esporulación. En este sentido, las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo pueden ser los sustratos de crecimiento limitantes más importantes. Se han identificaron nucleótidos de guanina, particularmente GDP y GTP, como probables indicadores intracelulares de

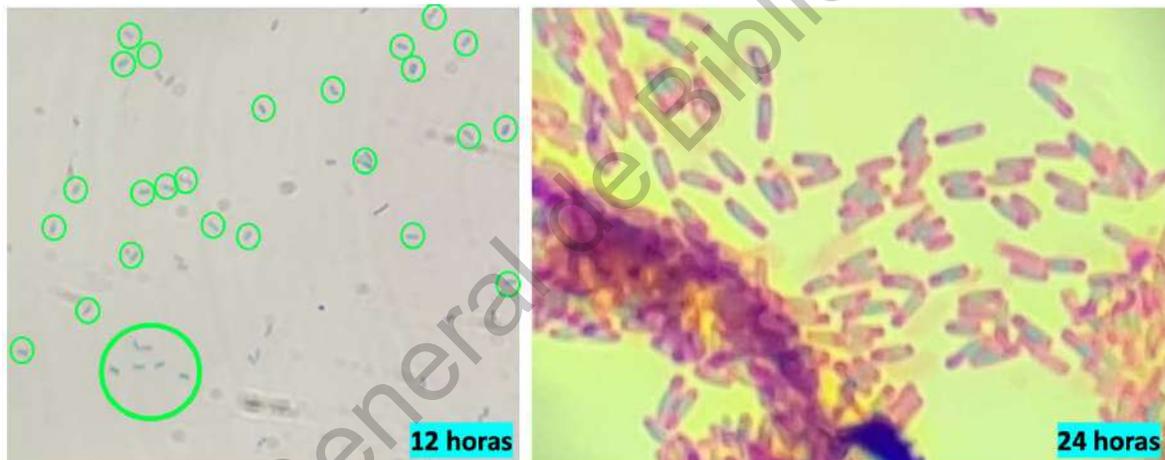
disponibilidad de nutrientes (López et al., 1979). Cuando suficiente Spo0A ~ P se acumula, funge como un regulador positivo de la transcripción de esporulación, activado a genes como *spolIA*, *spolIG*, *spolIE* que inician el factor  $\sigma$  el cual activa programas transcripcionales específicos que impulsan la esporulación (Sonenshein, 2000).



**Figura 12.** *B. subtilis* PC durante su crecimiento en biorreactor (8 h y 9 h). A la izquierda se observan las células de *B. subtilis* después de 8 h de crecimiento y a la derecha después de 9 h de crecimiento, las esporas se observan teñidas en verde y señaladas en color verde



**Figura 13.** *B. subtilis* PC durante su crecimiento en biorreactor (10 h y 11 h). A la izquierda se observan las células de *B. subtilis* después de 10 h de crecimiento y a la derecha después de 11 h de crecimiento, las esporas se observan teñidas en verde y señaladas en color verde



**Figura 14.** *B. subtilis* PC durante su crecimiento en biorreactor (12 h y 24 h). A la izquierda se observan las células de *B. subtilis* después de 12 h de crecimiento y a la derecha después de 24 h de crecimiento, las esporas se observan teñidas en verde y señaladas en color verde

## 6.2 Determinación de los parámetros de temperatura de entrada y velocidad de alimentación para la microencapsulación mediante secado por aspersión

Se determinó con base en el porcentaje de rendimiento ( $66.0 \pm 1.0$  %) y de eficiencia en la microencapsulación ( $100.0 \pm 1.0$  %), que los mejores parámetros para llevar a cabo el secado son: Temperatura de entrada  $110$  °C, porcentaje de aspiración de

90 % y porcentaje de bomba 20 % (1.4 mL/min). Por su parte Nunes et al., (2017) mediante secado por aspersión microencapsularon a *B. subtilis* usando maltodextrina y temperaturas variables entre 90 °C y 138 °C, encontrando que el porcentaje de rendimiento máximo fue de 68.81 % y una eficiencia máxima de microencapsulación de 78.83 %.

En estudios previos del grupo de trabajo ya se había observado que bajo los parámetros, tanto el rendimiento como la eficiencia estaban por encima del 60 %, por lo que en este estudio podemos reafirmar un alto porcentaje de eficiencia de microencapsulación.

