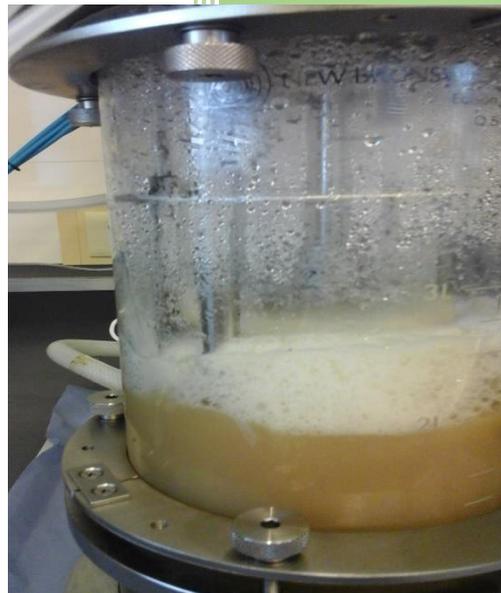


Maestría en Biotecnología – Facultad de Ciencias -UdelaR

2018

Prospección, caracterización y bioproducción de *Bacillus sensu lato* movilizadores de fósforo del suelo



Nadia Martin

Tutor: Dr. Eduardo Abreo

Co-Tutora: Dra. Elena Beyhaut

I. AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y al Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA) por otorgarme una Beca de Maestría Nacional, la cual que me permitió realizar este trabajo.

Gracias a las empresas Calister S.A., Lafoner S.A., Lage y Cía S.A. por colaborar en el muestreo de plantas de soja en los distintos puntos del país y suministro de extractos de levadura. Gracias a Silvia Garaycochea por proporcionar muestras de suelo de campo natural.

Gracias a Nora, Elena y Eduardo por permitirme participar de su proyecto de investigación.

Gracias a Héctor Goicoechea por su participación a la distancia en las correcciones de los diseños experimentales y optimización de sistemas de múltiples respuestas. Gracias a Cecilia Bruno por el seguimiento de la interpretación de los análisis multivariados descriptivos y de inferencia.

Gracias a la gente linda del INIA por “hacerme el dos” en las corridas, en las rabetas, en las alegrías, en los aventones a Las Piedras-Las Bujas. Mary, Naty, Viko, Dini, Lu. Muchas gracias por el aguante!

Gracias al grupete hermoso del tercero. Gracias Ana por siempre estar, por darme la primera rienda suelta dentro de un laboratorio, dejándome ser, sembrando en mí el bichito de la duda y la crítica.

Gracias a los amigos que me ha cruzado en mil y una vuelta. Por enriquecerme como persona, por crecer juntos en largas charlas y vivencias. Gracias por su apoyo incondicional.

Gracias a mi familia, por su cariño, apoyo y constancia en mostrarme que siempre hay opciones y que solo hay que ir por ellas. ¡¡Son lo más grande que hay!!

Gracias a todos!!

II. INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	1
INDICE GENERAL.....	2
RESUMEN.....	3
PREFACIO.....	4
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	22
CAPITULO 1.....	23
CAPITULO 2.....	77
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	129
APÉNDICE.....	133

III. RESUMEN

El fósforo (P) es el segundo nutriente limitante para el crecimiento vegetal luego del nitrógeno, siendo esencial para la producción agropecuaria. Los suelos del Uruguay presentan niveles de P disponible insuficientes para la mayoría de los cultivos y la estrategia histórica para levantar esta limitante ha sido el agregado de fertilizante fosfatado, insumo importado con fuerte impacto en los costos de producción. A nivel mundial, estos fertilizantes son elaborados a partir de roca fosfórica, un recurso finito y no renovable. Asimismo, esta forma de suministro de P resulta ineficiente, dado que sólo una parte del mismo es asimilado por las plantas, mientras que el resto es fijado por el suelo en formas inorgánicas y orgánicas. Si bien el P se caracteriza por predominar en el suelo bajo formas insolubles y ser inmóvil, el proceso de erosión genera un enriquecimiento del P insoluble en los cursos y depósitos de agua, favoreciendo la eutrofización de los mismos. Debido a que los microorganismos del suelo actúan en el ciclo biogeoquímico del P, mediando la fitodisponibilidad de este nutriente, el desarrollo de biofertilizantes de base microbiana representa una alternativa tecnológica para aumentar los niveles de P disponible, mejorar la nutrición fosfatada en los sistemas de producción y reducir el impacto ambiental negativo asociado al uso de fertilizantes. Este proyecto realizó la prospección e identificación de bacterias solubilizadoras y/o mineralizadoras de diferentes fuentes de P, establecidas en la rizósfera de la planta de soja y/o de vida libre, priorizando la selección de aislamientos capaces de producir estructuras de resistencia, en particular *Bacillus sensu lato*. Las cepas fueron evaluadas y seleccionadas por su capacidad de solubilizar/mineralizar fósforo inorgánico/orgánico *in vitro*. Las cepas ILBB592 (*Bacillus megaterium*) y ILBB139 (*Bacillus thuringiensis*) fueron estudiadas por su capacidad industrial. Se ajustó el proceso de producción de esporas mediante la optimización del medio de cultivo, escalado en fermentador (escala de laboratorio), y establecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento. Por último, se estudió su factibilidad para ser empleadas en la elaboración de formulaciones piloto de inoculantes microbianos.

IV. PREFACIO

El presente trabajo se encuentra dividido en una Introducción General, dos Capítulos y Conclusiones y Perspectivas. En la Introducción General, se realiza la revisión bibliográfica referente a la movilización biológica del fósforo del suelo, con énfasis en la potencialidad de los miembros pertenecientes al grupo *Bacillus sensu lato (s.l.)* para el desarrollo de un biofertilizante.

En los Capítulos uno y dos, se desarrollan los objetivos planteados en el proyecto de tesis de Maestría en Biotecnología:

- A. Generar una colección de bacterias formadoras de estructuras de resistencia (*Bacillus s.l.*) establecidas en la rizósfera de plantas de soja y/o de vida libre, capaces de mineralizar y/o solubilizar P inmovilizado en el suelo.
- B. Caracterizar *in vitro* la colección bacteriana por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico e identificar aislamientos que presenten dichas características.
- C. Optimizar el proceso de producción de la cepa seleccionada en fermentador (escala de laboratorio).
- D. Elaborar formulaciones piloto de la cepa producida, y evaluar la viabilidad de la espora en el tiempo.

Cada uno de estos capítulos, cuenta con las secciones: Introducción específica, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, y Conclusiones.

En el apartado Conclusiones y Perspectivas, se realiza una evaluación general del trabajo y se proyectan futuras directrices.

V. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El fósforo en el suelo

1.1. Fracciones del fósforo en el suelo

El fósforo (P) se clasifica como el segundo macronutriente limitante del crecimiento vegetal luego del nitrógeno. El contenido total de P en los suelos de Uruguay es bajo en campo natural sin fertilización fosfatada previa. Este se encuentra entre 130 – 890 ppm, variación atribuible al material que le da origen al suelo, así como las distintas condiciones de meteorización. Los suelos formados a partir de roca basáltica se asocian con los mayores contenidos de P total, en cambio aquellos derivados de la alteración de la roca ácida de basamento cristalino muestran menores niveles de P total (Hernández *et al.*, 1995).

Es de destacar la falta de correlación del P total del suelo con las formas más directamente vinculadas a la absorción por las plantas. Esto es atribuible a la reactividad diferencial que presentan los distintos reservorios en que se encuentra el P en el suelo. En la Figura 1, se esquematiza las diferentes formas bajo las cuales se encuentra el P en los suelos, sus relaciones, y las entradas y salidas del sistema agua-suelo-planta.

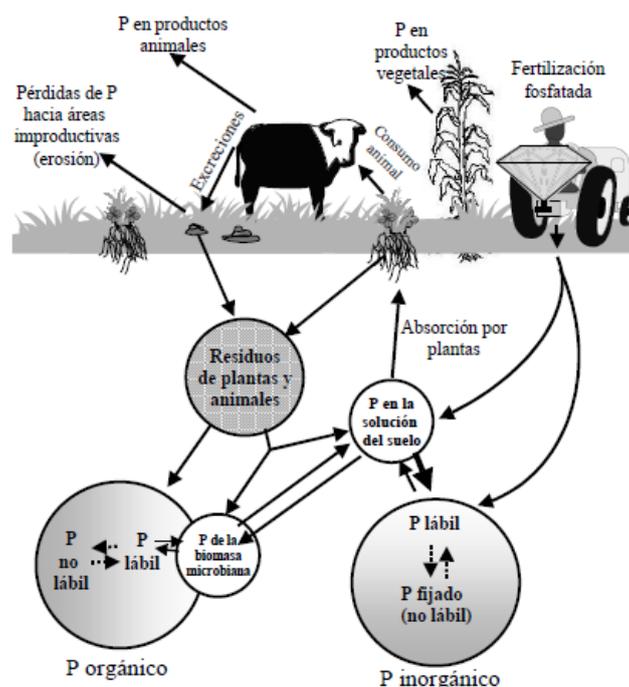


Figura 1. Esquema de reservorios de P en el suelo: sus interrelaciones; entradas y salidas al sistema agua-suelo-planta (Laren *et al.*, 1990).

Simplificando el sistema de estudio es posible identificar tres reservorios de P en el suelo: el P presente en solución, y en fase sólida (compuestos inorgánicos y orgánicos). Existe una gran heterogeneidad de compuestos fosfatados que constituyen los reservorios de P inorgánico y orgánico, con estabilidades químicas muy dispares que no han sido exhaustivamente definidas.

La fracción de P disponible para la absorción por las plantas corresponde al P en solución, el cual se encuentra como iones ortofosfato: HPO_4^{-2} o H_2PO_4^- en función del pH de la misma (Richardson *et al.*, 2011). Por lo general el ión H_2PO_4^- es la especie química de más rápida absorción por las plantas. El contenido de P en esta fracción se encuentra entre 3 y 5 ppm, mientras que la mayoría

de las especies de cultivos y pasturas sembradas requieren niveles superiores a las 10 ppm (Tisdale *et al.*, 1993).

Los fosfatos de la fase sólida del suelo pueden ser divididos, tal como ya fue mencionado, en dos grandes categorías: inorgánico y orgánico. El P orgánico tiende a aumentar y disminuir junto con el contenido de materia orgánica; por lo tanto, su contenido es comparativamente bajo en el subsuelo y alto en el horizonte superficial. El P inorgánico del suelo va aumentando relativamente de importancia con relación al total del P en el suelo en la medida que un suelo es cultivado y existe el agregado de fertilizantes fosfatados. Sin embargo, este aumento no significa que todo el P agregado quedará altamente disponible siempre, sino que a medida que transcurre el tiempo el P del fertilizante va reaccionando con constituyentes del suelo y formando compuestos insolubles, de manera que su disponibilidad se va reduciendo.

En la fracción inorgánica del suelo el P se encuentra formando parte de compuestos muy diversos, que podrían agruparse genéricamente bajo forma de fosfatos de hierro (Fe), aluminio (Al) y calcio (Ca). Los minerales más comúnmente encontrados en los suelos ácidos son los fosfatos de Fe y Al, en tanto que los fosfatos de Ca predominan en suelos neutros y calcáreos. La proporción promedio de las distintas fracciones de fósforo inorgánico reportadas para suelos del Uruguay es Fe-P, Al-P, Ca-P, 46:35:19 (Hernández *et al.*, 1995).

Si bien la característica general de los constituyentes de la fracción de P inorgánico del suelo es su baja solubilidad, los mismos difieren en el valor de la constante de producto de solubilidad (K_{ps}). A los minerales de Fe, Al y Ca se les asignan valores de K_{ps} incrementales, respectivamente (Olsen *et al.*, 1980).

El contenido de P orgánico de los suelos representa aproximadamente el 50% del contenido total. En suelos del Uruguay provenientes de diferentes materiales de origen, bajo campo natural sin fertilizar, se encuentran en un rango de variación entre (33-67 %). Estos porcentajes están relacionados con los procesos de formación de los suelos del Uruguay, los cuales han dado lugar a suelos de pradera, con altos contenidos de materia orgánica en el horizonte de mayor desarrollo radicular (Hernández *et al.*, 1995).