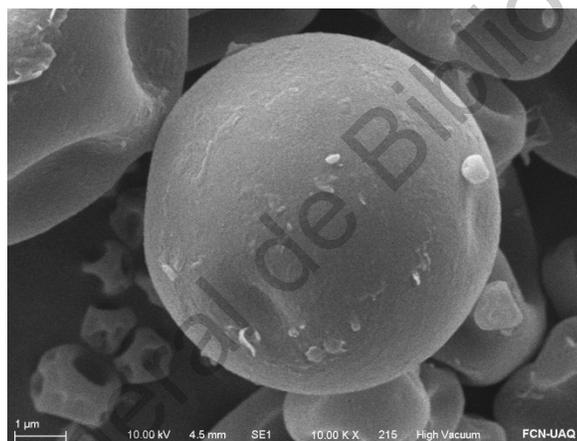
En la Tabla 3 podemos observar que el porcentaje de aspiración igual a 90 % en combinación con el porcentaje de bomba igual o menor a 20 % (1.4 mL/min) y temperatura de 110 °C promueven un mayor porcentaje de rendimiento en la microencapsulación (recuperación de micropartículas en polvo en relación a los sólidos que entraron), probablemente esto se debe a que la exposición de las células dentro del material de pared formado por el suero de leche y la maltodextrina a alta temperatura tiene una mayor influencia en la recuperación de sólidos (% de rendimiento) que la velocidad de alimentación, además de que la microcápsula se ha secado y formado de manera eficiente. Impactando en microcápsulas con mayor rendimiento en su recuperación y de un tamaño aproximado de 6  $\mu\text{m}$  (Figura 15).

En un estudio, Ma et al., (2015) mencionan que existe una relación entre la temperatura de entrada de aire y la velocidad de secado, ya que una baja entrada de temperatura conduce a un alto contenido de agua, membranas de alta densidad, facilidad de aglomeración y poca fluidez de las microcápsulas impactando en la disminución de la eficiencia de la microencapsulación.

**Tabla 3.** Eficiencia de microencapsulación de *B. subtilis* PC bajo distintas condiciones del secador.

Condiciones del secador				Eficiencia de microencapsulación			
T.E	T.S	% A	% B	Antes (Log UFC*g <sup>-1</sup> )	Después (Log UFC*g <sup>-1</sup> )	Eficiencia (%)	Rendimiento (%)
110 °C	43 °C	90 %	20 %	11 ± .01	11 ± .01	100 ± 1	66 ± 1
100 °C	39 °C	96 %	22 %	9 ± .04	9 ± .02	100 ± 1	57 ± 1
90 °C	55 °C	90 %	13 %	10 ± .01	10 ± .03	97 ± 1	69 ± 2

Los resultados representan la media ± desviación estándar (n= 3)  
T.E= temperatura de entrada, T.S= temperatura de salida, % A= porcentaje de aspiración,  
% B= porcentaje bomba de alimentación.



**Figura 15.** Microscopía electrónica de barrido de *B. subtilis* PC microencapsulado mediante secado por aspersión. La micropartícula tiene un tamaño aproximado de 6 μm.

### 6.3 Determinación de la viabilidad a través del tiempo del producto microencapsulado

Durante cinco meses se monitoreó de la estabilidad del microencapsulado de *B. subtilis* PC, como control se usó el cultivo de *B. subtilis* PC sin microencapsular (líquido). En la Figura 16 podemos observar las microcápsulas de *B. subtilis* obtenidas después de 5 meses de almacenamiento a 4 °C.

Cabe mencionar que previo al estudio de la viabilidad a través del tiempo se atemperaron las muestras tanto control como microencapsuladas a las distintas temperaturas de estudio (4 °C, 25 °C y 37 °C) disminuyendo la viabilidad del cultivo sin microencapsular en las temperaturas de 4 °C (figura 17) y 37 °C (figura 19) para el primer día, mientras que en 25 °C (figura 18) el conteo inicio igual tanto en el microencapsulado como en el cultivo sin microencapsular.

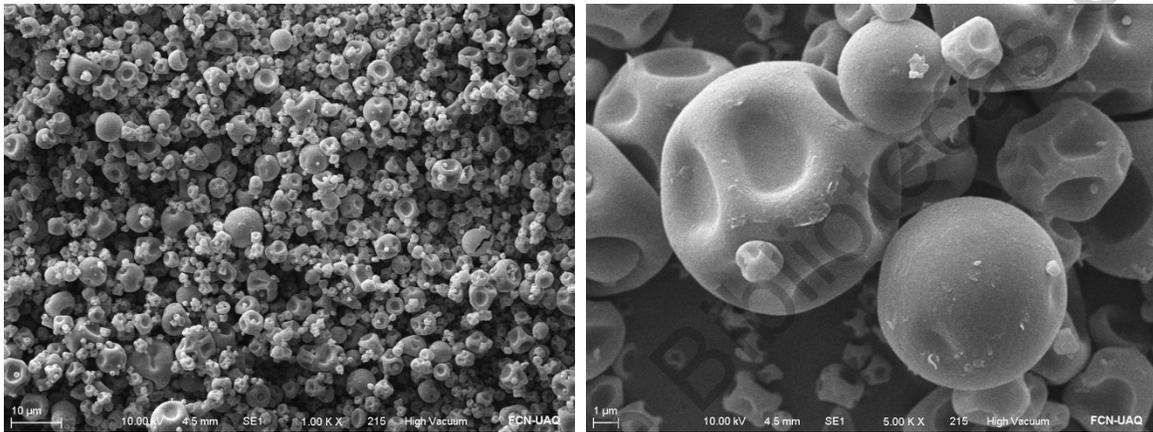
Ma et al. (2015) mencionan que la microencapsulación protege el interior de la cápsula de los cambios ambientales, además de prolongar el almacenamiento del material contenido en el núcleo.

Para la temperatura de 4 °C podemos observar en la Figura 17 que en el microencapsulado no se presentan cambios significativos en el tiempo durante los 5 meses de almacenamiento. Sin embargo, en el caso de las células libres (sin microencapsular) se observan cambios significativos en la viabilidad para el quinto mes.

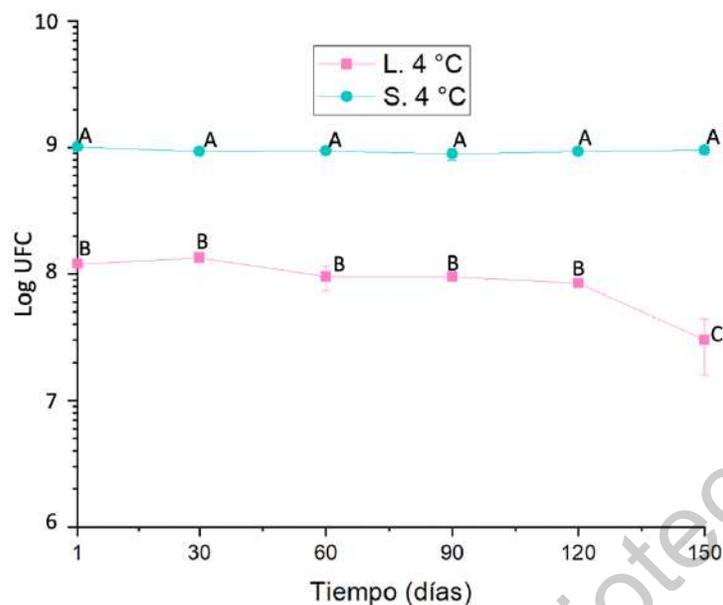
En cuanto a la temperatura de 25 °C, en la Figura 18 se observa que el microencapsulado no perdió su viabilidad durante los cinco meses, pero el cultivo de *B. subtilis* PC sin microencapsular para el primer mes ya mostraba diferencia significativa en su viabilidad respecto al día 1 y 30, mientras que para el quinto mes (día 150), la reducción en la cuenta viable fue de un 1.8 logaritmos, lo cual significa que *B. subtilis* PC se va inactivando cada vez de manera más acelerada.

Para la temperatura de 37 °C nuevamente se observa en la Figura 19 que el microencapsulado está protegiendo a las células de *B. subtilis*, ya que durante los cinco meses no presentó diferencias significativas en cuanto a su viabilidad. Por otro lado, se observa que para el primer mes (30 días) el cultivo de *B. subtilis* PC sin microencapsular ya presenta cambios significativos en su viabilidad, de manera que se va reduciendo paulatinamente hasta el quinto mes.

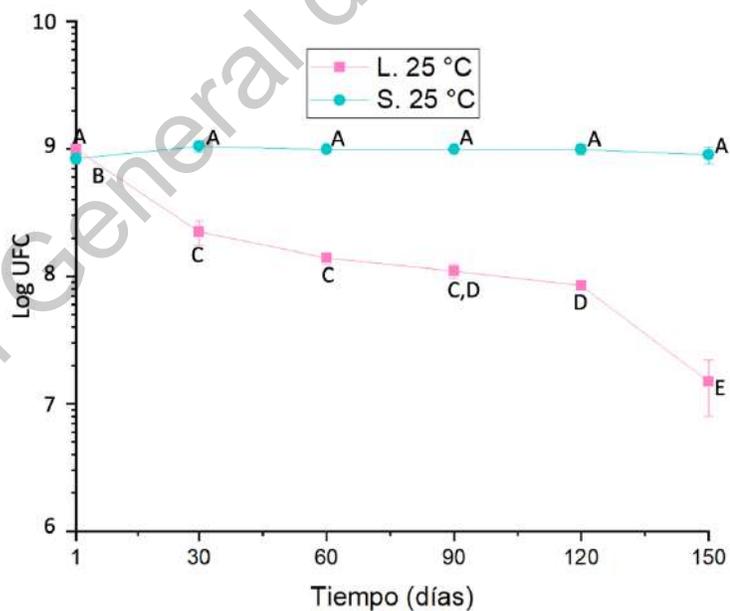
Dutra et al., (2019) realizaron la microencapsulación de una bacteria (*Lactococcus lactis* R7) y demuestran que a -20 °C, 4 °C y 25 °C se mantiene estable el conteo durante 6 meses, evidenciando que las microcápsulas si protegen el núcleo, mientras que las células libres tuvieron reducción de logaritmos desde los 14 días en todas las temperaturas.