Los componentes químicos que constituyen esta fracción son fundamentalmente ésteres del ácido ortofosfórico ($H_2PO_4^-$), y han sido identificados como inositol fosfatos (10-50 %), fosfolípidos (1-5 %), y ácidos nucleicos (0.2 – 2.5 %). Esta fracción es probablemente la más dinámica de las tres mencionadas, por estar sujeta a las alternancias de humedad y temperatura del suelo (Laren *et al.*, 1990).

Los inositol fosfatos representan una serie de ésteres fosfatados desde monofosfatos a hexafosfatos. El ácido fítico (inositol hexafosfato) tiene seis grupos ortofosfato y es el éster fosfatado más común en los suelos. La mayoría de los fosfatos de inositol son producto de la actividad microbiana y de la degradación de residuos de plantas. Forman complejos fuertes con las proteínas. También pueden formar sales insolubles con cationes del suelo. En estos complejos el inositol fosfato es más resistente al ataque enzimático, lo que explicaría su predominancia en los suelos comparado con otros ésteres fosfatados. A su vez, puede ser adsorbidos por los minerales arcillosos y óxidos de Fe y Al (Laren *et al.*, 1990).

Los ácidos nucleicos y los fosfolípidos son liberados durante la descomposición de residuos por los microorganismos del suelo en mayores cantidades que los inositol fosfatos, sin embargo estos no son acumulados en el suelo al ser compuestos muy lábiles.

El remanente de los compuestos orgánicos de P de los suelos se piensa que pueden ser originados a partir de los microorganismos, especialmente de las paredes celulares de las bacterias, las cuales presentan en su constitución un número importante de ésteres de alta estabilidad química y biológica (Tisdale *et al.*, 1993).

1.2. El fósforo como nutriente limitante de la producción vegetal en suelos del Uruguay

El fósforo (P) es el segundo factor nutricional limitante de la producción vegetal luego del nitrógeno. Se clasifica como macronutriente, pese a que su contenido en las plantas es menor que el de nitrógeno, potasio y calcio (0.2% peso seco en planta (Schachtaman *et al.*, 1998)). Sin embargo, como factor limitante de la producción vegetal, el P es más importante que el calcio, y el potasio.

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es uno de los cultivos más importantes en muchos países del mundo. En Uruguay, la soja es el principal cultivo de grano y el área de siembra ha ido aumentando exponencialmente en los últimos años, desde 15 mil hectáreas en el ciclo 2002/2003 a 1,1 millón de hectáreas en el ciclo 2016/2017 (fuente: Encuesta agrícola "2017" DIEA-MGAP).

Este cultivo se ha expandido aceleradamente a zonas no agrícolas, con suelos de baja fertilidad y condiciones ambientales menos favorables. Por lo que a los altos requerimientos nutricionales atribuibles para este cultivo (80 kg N/ha (Racca *et al.*, 2005), y 10-16 ppm P Bray I (Moron *et al.*, 2005)), se le suma entonces la producción en condiciones agrícolas subóptimas dada su masificación en el territorio nacional.

Para suplir la limitante de nitrógeno de este cultivo se encuentra ampliamente adoptada la inoculación con bradyrizobios (biofertilizantes) (Hungria *et al.*, 2006; Ferraris *et al.*, 2006), sobretodo en países como el nuestro que no produce fertilizantes nitrogenados (Montañes *et al.*, 2004; Labandera *et al.*, 2003). Desde la década del 70 se producen comercialmente inoculantes de calidad con cepas de bradyrizobios eficientes para soja y la inoculación de su semilla es una tecnología exitosa. El sector agropecuario ha obtenido significativos beneficios económicos, calculados en divisas ahorradas para el país, por la diferencia entre el costo de los inoculantes y el de los fertilizantes nitrogenados (Labandera *et al.*, 2007).

La amplia implementación de esta tecnología por el sector agropecuario sugiere recurrir la co-inoculación con microorganismos que sean capaces de regular la fitodisponibilidad de P en el suelo, como estrategia alternativa a la fertilización fosfatada.

1.3. Estrategia tradicional: Fertilización fosfatada y sus desventajas

La estrategia tradicional para levantar la limitante de P en la producción agropecuaria ha sido el agregado de fertilizante fosfatado, siendo este un insumo no renovable totalmente importado, ejerciendo un fuerte impacto en el costo de la producción. Estimaciones recientes prevén que en dos décadas su disponibilidad para la fabricación de fertilizantes será limitada (Cordell *et al.*, 2009) y las reservas mundiales estarían agotadas en 50 años.

Desde el punto de vista de las reacciones que ocurren en el suelo, los fertilizantes fosfatados pueden dividirse entre aquellos que contienen una alta y baja proporción de P soluble en agua. La fuente principal para la fabricación de ambos tipos de fertilizantes fosfatados es la roca fosfatada o fosforita. En términos generales se considera que los materiales con contenidos de P₂O₅ superiores al 30% son destinados a la elaboración de fertilizantes fosfatados tras tratamientos térmico y ácido para aumentar la solubilidad del P, en tanto que los materiales con contenidos de P₂O₅ inferiores al 30% son destinados a la molienda y uso directo al suelo, por presentar condiciones para una mayor reactividad.

El superfosfato de calcio es de uso generalizado en nuestro país, y es obtenido mediante la reacción del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la roca fosfatada. El producto resultante es una mezcla

de fosfato monocalcico [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$] y de yeso (CaSO_4) y contiene 16 a 22% de P_2O_5 , del cual aproximadamente el 90% es soluble en agua y se clasifica como asimilable.

Los fertilizantes fosfatados con alta proporción de P soluble en agua son altamente asimilables inmediatamente luego de su aplicación, reduciéndose su disponibilidad con el tiempo. Por el contrario, los fertilizantes fosfatados con P insoluble en agua y soluble en ácidos débiles, necesitan reaccionar con el suelo para solubilizarse y suministrar P asimilable, y son, por lo tanto, de baja asimilabilidad inicial. Se estima que en el transcurso de un año, el 70% del P agregado se convierte a formas no utilizables por las plantas y, si bien parte de este P puede volver a solubilizarse, un 25% se pierde de manera irreversible (Tisdale *et al.*, 1993).

El tipo de cultivo afecta a la eficiencia relativa de las distintas fuentes de P a través de tres mecanismos: a) duración del cultivo; b) extensión del sistema radicular; y c) capacidad de absorción de P de una fuente particular. Estos mecanismos, deben ser contemplados al momento de trazar la estrategia para levantar la limitante nutricional.

Cultivos tales como los cereales y los cultivos hortícolas, requieren una alta disponibilidad de P en solución en las primeras etapas del crecimiento. En cultivos de larga duración (como las pasturas) con requerimientos mejor distribuidos a lo largo de la vida del cultivo, las fosforitas molidas pueden ser una fuente alternativa de P siempre que los requerimientos de implantación sean cubiertos. Las plantas con sistema radicular poco desarrollado, o pivotantes, tales como muchos cultivos hortícolas, se ven favorecidos por la aplicación de fuentes solubles en agua en forma localizada, próxima a la zona de desarrollo radicular. Plantas que acumulan grandes cantidades de Ca, o especies que acidifican en mayor grado el volumen de suelo en contacto con las raíces, tendrán mayor capacidad de absorción de P a partir de fuentes tipo fosforita. Por el contrario, especies que no absorben mucho Ca produciéndose una acumulación en torno a la raíz, y que no acidifican el medio, harán un uso menos eficiente de este tipo de fertilizante. Tradicionalmente se ha citado a las leguminosas haciendo un mejor uso que las gramíneas del P a partir de las fosforitas, debido a su mayor absorción de Ca (Pérez *et al.*, 2007).

A las desventajas anteriormente mencionadas respecto a esta estrategia agronómica para suplir la nutrición vegetal en distintos cultivos, debe mencionarse también las complicaciones ambientales asignables a la misma.

El P del suelo se caracteriza por predominar en formas insolubles y ser inmóvil, la erosión de los mismos genera un enriquecimiento del P insoluble en los cursos y depósitos de agua, favoreciendo así la eutrofización de estos.

2. Movilización biológica de fósforo en el suelo

2.1. Estrategias microbianas de movilización

Mecanismos microbianos directos y/o indirectos modulan la movilización (solubilización y/o mineralización) de fósforo del suelo, y pueden afectar su biodisponibilidad para las plantas. Los mismos se esquematizan en la Figura 2.

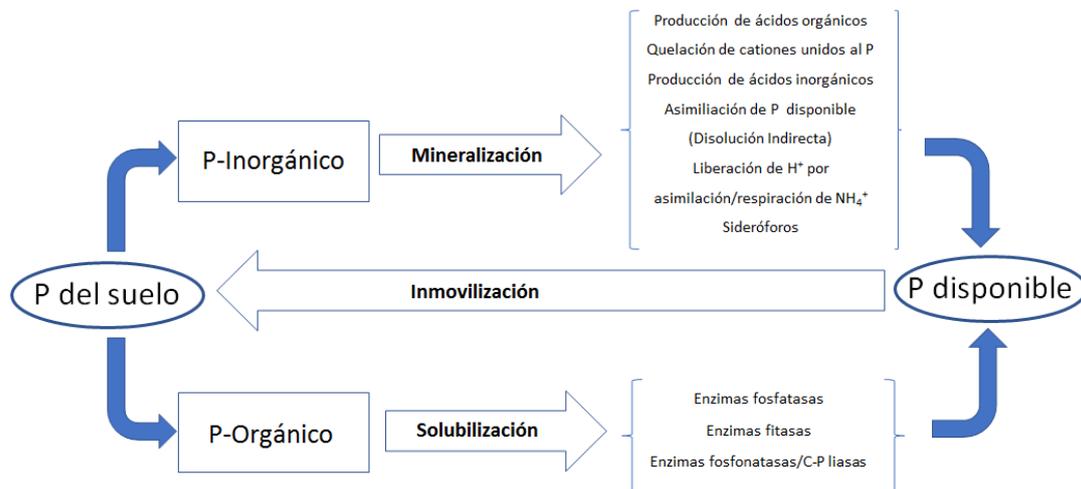


Figura 2. Esquema de mecanismos microbianos de solubilización/mineralización e inmovilización del P del suelo modificado de Sharma *et al.*, 2013.

Los microorganismos mediante estos mecanismos pueden tomar parte en tres de los procesos fundamentales que afectan el ciclado del P en el suelo. Estos son: disolución-precipitación (equilibrio químico), adsorción-desorción con la superficie de las partículas del suelo (equilibrio fisicoquímico) y mineralización-inmovilización (conversión biológica de fósforo inorgánico-orgánico).

La solubilización microbiana de la fracción inorgánica de fósforo ocurre fundamentalmente por la secreción de ácidos orgánicos al medio. Esto permite: reducir el pH, quelar los cationes (Fe, Al, Ca) coordinados con las fuentes de insolubles de fósforo dejando a este disponible, competir con el fósforo por los sitios de adsorción de las partículas del suelo.

La producción microbiana de ácidos orgánicos ocurre por la vía de la oxidación directa que tiene lugar en la cara externa de la membrana citoplasmática (Zaidi *et al.*, 2009). La fermentación de fuentes de energía y carbono de la rizósfera, se reporta como el principal origen metabólico de estos compuestos (Atlas *et al.*, 1997; Trolove *et al.*, 2003).

La acidificación inorgánica del medio es un mecanismo microbiano menos frecuente, mediante el cual algunos géneros bacterianos como *Nitrosomonas* y *Thiobacillus* solubilizan el fósforo del suelo por la producción de ácido clorhídrico, ácido sulfhídrico y ácido nítrico (Azam *et al.*, 1996). La producción microbiana de ácido sulfhídrico es a su vez ventajosa para la solubilización de fósforo, dado que reacciona con el fosfato férrico para formar el sulfato ferroso concomitantemente con la liberación del ion ortofosfato (Swaby *et al.*, 1958).

Otro mecanismo alternativo para la acidificación inorgánica del medio es atribuible a la excreción de protones como consecuencia de la asimilación del amonio (Parks *et al.*, 1990), siendo ésta una de las principales estrategias en que las plantas pueden tomar parte en la

solubilización de fósforo, conjuntamente con la liberación de ácidos orgánicos en sus exudados radiculares (Arcand *et al.*, 2006).