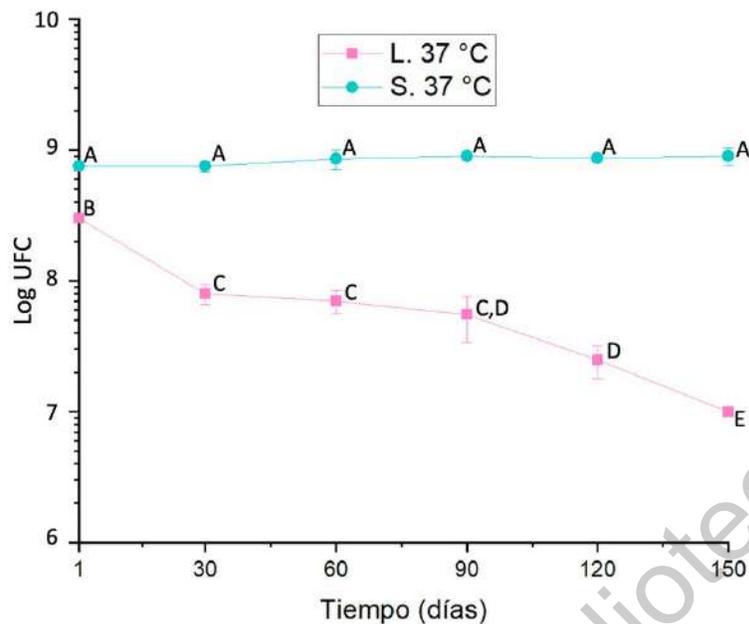
**Figura 16.** Microscopía electrónica de barrido de *B. subtilis* PC microencapsulado mediante secado por aspersión (5 meses de almacenamiento a 4 °C).



**Figura 17.** Estabilidad en el tiempo *B. subtilis* PC en 4 °C. Los resultados representan la media  $\pm$  desviaciones estándar (n = 3). Las medias con diferentes letras mayúsculas representan la diferencia estadística ( $\alpha = 0.05$ ). \*L= Cultivo *B. subtilis* PC sin microencapsular (control), S= *B. subtilis* PC microencapsulado.



**Figura 18.** Estabilidad en el tiempo *B. subtilis* PC en 25 °C. Los resultados representan la media  $\pm$  desviaciones estándar (n = 3). Las medias con diferentes letras mayúsculas representan la diferencia estadística ( $\alpha = 0.05$ ). \*L= Cultivo *B. subtilis* PC sin microencapsular (control), S= *B. subtilis* PC microencapsulado.



**Figura 19.** Estabilidad en el tiempo *B. subtilis* PC en 37 °C, Los resultados representan la media  $\pm$  desviaciones estándar (n = 3). Las medias con diferentes letras mayúsculas representan la diferencia estadística ( $\alpha = 0.05$ ). \*L= Cultivo *B. subtilis* PC sin microencapsular (control), S= *B. subtilis* PC microencapsulado.

#### 6.4 Determinación de la producción de péptidos antimicrobianos durante el crecimiento de *B. subtilis* en biorreactor

Se evaluó y se comprobó que *B. subtilis* PC presenta actividad antimicrobiana (Figura 20 y 21), es posible que la actividad antimicrobiana esté dada por alguno de los compuestos mencionados en la Tabla 4. Cabe mencionar que estos compuestos han sido identificados en investigaciones relacionadas con *B. subtilis* (Awais et al., 2010).

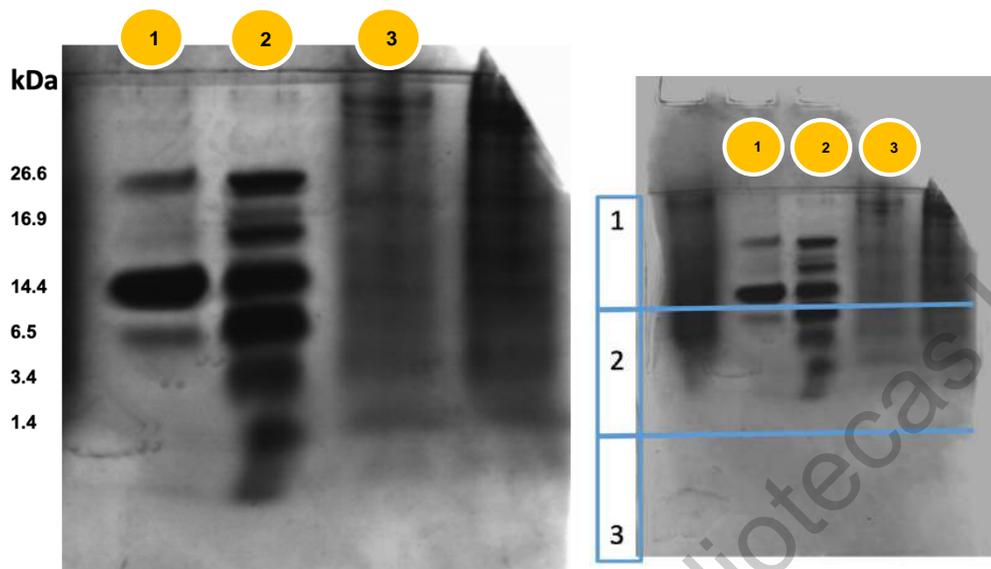
**Tabla 4.** Compuestos antimicrobianos producidos por *B. subtilis* y microorganismos de inhibición

Antimicrobiano	Peso (kDa)	Microorganismo de inhibición
Subtilina	3.321	<i>B. stearothermophilus</i> (Caulier et al., 2019).
Micobacilina	1.528	<i>Aspergillus niger</i> (Caulier et al., 2019).
Bacitracina	1.408	<i>Corynebacterium, Clostridium</i> (Kumar, 2017).
Polimixina	1.203	<i>Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia</i> (Poirel et al., 2017).
Surfactina	1.036	<i>Fusarium sp</i> (Kovács, 2019)
Difficidina	0.5447	<i>Erwinia amylovora, Xanthomonas oryzae</i> (Caulier et al., 2019).

En la Figura 20 se observan los fragmentos en los que fue dividido del gel de electroforesis: 1, 2 y 3. El carril 3 muestra bandas del extracto libre de células (ELC) del cultivo de *B. subtilis* PC, por lo que podemos especular que hay presencia de bacitracina, micobacilina, polimixina y subtilina, ya que el peso molecular de los marcadores utilizados coincide con de los compuestos mencionados.

Es posible que surfactina, difficidina y polimixina se encuentren el fragmento 3 del gel, mientras que subtilina, micobacilina y bacitracina pertenecen al fragmento 2. Debe mencionarse que estos hallazgos deben ser corroborados por pruebas más específicas como el aislamiento y posterior purificación de los péptidos, o bien mediante amplificación de los genes que codifican para dichos péptidos y posterior identificación de las secuencias obtenidas (Jacobs, 1995; Kunst et al., 1997; Baindara et al., 2013).

En la Figura 21 se observa la capacidad antimicrobiana de *B. subtilis* PC en cultivo de *M. luteus*. Es evidente que el fragmento 2 presenta halo de inhibición. El pozo que se observa en la parte superior corresponde al ELC, el cual presenta efecto inhibitorio sobre *M. luteus*



**Figura 20.** Gel de electroforesis (extracto libre de células de *B. subtilis* PC), A la izquierda se observa el gel de electroforesis con un marcador molecular indicando los pesos moleculares en kDa. A la derecha se observa el mismo gel, que fue cortado en tres secciones, \*Los carriles 1 y 2 representan el marcador utilizado y el carril 3 contienen el extracto libre de células del cultivo de *B. subtilis* PC.



**Figura 21.** Capacidad antimicrobiana de *B. subtilis* PC en cultivo de *M. luteus*. A la izquierda se observa un fragmento del gel de electroforesis control. A la derecha se observan los fragmentos del gel marcados en la figura anterior del carril del extracto libre de células. Se observa que el fragmento 2 presenta halo de inhibición. El pozo que se observa en la parte superior corresponde al ELC, el cual presenta efecto inhibitorio sobre *M. luteus*

## 7. CONCLUSIONES

En las condiciones en que se llevaron a cabo los experimentos, *B. subtilis* PC mostró un crecimiento logarítmico desde la primer hora, aumentando rápidamente la población del medio de cultivo, dada la ausencia de una fase de latencia. Por lo anterior, las células una vez que entraron a la fase estacionaria necesitaron 4 h para iniciar la esporulación, lo que significa que la concentración máxima celular se da después de 9 h de crecimiento.

Una vez que se obtuvo la máxima concentración celular de  $1 \times 10^8 \pm 10$  CFU/mL (después de 8 h), se realizó la microencapsulación, observándose que a una temperatura relativamente alta (110 °C) promueve una mejor recuperación de sólidos y viabilidad celular después de la microencapsulación, asociado a que la temperatura ayuda a secar el agua de manera más eficiente, a la velocidad de alimentación utilizada.

El estudio de la viabilidad durante el almacenamiento de *B. subtilis* PC, mostró que la microencapsulación protege de manera eficiente a las células, manteniendo su viabilidad por al menos 5 meses, independientemente de la temperatura a la que se encuentre almacenada, al menos durante cinco meses.