La inmovilización microbiana de fósforo disponible en el medio desplaza el equilibrio químico de disolución hacia una reposición del ión ortofosfato, fundamentalmente para los minerales de fósforo asociados a calcio, y en menor medida al aluminio y el hierro. Es de destacar, que la inmovilización microbiana es un proceso que favorece la disponibilidad del fósforo para la planta cuando ocurre la liberación del contenido celular en el ciclado de la biomasa microbiana (Butterly *et al.*, 2009).

En la mineralización de los compuestos orgánicos del suelo el fósforo puede ser liberado por la acción de tres grupos de enzimas: fosfatasas ó fosfohidrolasas (catalizan la desfosforilación de enlaces fosfoéster o fosfoanhídrido de la materia orgánica), fitasas que específicamente liberan iones ortofosfato a partir de la hidrólisis de los enlaces fosfoéster del ácido fítico, y fosfonatasas que hidrolizan el enlace C-P de organofosfonatos.

Las enzimas fosfatasas y fitasas son las predominantes en el suelo (Behera *et al.*, 2014). Es de resaltarse el creciente interés en el estudio de estos dos grupos enzimáticos para su implementación en distintas aplicaciones biotecnológicas (Rodríguez *et al.*, 2006).

En función del pH óptimo de actividad es posible subdividir estos grupos en fosfatasas ácidas y alcalinas. Sin bien ambos grupos pueden ser producidos por microorganismos en función de las condiciones extremas de cultivo, en el caso de las plantas fundamentalmente se reporta la secreción de fosfatasas ácidas en los exudados radiculares (Criquet *et al.*, 2004), las cuales difieren considerablemente de las microbianas por una constante de afinidad significativa inferior por el fósforo orgánico (Tarafdar *et al.*, 2004).

Existen reportes de fitasas microbianas y vegetales. Las fitasas vegetales son la principal fuente de inositol y de ion ortofosfato que moviliza el fósforo de los reservorios de los tejidos vegetales, semillas, polen (Richardson *et al.*, 1994). Sin bien hay reportes de excreción de fitasas vegetales, la habilidad de las plantas de obtener fósforo del fitato es limitada y debe ser compensada para el adecuado crecimiento y desarrollo vegetal (Richardson *et al.*, 2011).

2.2. Distribución de capacidad funcional de interés en la comunidad microbiana del suelo

La movilización microbiana de fósforo insoluble del suelo ha sido reportada para bacterias, hongos, algas (cianobacterias) y micorrizas arbusculares (Sharma *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha reportado un mayor desempeño en la movilización de fósforo del suelo para las bacterias en relación con los hongos (Alam *et al.*, 2002). La abundancia de bacterias y hongos movilizadoras de fósforo en el suelo difieren considerablemente, constituyendo entre (1-50 %) y (0.1-0.5 %), respectivamente de la población total (Chen *et al.*, 2006).

Si bien los microorganismos que presentan esta capacidad funcional tienen una distribución ubicua en el suelo, se ha reportado una mayor abundancia relativa de estos en la rizósfera de distintos cultivos en relación con los microorganismos no rizófericos (Raghu *et al.*, 1966; Reyes *et al.*, 2002). A su vez, esta estrategia de promover el crecimiento vegetal también es reportada en bacterias y hongos endofíticos de distintos cultivos (Matos *et al.*, 2017; De Abreu *et al.*, 2017; Suman *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2017).

Tanto las características fisicoquímicas del suelo, así como el historial del manejo agronómico del mismo, son de los principales factores que influye en la distribución y la actividad microbiana de este grupo funcional (Kim *et al.*, 1998). La abundancia relativa de bacterias mineralizadoras

respecto a las solubilizadoras se ha reportado en mayor proporción en la rizósfera de pasturas en relación con cultivos de grano independiente del nivel y especiación química del fósforo disponible en el suelo (Jorquera *et al.*, 2008).

Los principales géneros bacterianos reportados como movilizadores de fósforo son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Azospirillum*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, entre otros (Behera *et al.*, 2014). En el caso de cepas de hongos las pertenecientes al género *Aspergillus* y *Penicillium*, se las ha reportado como las más eficientes en la movilización de fósforo (Whitela *et al.*, 2000).

2.3. *Bacillus*, género bacteriano con potencial para el desarrollo de un biofertilizante

Entre los miembros del grupo *Bacillus sensu lato* (*s.l.*) se incluyen géneros que no pertenecen más al género *Bacillus sensu stricto*, tales como: *Virgibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Alkalibacillus*, *Amphibacillus*, *Cerasibacillus*, *Filobacillus*, entre otros (Claus *et al.*, 1986).

Este grupo presenta un alto potencial para ser empleado en el desarrollo de un biofertilizante o como controlador biológico dada su capacidad de formar estructuras de resistencias, lo cual le confiere una ventaja competitiva ante otros géneros bacterianos. Si bien para distintos géneros fúngicos se ha reportado tanto la capacidad de promover el crecimiento vegetal (*Plant Growth Promoting Microorganism*, PGPM (Vessey *et al.*, 2003)) y actuar como agentes de control biológico, la dificultad de la bioproducción de cultivos líquidos de esporas de hongos dificulta el desarrollo de estas soluciones biotecnológicas. La fermentación líquida es la elección efectuada por la industria al ser más rápida, sencilla y reproducible en comparación con una fermentación sólida (Tunga *et al.*, 1999). No obstante, varias son las complejidades asignables a la producción líquida de biomasa fúngica, tales como: control de parámetros que dan inicio a la esporulación del cultivo, requerimiento de medios complejos, dificultades en la determinación del crecimiento fúngico y control del bioproceso (Manan *et al.*, 2018).

Para las distintas cepas pertenecientes al grupo *Bacillus s.l.* se ha reportado el inicio de la esporulación al concluir el crecimiento exponencial, llevándose a cabo una serie de cambios tanto estructurales como metabólicos que culminan con la formación de estructuras de

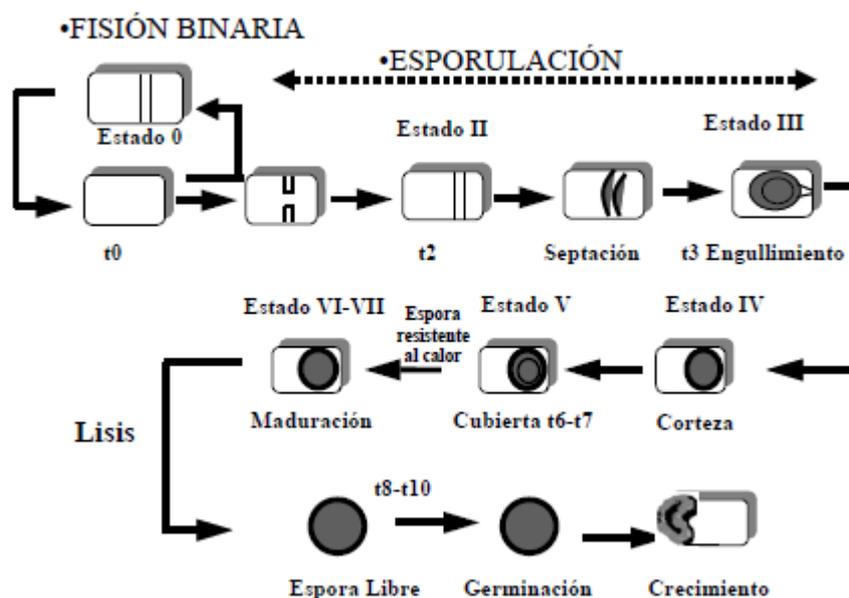


Figura 3. Esquema de proceso de esporulación de *Bacillus* spp. (Grossman *et al.*, 1995).

resistencias (esporas). La secuencia de eventos morfológicos que culminan con la formación de una espora libre consta de siete estadios y se muestra en la Figura 3.

El estadio cero se inicia con una respuesta al agotamiento de nutrientes y a la producción de péptidos que sensan y responden a una alta concentración celular (Schneider *et al.*, 2002). En el estadio II se producen enzimas hidrolíticas, como las proteasas y amilasas, y se forma un septo en un polo de la célula, en el estadio siguiente (III) ocurre el engullimiento de la preespora, del IV al VII formación de la corteza, formación de la cubierta, maduración y lisis (Errington *et al.*, 1993). Durante esta serie de eventos se forman dentro de un mismo cuerpo dos células; la célula madre y la preespora, las cuales mantienen una comunicación para poder en conjunto y de una forma metabólica ordenada, formar la espora. La transición de un estado al otro es gobernada por seis proteínas reguladoras llamadas factores sigma, que se unen a la ARN polimerasa y determina qué promotores se reconocerán. Estos factores son: el factor sigma que ocurre durante el crecimiento vegetativo, σ_A , y cinco factores que se activan en cascada durante la esporulación, llamados σ_H , σ_F , σ_E , σ_G y σ_K .

El grupo *Bacillus s.l.* ha sido reportado ser el más abundante en la comunidad bacteriana de la rizósfera de distintos cultivos (De Freitas *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2013). Son atribuibles a este género diferentes asociaciones con la planta, ya sea promoviendo su crecimiento o como controlador biológico de patógenos. Por ello se engloba dentro del grupo de los microorganismos PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Kloepper *et al.*, 1978).

Entre las estrategias microbianas para la promoción del crecimiento vegetal constatadas en cepas pertenecientes al grupo *Bacillus s.l.* se destacan:

-producción de ácido indol acético (IAA) (Beneduzi *et al.*, 2008). El IAA actúa en distintos procesos fisiológicos de la planta, tales como: síntesis de pigmentos en la fotosíntesis, modula la resistencia a condiciones de estrés, controla procesos de crecimiento vegetativo actuando en la división y diferenciación celular, regula el flujo de xilema, el desarrollo radicular entre otros.

-síntesis de otras fitohormonas: Citoquinina (Arkhipova *et al.*, 2005) que estimulan la división y diferenciación celular, retarda la senescencia de tejidos; giberelinas (Gutiérrez-Manero *et al.*, 2001) que regulan fundamentalmente la elongación internodular y la germinación de semillas.

-producción de enzima 1-amino-ciclo-propano-1-carboxilato desaminasa (ACC-desaminasa) (Siddikee *et al.*, 2011). La ACC-desaminasa degrada la fitohormona etileno asociada a condiciones de estrés.

-producción de sideróforos (Kesaulya *et al.*, 2017). Compuestos orgánicos de bajo peso molecular capaces de quelar el ión férrico y transportarlo al interior celular.

-movilización biológica de fósforo (incisos 2 y 3 de Introducción específica del Capítulo 1).

Con respecto al control biológico de fitopatógenos e insectos se han reportado cepas de *Bacillus s.l.* que ejercen distintos mecanismos de acción. En interacción patógenos-antagonista se destaca:

-interacción de amensalismo por la producción de: antibióticos, antifúngicos volátiles (Herzner *et al.*, 2011; Raza *et al.*, 2015), antivirales (Emmert *et al.*, 2004), ácido cianhídrico (Deepa *et al.*, 2010); enzimas con actividad β -1,3 gluconasas [degradadoras de pared celular de hongos (Kim *et al.*, 2004)], toxinas proteicas entomopatógenas de acción en dípteros, lepidópteros y coleópteros (Elleuch *et al.*, 2014).

-interacción de competencia por nutrientes [sideróforos bacterianos de mayor afinidad que fúngicos (Loper *et al.*, 1999)]

-interacción de competencia por sitios de infección previniendo la colonización de patógenos (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997; Ratón *et al.*, 2011).

En la interacción antagonista-hospedero se reporta la capacidad de efectuar Inducción de resistencia sistémica (*Induced systemic resistance*, ISR), mediante la cual se induce una respuesta en la planta hospedera sin ningún daño previo en la misma. La interacción planta y miembros del grupo *Bacillus s.l.* se reporta estar mediada por sideróforos, lipopolisacáridos y sustancias volátiles (Ryu *et al.*, 2004).

Sin bien los miembros del grupo *Bacillus s.l.* presentan una alta potencialidad para el desarrollo de un biofertilizante, es de destacarse la importancia de la correcta identificación filogenética de las cepas de trabajo previo a la liberación al ambiente, dada la alta similitud de los genomas del grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Este grupo está compuesto por siete miembros: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus weihenstephanensis* (Okinaka *et al.*, 2016), habiendo reportes de patogenicidad en animales y humanos para cepas de *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* (Helgason *et al.*, 2000).

A lo largo del tiempo se han implementado diversos métodos para diferenciar *Bacillus thuringiensis* de *Bacillus cereus*. En cuanto a las técnicas de biología molecular, si bien la utilización de la secuencia del gen 16S *ARNr* es el método de identificación bacteriano por excelencia, su aplicación a la identificación de especies fuertemente relacionadas es de poca utilidad, como es el caso de las especies que integran el grupo *Bacillus cereus sensu lato* (Wang *et al.*, 2007). Se ha confirmado que el polimorfismo de los productos de amplificación del gen 16S *ARNr* de cepas pertenecientes al grupo *Bacillus cereus sensu lato* no permite su discriminación a nivel de especie (Borin *et al.*, 1997).

Como alternativa se trabaja como marcador filogenético alternativo con el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad β de la DNA-girasa (La Duc *et al.*, 2004), al tratarse de un gen de copia única, altamente evolutivo, constitutivo (*housekeeping*), independiente del fenotipo de virulencia que la cepa presente.

Para la identificación a nivel de especie también se ha implementado métodos de *fingerprinting* (Freitas *et al.*, 2008). Dentro de estos métodos se encuentran aquellos en los cuales se secuencian varios genes, como por ejemplo *Multilocus Sequence Typing* (MLST), (Hoffmaster, 2008). Por otro lado, otros métodos utilizados son Ribosomal DNA *Restriction Fragment Length polymorphism* (RFLP) (Priest *et al.*, 1994), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) y Rep-PCR, *Repetitive Extragenic Palindromic Sequence* (Freitas *et al.*, 2008; Reyes-Ramirez *et al.*, 2005).

3. Desarrollo de un biofertilizante

3.1. Etapas de desarrollo de un biofertilizante

El desarrollo de biofertilizantes de base microbiana representa una alternativa tecnológica para aumentar los niveles de P disponibles en suelos agrícolas, mejorar la nutrición fosfatada en los sistemas de producción y reducir el impacto ambiental negativo asociado al uso de fertilizantes químicos.

El desarrollo de todo producto biológico implica la ejecución de múltiples etapas secuenciales y paralelas de retroalimentación continua para la obtención de un producto final. A continuación, se efectúa una breve descripción de este proceso resaltando las principales etapas y la información recabada en cada una de ellas (Sharma *et al.*, 2013).

- a. Prospección y ordenamiento de microorganismos capaces de mineralizar y/o solubilizar *P in vitro*.
- b. Identificación filogenéticamente, fenotipado y genotipado de los aislamientos que presenten la capacidad funcional de interés.
- c. Evaluación de la capacidad de mineralizar y/o solubilizar *P in vivo*, mediante bioensayos con planta.
- d. Optimización del proceso de producción a escala piloto.
- e. Elaboración de formulaciones piloto y evaluación de la viabilidad de las esporas en el tiempo.
- f. Evaluación de la eficacia agronómica del inoculante en condiciones de campo.
- g. Evaluación de la factibilidad de escalado de proceso de producción de microorganismo.
- h. Realización del estudio de inocuidad del inoculante obtenido y el registro del producto final.

3.2. Normativa nacional de control de calidad de inoculantes de MGAP

La Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, en la División Control de Insumos, Departamento de Agentes Biológico, regula el registro y control de calidad de: Inoculantes rizobianos, Promotores de Crecimiento Vegetal (MPVC), Agentes de Control Biológico Microbiano (ACBM) y Entomófagos como Agentes de Control Biológicos (ACB).

El registro y control de calidad de inoculantes rizobianos está regulado por el Decreto 546/81 (a base de turba) y Decreto 7/99 (semilla preinoculadas y otros soportes); los MPVC por la Resolución del 13 de marzo del 2013; los ACBM por la Resolución 688/013 y ACB por la Resolución 220/014.

Los requisitos administrativos para el registro de MPVC son los mismos que para los inoculantes rizobianos, incorporando la exigencia de presentar un informe técnico en el cual se incluya: la identificación del microorganismo que forma parte del formulado, productos contenidos en el formulado, información toxicológica (en caso de que corresponda), ensayos de evaluación de la eficacia agronómica (EEA) desarrollados en el territorio nacional o propuesta de ensayos a desarrollarse. Los requisitos técnicos para el registro de un producto en MPVC son: que la concentración del microorganismo constatada en el producto sea la informada en el proceso de registro y que la misma presente una estabilidad durante al menos 3 meses a partir de la fecha de elaboración, que se demuestre la inocuidad del microorganismo declarado (cuando corresponda) y que el producto sea libre de microorganismos no declarados, que la etiqueta del producto sea autorizada por la DGSA y que los ensayos de EEA se efectúen en el territorio nacional en sitios y número de ciclos preacordados con el ministerio para su eventual supervisión. Se propone para estos productos efectuar los controles en los puntos de venta, lote a lote como actualmente se efectúa para los inoculantes rizobianos.

Entre los MPVC actualmente registrado se encuentran cepas de: *Pseudomonas fluorescens* (Rasa 1008), *Herbaspirillum huttiense* (L4.2), *Azospirillum brasilense* (Az. 39), abarcando distintos cultivos (Maíz, Sorgo, Trigo y Arroz).

No hay registros de miembros del grupo *Bacillus s.l.* como MPVC, ni ACBM. No hay registro de MPVC para el cultivo de soja.

3.3. Antecedentes de biofertilizantes en el mercado regional y mundial, y relevancia de bioproductos a base de esporas de *Bacillus s.l.*

En el caso de biofertilizantes, si bien existe una gran diversidad de microorganismos capaces de favorecer la absorción de nutrientes en forma asociativa con la planta, son escasos los ejemplos de productos comerciales basados en los mismos (Sharma *et al.*, 2013).

A nivel mundial, se han desarrollado algunos biofertilizantes que contienen diferentes cepas de bacterias y hongos con capacidad de movilizar P. Algunas de estas corresponden a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, en el caso de los hongos, y a miembros de *Bacillus s.l.*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, en el caso de las bacterias.

Entre los productos comercializados a nivel mundial se encuentra el biofertilizante JumpStart®, desarrollado por Philom Bios Inc. (Canadá) y posteriormente comercializado por Novozymes (Legget *et al.*, 2007). El biocomponente activo es el hongo filamentoso *Penicillium bilaiae* y se utiliza para canola, sorgo y maíz. Actualmente, el producto es comercializado en Argentina por la empresa Nitragin para soja, pero no está disponible en nuestro país. El producto comercial se llama Nitragin triple y combina *Bradyrhizobium japonicum*, y *Penicillium bilaiae*. Otro ejemplo regional lo representa el biofertilizante Rizofos Liq para trigo, maíz y girasol, desarrollado por la empresa RIZOBACTER Argentina S.A., en base a *Pseudomonas fluorescens*. La empresa EMBRAFÓS en Brasil, comercializa FF ORGANIC, una línea de fertilizantes que utiliza microorganismos (bacterias y hongos) para la solubilización y liberación gradual del P de la roca fosfórica y del P retenido en el suelo.

Existen inoculantes en base a *Azospirillum* disponibles para diferentes cultivos en Europa, África y América Latina. Este género bacteriano se destaca por fijar N-atmosférico mediante una interacción asociativa con la planta, como a su vez diversas estrategias microbianas de promoción del crecimiento vegetal [como la solubilización de P (Ramachandran *et al.*, 2007)].

En Brasil varias empresas han trabajado junto a Embrapa para su elaboración comercial, en Argentina los comercializan diversas empresas como Nitrasoil y Nitragin, y en Uruguay los comercializan las empresas Lage&Cia. S.A. (inoculante Graminosoil) y Calister S.A. (inoculante Bioprom), para cultivos como maíz, sorgo y trigo.

En algunos casos los inoculantes basados en *Azospirillum* y *Pseudomonas*, son formulados como coinoculantes con rizobios. Este es el caso del Laboratorio Green Quality de Argentina que comercializa el producto PGPR SOJA, que es un inoculante tribacterial específico para soja, formulado en base a *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasiliensis* y *Pseudomonas fluorescens*.

Se destaca la falta de inoculantes registrados como promotores del crecimiento vegetal basados en *Bacillus s.l.* para soja. No obstante, la relevancia de formulados a base a esporas de *Bacillus thuringiensis* abarca el 97% de los agentes de control biológico bacterianos (Brar *et al.*, 2006), habiendo formulados a base de *Bacillus s.l.* para el control biológico de soja (Pérez-García *et al.*, 2011).

4. Referencia Bibliográfica

Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., Rashid, M. (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology* 4, 454–458.

Arcand, M.M., Schneider, K.D., (2006). Plant and microbial based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78(4), 791–807.

Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A., Martynenko, E.V., Kudoyarova, G.R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272, 201–209.

Atlas, R., Bartha, R. (1997). *Microbial ecology*. Addison Wesley Longman, New York.

Azam, F., Memon, G.H. (1996). Soil organisms. In: Bashir E, Bantel R (eds) *Soil science*. National Book Foundation, Islamabad, 200–232.

Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (3), 97–110.

Beneduzi, A.S. (2008). Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bonilla, S., (2010). Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Capítulo 4. Toxinas y otros metabolitos. Programa Hidrológico Internacional para América Latina y el Caribe (PHI-LAC) Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe UNESCO. Montevideo.

Borin, S., Daffonchio, D., Sorlini, C., (1997). Single strand conformation polymorphism analysis of PCR-tDNA fingerprinting to address the identification of *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 87–93.

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323–342.

Butterly, C.R., Bunemann, E.K., McNeill, A.M., Baldock, J.A., Marschner, P. (2009). Carbon pulses but not phosphorus pulses are related to decrease in microbial biomass during repeated drying and rewetting of soils. *Soil Biol Biochem*, 41,1406–1416.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.D., Lai, W.A., Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34, 33–41.

Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J Toxicol Environ Health B Crit* 3, 323-347.

Claus, D., Berkeley, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105–1139. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

- Cordell, D., Drangert, J.O., White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19:2, 292-305.
- Criquet, S., Ferre, E., Farner, E.M., Le Petit, J. (2004). Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter – influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biol Biochem* 36, 1111–1118.
- De Abreu, C.S., Figueiredo, J.E.F., Oliveira, C.A., dos Santos, V.L., Gomes, E.A., Ribeiro, V.P., Barros, B.A., Lana, U.G.P., Marriel, I.E. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, 16 (1).
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.), *Biol. Fertil. Soils* 24, 358-364.
- Deepa, C.K., Dastager, S.G., Pandey, A. (2010). Plant growth promoting activity in newly isolated *Bacillus thioparus* (NII-0902) from Western ghat forest, India. *World J Microbiol Biotechnol* 26(12), 2277–2283.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Z., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi, *Biological Control*, 65(3), 312-321.
- Elleuch, J., Zghal, R.Z., Jemaà, M., Azzouz, H., Tounsi, S., Jaoua, S. (2014). New *Bacillus thuringiensis* toxin combinations for biological control of lepidopteran larvae. *Int J Biol Macromol*, 65,148-54.
- Emmert, B.A.E., Klimowicz, K.A., Thomas, G.M., Handelsman, J. (2004). Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 70, 104–113.
- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1-33.
- Ferraris, G. N., González Anta, G., Díaz-Zorita, M. (2006). Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. En: *Mercosoja 2006 – 3° Congreso de Soja del Mercosur. Soja Sudamericana Liderando el Porvenir*. Rosario, SF, Argentina. Conferencias Plenarias-Foros-Workshops, p. 85–88.
- Freitas, D. B., Reis, M. P., Lima-Bittencourt, C. I., Costa, P. S., Assis, P. S., Chartone- Souza, E., & Nascimento, A. M. (2008). Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. *BMC Research Notes*, 1, 92.
- Grossman, A.D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Ann. Rev. Genetics* 29,477-508.
- Gutiérrez-Manero FJ et al (2001). The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 111, 206–211.
- Hassan, S. E.D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 687–695.

Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolsto, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2627-30.

Hernández, J., Otegui, Zamalvide, J. (1995). Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos del Uruguay. Facultad de Agronomía, Montevideo. Boletín de Investigaciones Nº43. 32p.

Herzner, A.M. (2011) Expression of the lantibiotic mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One*.