De acuerdo con el peso molecular observado en la electroforesis del extracto libre de células concentrado, es posible que la actividad antimicrobiana detectada en *B. subtilis* PC se deba a los péptidos subtilina y bacitracina, ya que son estos los que presentan resistencia al calor, es decir, no se pierde la actividad antimicrobiana durante el tratamiento de calor (cocentración del ELC). Dicho esto vemos que el fragmento de gel que contenía subtilina, bacitracina y micobacilina formaron un halo de inhibición contra la bacteria Gram-positiva *M. luteus*, pero ello se descarta a micobacilina, ya que este péptido tiene actividad sobre Gram negativas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E. (2016). Lonza Walkersville Inc, Bioreactor for scale-up: process control. Walkersville, MD, Estados Unidos. cap 6.
- Amaya-Cano, J. S., y Salcedo-Galán, F. (2020). Evaluación de la biomasa residual (cereza) de café como sustrato para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Revista ION, 33(1), 7–16. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020001>
- Arora, S., Rani, R., y Ghosh, S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. Journal of Biotechnology, 269, 16–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>
- Ausubel M. Frederick, Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K., (2002). Short protocols in molecular biology, Wiley. Sección 2.
- Awais, M., Pervez, A., Yaqub, A., & Shah, M. M. (2010). Pakistan Journal of Zoology Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel. 10.
- Awais, M., Shah, A. A., Hameed, A., & Hasan, F. (2007). Pakistan Journal of Botany Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus sp.* Pak. J. Bot., 39(4): 1303-1312, 2007.
- Baindara, P., Mandal, S. M., Chawla, N., Singh, P. K., Pinnaka, A. K., & Korpole, S. (2013). Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. AMB Express, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-2>
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M. E., & Teixeira, P. (2015). Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. Journal of Functional Foods, 17, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.001>
- Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 168(4), 521–530. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420485>
- Candia-Sanchez, L. F., Álvarez-Cervantes, J., Díaz, R., Díaz-Godínez, G., & Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas,

- Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. (2017). Uso potencial de biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(1), 15–36. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.15>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Cen, Y., Guo, L., Liu, M., Gu, X., Li, C., & Jiang, G. (2020). PeerJ, Using organic fertilizers to increase crop yield, economic growth, and soil quality in a temperate farmland, <https://doi.org/10.7717/peerj.9668>
- Coligan E. John, Dunn M. Ben, Ploegh L. Hidde, Speicher W. David, Wingfield T. Paul. (2002). *Current protocols in protein science*. Vol 1, John Wiley & Sons, Inc.
- Corrales- Ramírez, L. C., Caycedo- Lozano, L., Gómez- Méndez, M. A., Ramos Rojas, S. J., & Rodríguez Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45. <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- Corrochano, A. R., Arranz, E., De Noni, I., Stuknyté, M., Ferraretto, A., Kelly, P. M., Buckin, V., & Giblin, L. (2018). Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 49, 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.043>
- Creus, C. M. (2017). Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.001>
- Dutra, M., Bordini, F. W., de Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Pohndorf, R. S., Fiorentini, Â. M., da Silva, W. P., & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT*, 115, 108411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>
- Espinosa de los Monteros, J., A., M., & F., V. (2001). Metabolic profiles and aprE expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 379–384. <https://doi.org/10.1007/s002530100749>

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013. FAOSTAT-  
Producción agrícola
- FAO (2017), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026, Éditions OCDE, París.  
[http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2017-e](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-e)
- González-Rosado, M., Parras-Alcántara, L., Aguilera-Huertas, J., Benítez, C., &  
Lozano-García, B. (2014). Effects of land management change on soil aggregates  
and organic carbon in mediterranean olive groves. *Catena*, 195(November 2014),  
1186–1195. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104840>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd\_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-  
growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of  
Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hilbert, D. W., & Piggot, P. J. (2004). Compartmentalization of gene expression during  
*Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and molecular Biology Reviews*,  
68(2), 234–262. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.234-262.2004>
- Islas, R. P. (2019). Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos  
para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. pag 10.
- Jacobs, M. F. (1995). Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus  
licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Gene*, 152(1), 69–74.  
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00655-C](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00655-C)
- Kaasi, A., & Jardini, A. L. (2016). Bioreactors. reference module in materials science  
and materials engineering (p. B9780128035818041000). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.04140-0>
- Khardziani, T., Kachlishvili, E., Sokhadze, K., Elisashvili, V., Weeks, R., Chikindas, M.  
L., & Chistyakov, V. (2017). Probiotics and antimicrobial proteins, Elucidation of  
*Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for spore production in submerged  
fermentation of plant raw materials., 9(4), 435–443. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9303-9>
- Kovács, Á. T. (2019). Elsevier, Trends in microbiology *Bacillus subtilis*, 27(8), 724–725.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kostov, G., Iliev, V., Goranov, B., Denkova, R., & Shopska, V. (2020). Immobilized cell  
bioreactors in fermented beverage production: design and modeling. En

biotechnological progress and beverage consumption vol, pp. 339–375. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00011-4>

Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020a). Microbial biofertilizers: bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *biocatalysis and agricultural biotechnology*, 23(December 2019), 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>

Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020b). Elsevier, Microbial biofertilizers: bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *biocatalysis and agricultural biotechnology*, 23, 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>

Kumar, P. (2017). Elsevier, Pharmacology of specific drug groups. *Pharmacology and therapeutics for dentistry* (pp. 457–487). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39307-2.00033-3>

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>

Liu, H., Cui, S. W., Chen, M., li, Y., Liang, R., Xu, F., & Zhong, F. (2019). Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(17), 2863–2878. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684>

López, J. M., Marks, C. L., & Freese, E. (1979). The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *Bacillus Subtills*. 15.

Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., & Wang, W. (2015). biological control, Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. 90, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>

- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2016). Biofertilizers: A potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental science and pollution research*, 24(4), 3315–3335. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative food science & emerging technologies*, 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- McGill, B. (2015). Land use matters. En *Nature* (Vol. 520, Número 7545, pp. 38–39). <https://doi.org/10.1038/520038a>
- Monteiro, S. M., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J., & Cunha, A. E. (2008). biotechnology progress, A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. 21(4), 1026–1031. <https://doi.org/10.1021/bp050062z>
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa
- Nunes, S. B. R., Pomella, A. W. V., Melo, M. R., Santos, L. D., & Zotarelli, M. F. (2018). Microencapsulation of *B. subtilis* by spray drying. 4.
- Organización de las Naciones Unidad (ONU), 2019, World population prospects (2019 revision), Perspectivas demográficas mundiales de la ONU, revisión 2019
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018) Alimentación sana. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- Parra, H. R. A. (2011). Facultad Nacional de Agronomía Medellín, Microencapsulación de alimentos. 63, 16. 63(2): 5669-5684. 2010
- Penia Kresnowati, M. T. A., & Chen, X. D. (2011). Continuous operation. En *Comprehensive Biotechnology* (pp. 527–535). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00110-0>
- Phillips, Z. E. V., & Strauch, M. A. (2002). *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(3), 392–402. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8431-9>
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity,

susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>

Pulkkinen, J. T., Eriksson-Kallio, A. M., Aalto, S. L., Tiirola, M., Koskela, J., Kiuru, T., & Vielma, J. (2019). The effects of different combinations of fixed and moving bed bioreactors on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and health, water quality and nitrification in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 85, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.03.004>

Qin, Y., Wang, Y., He, Y., Zhang, Y., She, Q., Chai, Y., Li, P., & Shang, Q. (2019). Characterization of *Subtilin* L-Q11, a novel class I bacteriocin synthesized by *Bacillus subtilis* L-Q11 isolated from orchard soil. *Frontiers in microbiology*, 10, 484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00484>

Radeck, J., Gebhard, S., Orchard, P. S., Kirchner, M., Bauer, S., Mascher, T., & Fritz, G. (2016). Anatomy of the bacitracin resistance network in *Bacillus subtilis*: Anatomy of the bacitracin resistance network. *Molecular Microbiology*, 100(4), 607–620. <https://doi.org/10.1111/mmi.13336>

Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd\_Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, 8, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>

Ramírez-Muñoz, J., García-Cortés, D., Colín-Luna, J. A., & Tapia-Medina, C. R. (2016). Efecto de la evolución del vórtice sobre los parámetros hidrodinámicos de un sistema de dispersión mecánica de pigmentos. *Información tecnológica*, 27(4), 145–154. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000400016>

Reyes, C., Terrón, K., Reynoso, R., Rubí, H., Chávez, S., & Barrales-Cureño, H. J. (2016). ResearchGate, Desarrollo de un software para la caracterización de matraces y fermentadores agitados mecánicamente. 3(5), 18.

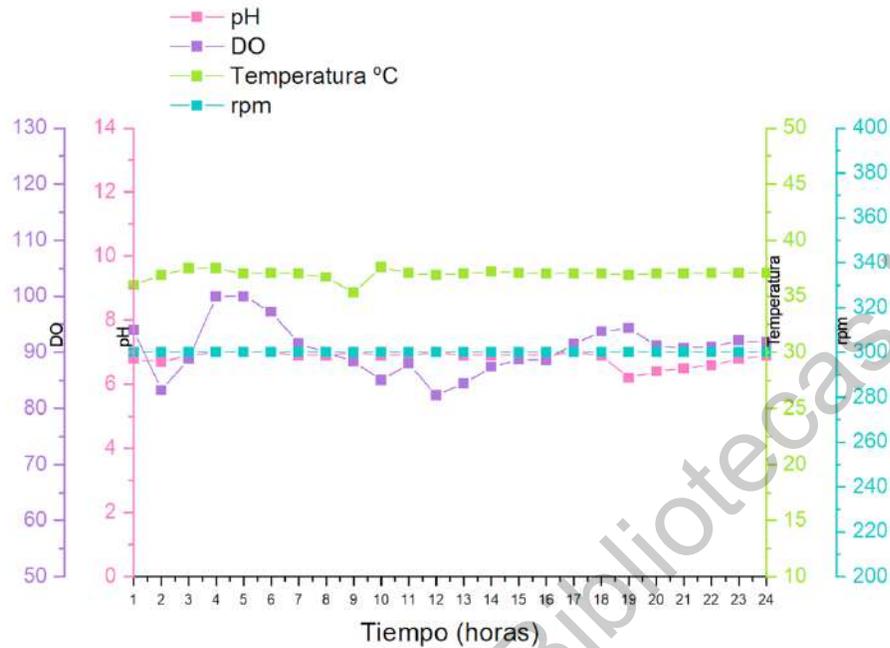
Sahoo, K. K., Arakha, M., Sarkar y Jha, S. (2016). Enhancement of properties of recycled coarse aggregate concrete using bacteria. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 7(1), 22–38. <https://doi.org/10.1080/19475411.2016.1152322>