Hoffmaster, A. R., Novak, R. T., Marston, C. K., Gee, J. E., Helsel, L., Pruckler, J. M., Wilkins, P. P. (2008). Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiology*, 8:191.

Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C., and Graham, P. H. (2006). Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics; the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. En: R. P. Singh, N. Shankar, and P. K. Jaiwal (Eds.), *Focus on plant agriculture. 1. Nitrogen nutrition in sustainable plant productivity*. Houston, TX: Studium Press LLC. (p. 43-93).

Jorquera, M.A., Hernández, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., Mora, M.L. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil, *Biol. Fertil. Soils* 44, 1025-1034.

Kesaulya, H., Hasinu J.V., Tuhumury G.N.C. (2017). Potential of *Bacillus* spp. produces siderophores in suppressing the wilt disease of banana plants. *International Symposium on Food and Agro-biodiversity*. 102, 1-6.

Kim, K.Y., Jordan, D., McDonald, G.A., (1998). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 26, 79–87.

Kim, P.I., Chung, K.C. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908, *FEMS Microbiology Letters*, 234:1, 177–183.

Kloepper J.W. and Schroth M.N., (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes: Proceedings of the 4th International Conf. on Plant Pathogenic Bacteria, Station de Pathologie Vegetable et Phytobacteriologie, INRA, Angers.

Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M.A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A.K., Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*), *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1361-1369.

La Duc, M.T., Satomi, M., Agata, N., Venkateswaran, K. (2004). *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J Microbiol Methods*, 56(3),383-94.

Labandera, C. (2003). Soja: Inoculantes e Inoculación. *Revista del Plan Agropecuario*, No 107.p.53-54. [Internet]. Disponible desde: <<http://planagropecuario.org.uy/Revistas/>>

Labandera, C. (2007). Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. En: Izaguirre- Mayoral, M.L., ed.; Labandera, C., ed.; Sanjuán, J. ed.

Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica científica y empresarial. Montevideo, Cooperación Iberoamericana CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo – MGAP, p.75-78.

Leggett M., Cross J., Hnatowich G., Holloway G. (2007) Challenges in commercializing a phosphate-solubilizing microorganism: *Penicillium bilaiae*, a case history. In: Velázquez E., Rodríguez-Barrueco C. (eds) First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 102. Springer, Dordrecht.

Loper, J.E., Henkels, M.D. (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 65(12), 5357–5363.

Manan, A.M., Webb, C. (2018) Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(3), 618-627.

Matos, A.D.M., Gomes, I.C.P., Nietsche, S., Xavier, A.A., Gomes, W.S., dos Santos Neto, J.A., Pereira, M.C.T. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89 (4), 2945-2954.

Montañes, A; Labandera, C; Solari, L. (2004). Fijación del nitrógeno a una escala nacional. *LEISA Revista de Agroecología (Uruguay)*. Vol.19 (1),.33.

Morón A. 2005. Informe de resultados de la red de ensayos de fertilización de soja. En: Jornada Técnica de Cultivos de Verano. Serie Actividades de Difusión N° 417. INIA Uruguay.

Okinaka, R.T., Keim, P. (2016). The Phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiol Spectr.* 4(1), 1-12.

Olsen, S.R. Khasawneh, F.E. (1980). Use and limitations of physical-chemical criteria for assessing the status of phosphorus in soils. In: Khasawneh, F.E. et al. (eds.) *The Role of Phosphorus in Agriculture*. Madison, Wis. American Society of Agronomy. pp. 361-410.

Parks, E.J., Olson, G.J., Brinckman, F.E., Baldi, F. (1990). Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 5, 183–189.

Pérez, M.J. (2007). Eficiencia de algunas leguminosas en la utilización de fósforo proveniente de rocas fosfóricas. *Rev. Fac. Agron.* 24(1),113-132.

Pérez-García, A., Romero, D., De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agricultura. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2),187-193.

Priest, F. G., Kaji, D. A., Rosato, Y. B., & Canhos, V. P. (1994). Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiology*, 140, 1015–1022.

Quadt-Hallmann, A., Hallmann, J., Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can J Microbiol* 43(3):254–259.

Racca, R.W., Collino, D.J. (2005). Bases fisiológicas para el manejo de la fijación biológica del nitrógeno en soja. *Congreso Mundo Soja*. Buenos Aires. p. 111-120.

- Raghu, K., MacRae, I.C. (1966). Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 582–586.
- Ramachandran K., Srinivasan V., Hamza S., Anandaraj M. (2007) Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. In: Velázquez E., Rodríguez-Barrueco C. (eds) *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Developments in Plant and Soil Sciences*, vol 102. Springer, Dordrecht.
- Ratón, T.M.O. (2011). Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agricultura potentialities. *World J Microbiol Biotechnol*.
- Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q., Shen, Q. (2015) Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol Control* 80:89–95.
- Reyes Ramirez, A., & Ibarra, J. E. (2005). Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* Type Strains and Isolates by Using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Analysis, 71(3), 1346–1355.
- Reyes, I., Valery A., Valduz, Z. (2002). Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant and Soil*, Vol 287, 69-75.
- Richardson, A.E. (1994). Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst CE, Doubeand BM, Gupta VVSR (eds) *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Victoria, Australia, pp 50–62.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol* 156:989–996.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, T. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287,15–21.
- Ryu, C.M. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134 (3), 1017–1026.
- Schachtmam D., Robert R., Ayling S. (1998). Phosphorus up take by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* (116), 447–453.
- Schneider, K.B., Palmer, T.M., Grossman, A.D. (2002). Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 410-419.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2 (587), 1-14.
- Siddikee, M.A., Glick, B.R., Chauhan, P.S. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *nt Physiol Biochem* 49 (4),427–434.

- Suman, A., Nath Yadav, A., Verma, P. (2016). Endophytic microbes in crops: Diversity and beneficial impact for sustainable agricultura. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives*, pp. 117-143.
- Swaby R, Sperber JI (1958) Phosphate Dissolving Microorganisms in the Rhizosphere of Legume, *Nutrition Of Legumes; Proc. Univ. Nottingham 5Th Easter Sch. Agril. Sci. (CSIRO Adelaide). Soils & Fert* 22, 286, 289–294.
- Tarafdar, J.C., Yadav, R.S., Meena, S.C. (2001). Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *J Plant Nutr Soil Sci*, 164, 279–282.
- Tisdale, S., Nelson, L., Beaton, J., Havlin, L. (1993). *Soil Fertility and Fertilizers. Fifth Edition* MacMillan Publishing Company New York.
- Tisdale, S.L., Nelson, W. L., Beaton, J.D., Havlin, J.L. (1993). *Soil Fertility and Fertilizers. Fifth Edition. Macmillan Publishing Company. New York.* pp.176-229.
- Trolove, S.N., Hedley, M.J., Kirk, G.J.D., Bolan, N.S., Loganathan, P. (2003). Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Aust J Soil Res* 41, 471–499.
- Tunga, R., banerjee, R., Bhattacharyya, B.C. (1999). Optimization same factors affecting proteases production under solid state fermentation. *Biopr. Eng.* 187-190.
- Uruguay. Decreto 007/99, de 08 de enero de 1999. *Diario Oficial*, 18 de enero de 1999, p.67.
- Uruguay. Decreto 546/81, de 28 de octubre de 1981. *Diario Oficial*, 13 de noviembre de 1981, p.1489.
- Vessey, J. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- Wang, L, Lee, F., Tai, C., Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57,1846-1850.
- Whitela, M.A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69, 99–151.
- Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P.A. (2009). Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. In: Khan MS et al (eds) *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 23–50.

VI. OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar, identificar y producir un inoculante en base a una bacteria formadora de estructuras de resistencia con el potencial para movilizar fósforo del suelo.

VII. CAPITULO 1

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS FORMADORAS DE ESTRUCTURA DE RESISTENCIA MOVILIZADORAS DE FÓSFORO

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Generar una colección de bacterias formadoras de estructuras de resistencia (*Bacillus s.l.*) provenientes de la rizósfera de plantas de soja y/o de suelo no rizoférico.
- B. Caracterizar *in vitro* la colección bacteriana por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico e identificar en forma molecular los aislamientos que presenten dichas características.

Tabla de Contenidos

A.	INTRODUCCION ESPECÍFICA.....	26
1.	Aislamiento de <i>Bacillus s.l.</i> movilizadores de fósforo orgánico e inorgánico del suelo ..	26
2.	Estrategia microbiana de <i>Bacillus s.l.</i> para la solubilización de fósforo inorgánico	26
3.	Estrategia microbiana de <i>Bacillus s.l.</i> para la mineralización de fósforo orgánico	28
B.	MATERIALES Y MÉTODOS	301
1.	Formación de una colección de bacterias formadoras de estructura de resistencia.....	31
1.1.	Muestreo de material vegetal y suelo	31
1.2.	Estrategia de aislamiento a partir de suelo rizoférico, no rizoférico y raíz de soja .	33
2.	Caracterización de la colección bacteriana por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio sólido y selección de grupo de cepas promisorias (1° Nivel de <i>Screening</i>).	33
2.1.	Determinación semicuantitativa de actividad solubilizadora de (FePO ₄ :AlPO ₄ :Ca ₃ (PO ₄) ₂) y actividad mineralizadora en medio sólido.	33
2.2.	Identificación filogenética del grupo de cepas promisorias.....	34
3.	Caracterización del grupo de cepas promisorias por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio líquido y selección de grupo de interés (2° Nivel de <i>Screening</i>).	35
3.1.	Cuantificación de actividad solubilizadora de (FePO ₄ :AlPO ₄ :Ca ₃ (PO ₄) ₂) y actividad mineralizadora en medio líquido.	35
4.	Caracterización del grupo de cepas de interés (3° Nivel de <i>Screening</i>)	36
4.1.	Cuantificación de actividad solubilizadora de FePO ₄ , AlPO ₄ , Ca ₃ (PO ₄) ₂	36
4.2.	Cuantificación de actividad fitasa	36
4.3.	Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos mayoritarios secretados según fuente de fósforo.	38
4.4.	Actividad hemolítica	38
4.5.	Crecimiento a 37°C en medio sólido	39
5.	Análisis estadístico multivariado.....	39
5.1.	Análisis estadísticos multivariados descriptivos.....	39
5.2.	Análisis estadísticos multivariados de inferencia	39
C.	RESULTADOS Y DISCUSION	42
1.	Formación de una colección de bacterias formadoras de estructura de resistencia con potencial actividad movilizadora de fósforo del suelo	42
2.	Caracterización de la colección bacteriana por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio sólido y selección de grupo de cepas promisorias (1° Nivel de <i>screening</i>).	42
2.1.	Determinación semicuantitativa de actividad solubilizadora de (FePO ₄ :AlPO ₄ :Ca ₃ (PO ₄) ₂) y actividad mineralizadora en medio sólido.	42

2.2.	Estudios filogenéticos a partir del gen <i>16S ARNr</i> y el gen <i>gyrB</i>	44
2.3.	Análisis multivariados de la colección bacteriana obtenida y procedencia de grupo de cepas promisorias.....	51
3.	Caracterización del grupo de cepas promisorias por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio líquido y selección de grupo de interés (2° Nivel de <i>Screening</i>).	55
3.1.	Cuantificación de actividad solubilizadora de $(\text{FePO}_4:\text{AlPO}_4:\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ y actividad mineralizadora en medio líquido.	55
4.	Caracterización del grupo de cepas seleccionadas (3 ^{er} Nivel de <i>Screening</i>).....	596
4.1.	Cuantificación de actividad solubilizadora de FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	596
4.2.	Cuantificación de actividad fitasa	60
4.3.	Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos (AOs) mayoritarios secretados según fuente de fósforo	62
4.4.	Actividad hemolítica y crecimiento a 37°C en medio sólido	67
D.	CONCLUSIÓN.....	69
E.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

A. INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA

1. Aislamiento de *Bacillus s.l.* movilizadores de fósforo orgánico e inorgánico del suelo

Los miembros de grupo *Bacillus s.l.* tienen una distribución ubicua en ecosistemas agrícolas, cumpliendo distintos roles de relevancia en el ciclado de nutrientes y en la protección de cultivos ante distintos factores de estrés biótico y abiótico, entre otros (Selvakumar *et al.*, 2016). Además de la versatilidad y las ventajas competitivas atribuible a este grupo bacteriano, dado la habilidad de formar endoesporas que le permite sobrevivir condiciones adversas y colonizar distintos nichos ecológicos, se ha reportado como uno de los componentes principales de la comunidad bacteriana solubilizadora/mineralizadora de fósforo inorgánico/orgánico en la rizósfera de varios cultivos comerciales (De Fereitas *et al.*, 1997; Puente *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2007; Jorquera *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013; Maougal *et al.*, 2014). Inclusive, *Bacillus* spp. endófitos de distintos cultivos agrícolas (inclusive soja) se han reportado con diferentes capacidades de promoción del crecimiento (Hung *et al.*, 2004; Suman *et al.*, 2016). Por lo que, se toma a este grupo bacteriano como objeto de estudio para conformar la colección y evaluar su capacidad de movilizar el fósforo del suelo.

Diferentes estrategias de aislamiento se han reportado para la formación de una colección de bacterias mineralizadoras. La siembra en medio sólido de diluciones seriadas de una suspensión de suelo ha sido implementada, obteniendo un éxito en el relevamiento de la funcionalidad de interés de 0.5% (Richardson *et al.*, 1997), 1% (Maougal *et al.*, 2014), 6-7 % (Jorquera *et al.*, 2008) como porcentaje en función de la totalidad de aislamientos obtenidos. No obstante, ninguno de los autores reporta haber obtenido géneros bacterianos formadores de estructura de resistencia. Otra estrategia utilizada es iniciar la prospección con un enriquecimiento del suelo en un medio con fitato de sodio como única fuente de carbono y fósforo (Richardson *et al.*, 1997). Richardson obtuvo para esta estrategia un porcentaje de aislamientos con la capacidad de mineralizar el fósforo orgánico del 4%, sin constatar algún género bacteriano formador de estructura de resistencia. Una tercera estrategia reportada supera la limitante de no obtener bacterias formadas de estructura de resistencia efectuando un shock térmico en una suspensión de suelo (Demirkan *et al.*, 2014). Para la cual se obtuvo un 15% de éxito en el relevamiento de la funcionalidad de interés y la totalidad de los aislamientos pertenecieron al grupo *Bacillus s.l.*

2. Estrategia microbiana de *Bacillus s.l.* para la solubilización de fósforo inorgánico

Los microorganismos miembros del grupo *Bacillus s.l.* presentan como principales mecanismos de solubilización de fósforo inorgánico la liberación de protones y ácidos orgánicos al medio, al igual que la mayoría de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal que presentan la capacidad funcional de regular la disponibilidad de este fitonutriente (Rodríguez *et al.*, 1999). En la Tabla 1. se presenta la revisión bibliográfica efectuada de actividades solubilizadoras para distintas cepas de *Bacillus spp.* cultivadas en distintas fuentes de fósforo inorgánico en sus correspondientes condiciones de cultivo.

Tabla 1. Actividad solubilizadora reportada para *Bacillus spp.*

Especie	A. solubilizadora ($\mu\text{mol-P/L}$) (*)	Medio	Condiciones de incubación	Ref
<i>Bacillus licheniformis</i>	4037	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (SRSM1=PVK+violeta de bromocresol)	1 día, aerobio, 25°C, 140rpm	Vazquez <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3068	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (SRSM1=PVK+violeta de bromocresol)	1 día, aerobio, 25°C, 140rpm	Vazquez <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus antrophaeus</i>	3230	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (SRSM1=PVK+violeta de bromocresol)	1 día, aerobio, 25°C, 140rpm	Vazquez <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus cereus</i>	614	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Nautiyal,1999)	3 días, aerobio, 28°C, 180rpm	Tao <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus coagulans</i>	4199	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Pikovskaya, 1948)	4 días, aerobio, 50°C, 180rpm	Yadav <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus coagulans</i>	2229	FePO_4 (Pikovskaya, 1948)	4 días, aerobio, 50°C, 180rpm	Yadav <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus coagulans</i>	2229	AlPO_4 (Pikovskaya, 1948)	4 días, aerobio, 50°C, 180rpm	Yadav <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus firmus</i>	2325-8721	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Nautiyal,1999)	3 días, aerobio, 28°C, 100rpm	Sandilya <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus megaterium</i>	565	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Nautiyal,1999)	3 días, aerobio, 28°C, 180rpm	Tao <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus megaterium</i>	2326	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Nautiyal,1999)	3 días, aerobio, 30°C	Chen <i>et al.</i> , 2006

(*) Actividad solubilizadora expresada como cantidad de ion ortofosfato liberado al medio ($\mu\text{mol-P/L}$), para el tiempo de incubación reportado.

En la Tabla 2. se presentan la identidad y rango de concentración de ácidos orgánicos secretados al medio por distintas cepas de *Bacillus s.l.* para distintas fuentes de fósforo orgánico e inorgánico en sus correspondientes condiciones de incubación.

Tabla 2. Identidad y rango de concentración de ácidos orgánicos (AOs) secretados al medio por distintas cepas de *Bacillus* spp.

Microorganismo	Condiciones de incubación				Identidad de AOs secretados	Rango de concentración (mM)	Ref
	Fuente de P	T Inc (días)	Temp (°C)	pH			
<i>Bacillus aryabhatai</i> (varias cepas)	Fitato de sodio	5	28	7	Á. glucónico	19-28	Sharma <i>et al.</i> , 2013
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	28	7	Á. glucónico	49-60	
	AlPO ₄	3	-	7	Á. láctico; Á. succinico; Á. tartático; Á. cítrico	1,9; 6,3; 0,8; 2,7	
<i>Bacillus megaterium</i> (P17)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	3	-	7	Á. láctico; Á. succinico; Á. tartático; Á. cítrico	0,7; 6,5; 0,9; 1,1	Zhong <i>et al.</i> , 2017
	FePO ₄	3	-	7	Á. láctico; Á. succinico; Á. cítrico; Á. acético	1,4; 2,2; 0,3; 0,7	
	Fitato de calcio	3	-	7	Á. láctico; Á. succinico, Á. tartático, Á. cítrico	1,4; 3,6; 2,8; 0,4	
<i>Bacillus coagulans</i>	Roca fosfórica	4	50	7	Á. cítrico; Á. málico; Á. acético; Á. glucónico	0,002; 0,003; 0,003; 0,01	Yadav <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus megaterium</i> (varias cepas)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	3	-	7	Á. láctico; Á. piruvico, Á. cítrico	-	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		1	30	7	Á. láctico; Á. succinico	-	
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1	30	7	Á. succinico	-	Vazquez <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus licheniformis</i>		1	30	7	Á. láctico; Á. succinico; Á. fumárico	-	
<i>Bacillus</i> sp.	P ₂ O ₅	14	30	-	Á. glucónico, Á. propionico, Á. succinico	64; 3,6; 764	Puente <i>et al.</i> , 2009

(T Inc) tiempo de incubación, (-) no reportado.

3. Estrategia microbiana de *Bacillus s.l.* para la mineralización de fósforo orgánico

Dentro de los microorganismos PGPR capaces de liberar el ion ortofosfato a partir de fuentes de fósforo orgánico, se reporta como principal estrategia microbiana la excreción de enzimas hidrolíticas del ácido fítico (principal fuente de fósforo orgánico en el suelo). Para miembros del grupo *Bacillus s.l.* también se reporta esta actividad microbiana para regular el ciclado del fósforo en el sistema planta-suelo-agua (Ahmad *et al.*, 2008).

En la Tabla 3. se presenta la revisión bibliográfica efectuada de actividades mineralizadoras para distintas cepas de *Bacillus spp.* y sus correspondientes condiciones de cultivo.

Tabla 3. Actividad mineralizadora reportada para *Bacillus spp.*

Especie	A. mineralizadora (μmol-P/L) (*)	Medio	Condiciones incubación	Ref
<i>Bacillus cereus</i>	26	Menkina medio (Niewolak,1980)	3 días, aerobio, 28°C, 180rpm	Tao <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus cereus</i>	42	Menkina medio (Niewolak,1980)	4 días, aerobio, 28°C, 180rpm	Liu <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus megaterium</i>	2,0	Menkina medio (Niewolak,1980)	3 días, aerobio, 28°C, 180rpm	Tao <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	52	Menkina medio (Niewolak,1980)	4 días, aerobio, 28°C, 180rpm	Liu <i>et al.</i> , 2011

(*) Actividad mineralizadora. expresada como cantidad de ion ortofosfato liberado al medio (μmol-P/L), para el tiempo de incubación reportado.

En la Tabla 4. se presentan la actividad fitasa reportada para distintas cepas salvajes de *Bacillus spp.* En la misma se especifican diferentes parámetros de incubación que inciden en el resultado final de esta variable. Los parámetros son: tiempo de incubación para la producción de fitasa, tiempo de incubación en la determinación de la actividad enzimática, temperatura de incubación en la determinación de la actividad enzimática, pH de incubación en la determinación de la actividad enzimática, volumen de incubación del extracto proteico y el ácido fítico para la determinación de la actividad fitasa.

Tabla 4. Actividad fitasa reportada para *Bacillus* spp.

Tipo de actividad	Microorganismo	U	A.vol(U/mL)	A.esp(U/mg)	T _{prod} (h)	T _{Ac} (min)	T(°C)	pH	Medio de producción fitasa	V _{inc} (μL)	Ref
Extracelular	<i>Bacillus subtilis</i>	mol-P/min	0,25	-	42	60	50	6,5	no fitato (Idriss, 2002)	150	Idriss <i>et al.</i> , 2002
Asociada célula	<i>Bacillus sp.</i>	μmol-P/min	-	0,14	48	30	37	7	fitato 1,5g/L (Kerovuo,1998)	280	Acuña <i>et al.</i> , 2011
Extracelular	<i>Bacillus pumilus</i>	μmol-P/min	-	0,30	96	60	37	6	LB (no fitato)	1000	Dechavez <i>et al.</i> , 2011
Extracelular	<i>Bacillus coagulans</i>	μmol-P/min	-	0,35	96	60	37	6	LB (no fitato)	1000	Dechavez <i>et al.</i> , 2011
Extracelular	<i>Bacillus megaterium</i>	μmol-P/min	-	0,25	96	60	37	6	LB (no fitato)	1000	Dechavez <i>et al.</i> , 2011
Extracelular	<i>Bacillus licheniformis</i>	μmol-P/min	-	0,25	96	60	37	6	LB (no fitato)	1000	Dechavez <i>et al.</i> , 2011
Extracelular	<i>Bacillus subtilis</i>	μmol-P/min	0,60	-	20	60	37	7,5	no fitato (Idriss, 2002)	400	Farhat <i>et al.</i> , 2008
Extracelular	<i>Bacillus sp.</i>	μmol-P/min	0,16	-	96	10	37	7	no fitato (Choi, 2001)	1000	Choi <i>et al.</i> , 2001
Extracelular	<i>Bacillus subtilis</i>	μmol-P/min	4,60	-	48	30	55	7	fitato 10g/L (Rocky-Salini, 2016)	500	Rocky-Salini <i>et al.</i> , 2016
Extracelular	<i>Bacillus licheniformis</i>	μmol-P/min	-	1,05	96	30	37	5,5	Fitato 3g/L (Howson, 1983)	1000	Dan <i>et al.</i> , 2015

(*) (U) Unidades de enzima definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1mol ó 1 μmol de ión ortofosfato por minuto en las condiciones de incubación que se describen en la tabla, (A_{vol}) Acitividad volumétrica, (A_{esp}) Actividad específica, (T_{prod}) tiempo de incubación para la producción de fitasa, (T_{Ac}) tiempo de incubación en la determinación de la actividad enzimática, (T) temperatura de incubación en la determinación de la actividad enzimática, (pH) pH de incubación en la determinación de la actividad enzimática, V_{inc} volumen de incubación para la determinación de la actividad fitasa.

B. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Formación de una colección de bacterias formadoras de estructura de resistencia

1.1. Muestreo de material vegetal y suelo

Para la prospección se muestreó suelo rizoférico y plantas de soja de seis sitios sojeros, y suelo no rizoférico de cinco sitios sin historia previa de este cultivo. Para la caracterización fisicoquímica de cada sitio se muestreó suelo no rizoférico. En la Tabla 5. y Figura 1 se detallan las características y ubicación de los sitios de muestreo.