Sánchez López, D. B., Pérez Pazos, J. V., Luna Castellanos, L. L., García Peña, J. A., & Espitia Montes, A. A. (2020). Inoculantes microbianos incorporados al cultivo de

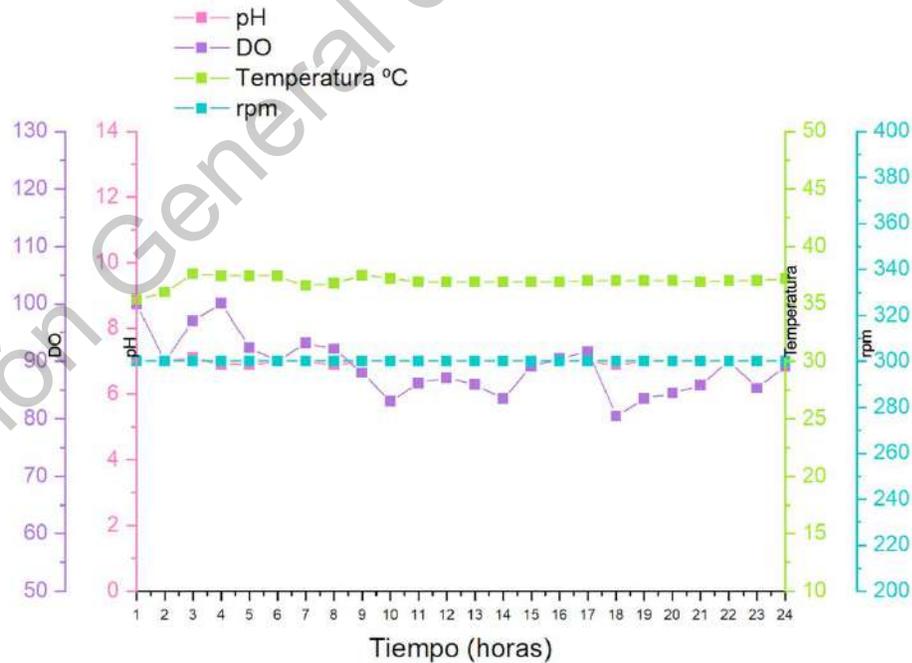
- Ipomoea batatas L. en el Valle del Sinú. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 79–86. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.69716>
- Siebring, J., Elema, M. J., Drubi Vega, F., Kovács, Á. T., Haccou, P., & Kuipers, O. P. (2014). Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division. *The ISME Journal*, 8(1), 77–87. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.128>
- Silva, P. T. da, Fries, L. L. M., Menezes, C. R. de, Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., Bastos, J. de O., & Silva, C. de B. da. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304–1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>
- Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 3(6), 561–566. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00141-7)
- Soukoulis, C., & Bohn, T. (2018). A comprehensive overview on the micro- and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 1–36. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.971353>
- Souza, A. L. R., Hidalgo-Chávez, D. W., Pontes, S. M., Gomes, F. S., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V. (2018). Elsevier, Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. 91, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.053>
- Tajssoleiman, T., Mears, L., Krühne, U., Gernaey, K. V., & Cornelissen, S. (2019). An industrial perspective on scale-down challenges using miniaturized bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.002>
- Tan, I. S., & Ramamurthi, K. S. (2013). Spore formation in *Bacillus subtilis*: *Bacillus subtilis* sporulation. *Environmental Microbiology Reports*, 6(3), 212–225. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>
- Tejada, M., & Benítez, C. (2020). Elsevier, Effects of different organic wastes on soil biochemical properties and yield in an olive grove., 2019. págs. 146 <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103371>

- Venegas-González, J., Méndez-Inocencio, C., Martínez-Mendoza, E. K., Ceja Torres, L. F., & Rodríguez-Torres, M. D. (2019). Producción orgánica de Beta vulgaris subespecie cicla con inoculantes microbianos. *Biotecnia*, 21(3), 121–126. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i3.1043>
- Villarreal, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Zhong, J.-J. (2011) *Bioreactor Engineering*. Elsevier. Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China.
- Zhu, Q., Liu, X., Hao, T., Zeng, M., Shen, J., Zhang, F., & De Vries, W. (2018). Modeling soil acidification in typical Chinese cropping systems. *Science of the Total Environment*, 613–614, 1339–1348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.257>

## Anexo 1



**Figura 22.** Parámetros de pH, temperatura y rpm para el primer crecimiento en biorreactor instrumentado (modelo Z31011001 Applikon ez- control) de *B. subtilis* durante 24 h.



**Figura 23.** Parámetros de pH, temperatura y rpm para el segundo crecimiento en biorreactor instrumentado (modelo Z31011001 Applikon ez- control) de *B. subtilis* durante 24 h.