En los sitios sojeros se recolectaron al menos cinco plantas de soja por sitio en estadio fenológico R2, (Fehr *et al.*, 1977) con parte de suelo rizoférico prendido a la raíz. Las muestras se almacenaron a 4°C por no más de 3 meses hasta su procesamiento.

Para el muestreo de suelo no rizoférico se realizó una muestra compuesta de cinco puntos (separados al menos por 5 m) para cada sitio, tomando entre (0-15) cm de profundidad, homogenizando las mismas mediante tamizaje tras secado previo a temperatura ambiente (se emplearon mallas de 3mm de poro). Las muestras se almacenaron a 4°C por no más de 3 meses hasta su procesamiento.

Se separó una fracción de 500g de suelo no rizoférico de cada sitio para el análisis fisicoquímico en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de INIA La Estanzuela. Los parámetros analizados fueron: carbono orgánico (C.Org) (Wright *et al.*, 2001), nitrógeno total (N) (Wright *et al.*, 2001), fósforo Bray I (P Bray I) (Bray *et al.*, 1945), fósforo resina (P Resinas) (Zamuz *et al.*, 1974), fósforo cítrico (P Cítrico) (adaptación de Morón), pH (H₂O) relación suelo/agua: 1/2.5, acidez titulable (Beretta *et al.*, 2016), determinación de bases (potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg), calcio (Ca)) mediante extracción con acetato de amonio 1M (pH=7) (Jackson *et al.*, 1964) y cuantificación por espectrometría de absorción atómica, emisión y plasma acoplado inductivamente según corresponda, capacidad de intercambio catiónico (CIC_{pH7}), y textura (Beretta *et al.*, 2014).

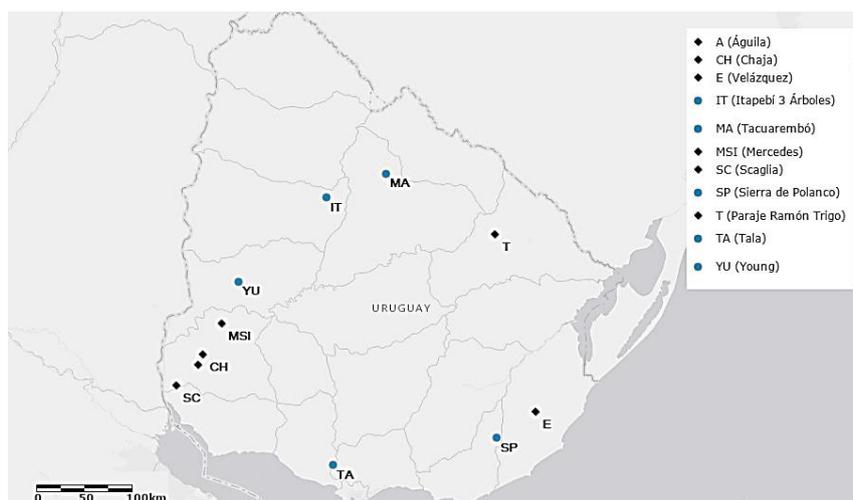


Figura 1. Ubicación geográfica de sitios de muestreo (ESRI 2011). Puntos negros corresponde a sitios sojeros, puntos celestes corresponde a sitios sin historia previa de soja.

Tabla 5. Características fisicoquímicas de los suelos de los sitios de muestreo (*)

Sitio	Código de sitio	C.Org (%)	N (%)	P Bray I (µg P/g)	P Resinas (µg P/g)	P Cítrico (µg P/g)	pH (H ₂ O)	A.Tit. (meq/100g)	Ca (meq/100g)	Mg (meq/100g)	K (meq/100g)	Na (meq/100g)	ClC _{pH7} (meq/100g)	Arena	Limo	Arcilla
Itapebí 3 Árboles	IT	4,8	0,4	2,5	2,7	3,0	5,5	6,8	14,5	5,9	0,4	0,5	21,3	26,9	53,7	19,4
Tala	TA	3,7	0,3	3,8	4,0	3,0	5,4	9,7	9,6	4,3	1,5	0,8	16,2	12,5	72,4	15,1
Young	YU	8,2	0,6	53,5	147,0	100,7	6,4	4,6	27,2	3,5	1,4	0,4	32,5	42,3	32,5	25,3
Sierra de Polanco	SP	2,7	0,3	17,8	17,8	24,0	5,4	6,0	3,5	1,4	0,5	0,3	5,7	57,6	13,3	29,1
Tacuarembó	MA	6,7	0,4	7,5	4,6	9,8	5,4	8,8	18,7	7,1	0,5	0,4	26,7	10,1	39,6	50,3
Velázquez	E	3,0	0,2	7,3	10,6	7,4	5,8	6,0	11,0	2,8	0,3	0,7	14,7	14,6	49,0	36,4
Mercedes	MSI	4,0	0,3	48,3	76,6	42,5	5,8	5,4	20,4	1,8	1,3	0,2	23,8	20,4	34,5	45,1
Paraje Ramón Trigo	T	1,2	0,1	2,7	3,3	3,5	5,8	2,2	3,8	0,7	0,2	0,5	5,2	75,2	0,7	24,1
Águila	A	3,1	0,3	26,5	23,8	26,1	5,7	6,5	14,0	1,3	0,6	0,3	16,1	17,4	37,7	44,8
Chajá	CH	2,4	0,2	47,7	81,4	73,2	6,8	2,1	19,0	2,0	0,7	0,6	22,3	19,5	39,8	40,8
Scaglia	SC	2,6	0,2	39,7	41,4	39,4	6,0	4,2	15,0	2,0	0,7	0,2	17,8	19,4	35,5	45,1

(*) Cuadrante superior e inferior de la tabla refiere a los sitios sin y con historia agrícola en el cultivo de soja, respectivamente

1.2. Estrategia de aislamiento a partir de suelo rizoférico, no rizoférico y raíz de soja

Se aislaron bacterias aerobias formadoras de estructuras de resistencia a partir de raíces de planta de soja, suelo rizoférico y no rizoférico de campo natural. Se procesaron dos plantas por sitio de muestreo.

A partir de las muestras de suelo (rizoférico y no rizoférico) se generó una suspensión de éste en un medio pobre (Glucosa, extracto de levadura, sal (GYS, Apéndice 1.1.1) (Patel *et al.*, 2013)), que se incubó 48 horas a 28°C y 180rpm, permitiendo el enriquecimiento de bacterias formadoras de estructura de resistencia tras el agotamiento de nutrientes. Posteriormente se realizó un shock térmico a 80°C, durante 4 minutos, con el fin de eliminar eventuales microorganismos que se encuentren en un estadio vegetativo y carezcan de la capacidad de generar estructuras de resistencia. Se sembraron diluciones seriadas en placas de Luria Bertani (LB-Agar, Apéndice 1.1.2), y se incubaron a 28°C, durante 24hs. Los aislamientos preseleccionados fueron bacilos Gram positivos (Bartholomew *et al.*, 1952), móviles y con endosporas visibles en microscopio óptico con contraste de fase. Para cada planta procesada, dos individuos de cada morfología identificada fueron purificados mediante al menos cuatro repiques sucesivos en LB-Agar antes de ser conservados.

Para la obtención de aislamientos asociados al rizoplasma, las raíces de planta de soja se desinfectaron superficialmente, efectuando la siguiente secuencia de inmersiones: un minuto con hipoclorito de sodio (NaClO) 0.35%, un minuto con etanol 70% y finalmente cuatro enjuagues con agua estéril. El último enjuague con agua estéril se sembró en LB-Agar, como control de esta etapa de desinfección. Las raíces desinfectadas se sembraron en LB-Agar a 28°C, durante 24hs. Las colonias que presentaron morfotipos característicos se repicaron en LB-Agar y fueron incubados durante siete días a 28°C, con el fin de envejecer el cultivo para que la formación de la estructura de resistencia tenga lugar. Luego, un segundo repique a LB-Agar fue sometido a un shock térmico a 50°C, durante 24hs. Los aislamientos que crecieron durante y/o tras el shock térmico, que fueron bacilos Gram positivos, móviles y con endosporas, se purificaron (no menos de cuatro repiques en LB-Agar). Al igual que para el suelo, para cada planta procesada, dos individuos de cada morfología identificada fueron purificados mediante al menos cuatro repiques sucesivos en LB-Agar antes de ser conservados.

Las cepas obtenidas fueron conservadas en glicerol 25% a -20°C y en perlas a -70°C.

Los morfotipos de colonia se diferenciaron según color, textura y borde de la colonia (Apéndice 4.1).

2. Caracterización de la colección bacteriana por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio sólido y selección de grupo de cepas promisorias (1° Nivel de Screening).

2.1. Determinación semicuantitativa de actividad solubilizadora de $(\text{FePO}_4:\text{AlPO}_4:\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ y actividad mineralizadora en medio sólido.

Se caracterizó *in vitro* la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio sólido de todos los aislamientos.

Las fuentes de fósforo inorgánico ensayadas fueron: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PCa, Apéndice 1.2), y la triple mezcla de FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en la proporción reportada para suelos del Uruguay (46:35:19) (PT, Apéndice 1.2) (Hernández *et al.*, 1995). La fuente de fósforo orgánico utilizada

fue fitato de sodio (POrg, Apéndice 1.2). Estas fuentes fueron incorporadas en el medio líquido reportado en Maougal et al. (2014).

Los aislamientos fueron crecidos en 5mL LB (tubo Falcon de 15mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). El inóculo fue lavado con solución salina de NaCl (0.85%), con el fin de eliminar posibles trazas de P, de modo tal de evitar falsos positivos y se ajustó una densidad óptica (D.O._{600nm}) de 0.8 con solución salina de NaCl (0.85%) (carga bacteriana aproximada de 1×10⁶ufc/mL). Un volumen de 10µL de inóculo se sembró por triplicado en los tres medios para cada cepa. Se registró la relación diámetro del halo/diámetro del crecimiento (en caso de que se constate crecimiento y formación de halo) a los 3, 6 y 10 días de incubación a 28°C.

Los controles biológicos empleados fueron: C1 control positivo de movilización de fósforo orgánico e inorgánico (*Bacillus megaterium*, ILBB592 (Abreo et al., 2018)), C2 control positivo de mineralización de fósforo orgánico (*Bacillus subtilis*, DSM 23778, DSMZ, Alemania), C3 control comercial (aislamiento de *Bacillus subtilis* obtenido de un producto comercial en proceso de registro en Uruguay como promotor de crecimiento vegetal), C4 control negativo de movilización de fósforo orgánico e inorgánico (*Bacillus aryabhatai*, ILBB510 (Abreo et al., 2018)).

Los candidatos promisorios seleccionados fueron aquellos que presentaron la capacidad de crecer y formar halo en POrg y PCa.

2.2. Identificación filogenética del grupo de cepas promisorias

2.2.1. Amplificación por PCR del gen *16S ARNr* y el gen *gyrB*.

Al grupo de cepas promisorias seleccionado y a una cepa representativa de cada morfotipo de colonia constatado, se amplificó el gen *16S ARNr* mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) usando los cebadores universales Eub27f/Eub1492r (Lane et al., 1991). Para la caracterización a nivel de especie de cepas muy relacionadas, se amplificó un segundo marcador filogenético, el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad β de la DNA-girasa, empleando los cebadores UP-1/UP2r (Yamamoto et al., 1995). Los cebadores de secuenciación de este gen son UP-1S/UP-2Sr (Tabla 6.).

Tabla 6. Secuencia de *primers* utilizados para la amplificación del gen de *16S ARNr* y *gyrB*.

Primer	Secuencia (5'- 3')	Tamaño de amplicón (pb)
Eub27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
Eub1492r	GGTACCTTGTACGACT	1500
UP-1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA(TC)GC(TCAG)GG(TCAG) GG(TCAG)AA(AG)TT(TC)GA	1200
UP2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC(AG)TC(TCAG)AC(AG) TC(TCAG)GC(AG)TC(TCAG)GTCAT	1200
UP-1S	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	-
UP-2Sr	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC	-

Se extrajo ADN total de las cepas mediante el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Austin, Texas, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante para bacterias Gram positivas, partiendo de colonias aisladas en medio de cultivo sólido. La calidad y cantidad de los productos de extracción fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % en buffer TAE (Apéndice 2.1) con tinción con GoodView™ a razón de 0.036µl/ml, a 90V durante 25 minutos y observado en transiluminador UV Carestream Gel Logic.

Todas las reacciones de PCR para la amplificación de los gen *16S ARNr* y *gyrB* se realizaron en un volumen final de 25µl conteniendo: 2,5µl de buffer de PCR 10X (Invitrogen, suministrado con la Taq), 3,75µl de MgCl₂ (25mM, Invitrogen), 0,5µl de mix de dNTPs (Invitrogen, 10mM), 1,0µl de cada cebador avance y reverso de la pareja que corresponda (10µM), 1,0µl de dimetilsulfóxido (DMSO, 100%), 0,25µl de Taq polimerasa (Invitrogen, 5,0 U/µl), 2 µl de ADN (0,05 pg/ul).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Nexus, Eppendorff. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas para el gen *16S ARNr*: un primer paso de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), hibridación (60°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 2 minutos). Por último, se realizó una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos. Para el gen *gyrB* el programa empleado fue: un primer paso de desnaturalización a 95°C por 1 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), hibridación (55°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 2 minutos). Por último, se realizó una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos.

Se verificó el tamaño del producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en buffer TAE (Apéndice 2.1). Se utilizó como marcador de peso molecular el AccuRuler 100-1500 pb Plus DNA RTU Ladder de Maestrogen.

Los productos de PCR fueron secuenciados en MACROGEN Inc. (Corea). En el caso del gen *gyrB* los cebadores de secuenciación fueron UP-1S/UP2Sr. Para obtener el género de los aislamientos, las secuencias resultantes se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

2.2.2. Identificación filogenética a partir del gen *16S ARNr* y el gen *gyrB*.

Para la construcción del árbol a partir de las secuencias del gen de *ARNr 16S* y *gyrB* se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 6 (Tamura *et al.*, 2013), usando secuencias de 1300 y 750 nucleótidos, respectivamente. Para ello se descargaron secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), y secuencias de cepas de referencias del gen de *ARNr 16S* de la base de datos EzTaxon (Chun *et al.*, 2007). Se alinearon empleando ClustalW incluido en MEGA (versión 6) junto con las secuencias recabadas previamente. Para la construcción del árbol se aplicaron diferentes algoritmos y al constatar la misma topología en los árboles, se decidió presentar los obtenidos con el algoritmo *Neighbor-joining* (Saitou *et al.*, 1987), calculando la distancia genética por el modelo de *Kimura* (Kimura *et al.*, 1980). La robustez de las ramas del árbol fue estimada con un bootstrap de 1.000 réplicas (Soltis *et al.*, 2003). Los grupos externos que se utilizaron fueron *Bacillus polymyxa* (X60632) y *Bacillus pumilus* (KC895462.1), para los genes de *ARNr 16S* y *gyrB*, respectivamente.

3. Caracterización del grupo de aislamientos promisorios por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio líquido y selección de grupo de interés (2° Nivel de *Screening*).

3.1. Cuantificación de actividad solubilizadora de (FePO₄:AlPO₄:Ca₃(PO₄)₂) y actividad mineralizadora en medio líquido.

Los aislamientos preseleccionados se caracterizaron *in vitro* por su capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio líquido empleando el mismo medio que en el ensayo en placa, sin agar.

La determinación de la actividad solubilizadora y mineralizadora en medio líquido se realizó cuantificando la liberación del ion ortofosfato durante el crecimiento del cultivo en un medio con una fuente de fósforo insoluble definida (fósforo inorgánico y orgánico, respectivamente).

La fuente de fósforo inorgánico ensayada fue la triple mezcla constituida por: FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PT, Apéndice 1.2). La fuente de fósforo orgánico utilizada fue fitato de sodio (POrg, Apéndice, 1.2). Se trabajó en condiciones de incubación aerobias (10mL de medio en matraces de 125mL, 180rpm) a 28°C.

Las cepas se hicieron crecer en medio sólido de PT y POrg tal como se describió en el inciso 2.1. A partir de estos cultivos se inocularon 15mL de LB (tubo Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). Un volumen de 1mL de cada cepa se sembró por duplicado en los dos medios de fósforo, alcanzando una carga bacteriana inicial en el matraz estimada en 1×10^6 ufc/mL (D.O._{600nm}=0.8). La concentración del ión ortofosfato en solución se determinó por el método espectrofotométrico del azul de molibdeno a las 0, 24, 48 horas de incubación [(De Nigris *et al.*, 2009), Apéndice 3.1]. El pH del caldo se determinó directamente en una alícuota del cultivo a los mismos tiempos de incubación. Se efectuaron dos determinaciones por réplica biológica a cada tiempo de incubación. La actividad solubilizadora y mineralizadora se calculó como la relación de la cantidad de ion ortofosfato liberado por unidad de volumen, por unidad de tiempo ($\mu\text{mol-PL}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Dado el tamaño del ensayo, el trabajo total se agrupó en cuatro corridas de análisis. En cada una se incorporaron los controles biológicos C1 y C4, y un blanco analítico de cada medio de cultivo sin inocular.

Los candidatos de interés en este nivel de *screening* fueron aquellos que presentaron una actividad mineralizadora significativamente mayor al control biológico C1.

4. Caracterización del grupo de aislamientos de interés (3° Nivel de *Screening*)

4.1. Cuantificación de actividad solubilizadora de FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

A partir de grupo de aislamientos de interés, se procedió a la caracterización *in vitro* de la capacidad de solubilizar las tres fuentes de fósforo inorgánico por separado en medio líquido.

La actividad solubilizadora de FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se determinó como se describió en el inciso 3.1 salvo que las fuentes de fósforo inorgánico ensayadas fueron: FePO_4 (PFe, Apéndice 1.2), AlPO_4 (PAI, Apéndice 1.2), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PCa, Apéndice 1.2); y los tiempos de incubación a los que se efectuaron las determinaciones fueron: 0, 1, 7 días de incubación.

4.2. Cuantificación de actividad fitasa

Se procedió a la caracterización *in vitro* de la capacidad de mineralizar fósforo orgánico en medio líquido por la secreción extracelular de proteínas con actividad fitasa. Los controles biológicos C1, C2, C3 y C4 también fueron incluidos.

4.2.1. Extracto proteico concentrado

Los aislamientos de interés se hicieron crecer en medio sólido de POrg (inciso 2.1) para inocular 15mL de LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). Un volumen de 1mL de cada cepa se sembró por duplicado en 15mL de POrg (falcón de 50mL, 180rpm, 28°C), alcanzando una carga bacteriana inicial en el matraz estimada en 1×10^6 ufc/mL (D.O._{600nm}=0.8). Al alcanzar la fase estacionaria (48 horas, Apéndice 4.3), los cultivos fueron centrifugados (7000rpm, 10min, 4°C).

El sobrenadante (30mL) se filtró (PVDF, 0.22 μ m, Millex GV) y se cargó en una unidad de filtración Amicon (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, con un cutoff de 10kDa) con el fin de concentrar el extracto proteico (Maougal *et al.*, 2014). El sobrenadante obtenido se centrifugó en un rotor fijo a 9000rpm por 10 minutos a 4°C, en alícuotas de 10mL hasta cargar la totalidad del mismo. Finalmente, se reconstituyó la proteína retenida en la membrana en 1mL de buffer de trabajo (Apéndice 2.2) como volumen final, obteniendo un extracto proteico ($\times 30$) que se conservó a 4°C.

4.2.2. Cuantificación del contenido de proteína total en el extracto proteico concentrado

La cuantificación del contenido de proteína total en el extracto proteico concentrado se efectuó por el método del ácido bicinónico (BCA) según las especificaciones del fabricante del kit Pierce BCA Protein Assay Kit. La calibración del método se efectuó con albumina de suero bovino (bovine serum albumin (BSA)) en el rango dinámico de 20-2000 μ g/mL.

4.2.3. Determinación de actividad fitasa

Se realizó la determinación de la actividad fitasa del extracto proteico obtenido según el inciso 4.2.1, en condiciones controladas de pH, temperatura y concentración de fitato-Na. Se cuantificó la concentración del ion ortofosfato en el tiempo.

La determinación de la actividad fitasa se efectuó por triplicado de acuerdo a Maougal *et al.* (2014) y Hill *et al.* (2007) con modificaciones: 50 μ L de una solución de fitato-Na 10mM (pH=7) y 150 μ L de buffer de trabajo (Apéndice 2.2) se preincubaron a 37°C (baño de agua) por 10 minutos. Se agregó 100 μ L del extracto proteico concentrado y se incubó a 37°C durante 48 horas. Se efectuó la determinación de la concentración del ión ortofosfato en solución por el método espectrofotométrico del azul de molibdeno a las 0, 24, 48 horas de incubación [(De Nigris *et al.*, 2009), Apéndice 3.2].

Para cada cepa se efectuó un blanco reactivo en el cual se determinó el contenido de ion ortofosfato no asociado a una actividad proteica que pudo provenir de la solución de fitato-Na utilizada, la liberación de ortofosfato durante el período de incubación del fitato-Na por una degradación química, y del extracto proteico concentrado. Para su determinación se procedió de igual modo que con las muestras, salvo que el extracto proteico concentrado se agregó luego de la solución de desarrollo de color (reactivo combinado), así la acidez de este reactivo impidió que la actividad proteica tenga lugar durante el lapso de desarrollo del color. Se incubó 50 μ L de una solución de fitato-Na 10mM (pH=7) y 150 μ L de buffer de trabajo a 37°C (baño de agua). A las 0, 24 y 48 horas de incubación se agregó 1200 μ L del reactivo combinado para la determinación de la concentración del ion ortofosfato en solución (Apéndice 3.2) y luego inmediatamente 100 μ L del extracto proteico concentrado.

Una unidad enzimática (UE) se define como la cantidad de fitasa que libera 1 μ mol de ión ortofosfato en un día en las condiciones de incubación anteriormente descritas. La actividad fitasa se calculó como la cantidad de ion ortofosfato liberado por unidad de volumen (mililitro de extracto proteico concentrado), por unidad de tiempo (μ mol-PmL⁻¹día⁻¹ ó UE/mL (*Actividad volumétrica*)). A su vez, la actividad fitasa se corrigió por el contenido de proteínas totales presente en el extracto proteico concentrado (Inciso, 4.1.2), y se expresó como la cantidad de ion ortofosfato liberado por cantidad de proteína en el extracto proteico concentrado, por unidad de tiempo (μ mol-P μ g⁻¹día⁻¹ ó UE/ μ g (*Actividad Específica*)).

4.3. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados según la fuente de fósforo utilizado.

La identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados al medio de cultivo para las cuatro fuentes de fósforo (POrg, PCa, PFe, PAI), se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography* (HPLC)) en fase reversa según el protocolo publicado de Cawthray G.R. et al. (2003) modificado.

El análisis se realizó en un Waters (Milford, MA, USA) 600E el cual incluye bomba cuaternaria, horno de columna, 717 plus autosampler y 996 detector de arreglo de diodos. La separación cromatográfica fue efectuada en una columna C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5µm) Restek a 35°C. La fase móvil consistió en una mezcla isocrática de buffer 25 mM KH₂PO₄ pH=2.5 y metanol a una proporción (93:7) y a un flujo de 0.8mL/min.

La información fue adquirida y procesada por *Empower Pro Chromatography Data software* entre 190-400 nm y se cuantificaron estándares de ácido glucónico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido succínico y muestras a 210nm. La calibración del método se efectuó en cada batch de análisis (Apéndice 4.5).

Una alícuota del medio de cultivo conservado a -20°C, se filtró (PVDF, 0.22µm, Millex GV) y se inyectó 30µL en el sistema cromatográfico. Se analizaron dos réplicas biológicas cada una por duplicado de inyección.

4.4. Actividad hemolítica

Se determinó la actividad hemolítica de los aislamientos de interés y los controles biológicos C1, C2, C3 y C4.

4.4.1. Actividad hemolítica en medio sólido

Los aislamientos fueron crecidos en 15mL de TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid) (tubo Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 30°C) (Ceuppens *et al.*, 2012) hasta una carga bacteriana de 1×10⁶ufc/mL. De estos cultivos se efectuaron duplicados biológicos. Un volumen de 10µL de inóculo se sembró por triplicado en Blood Agar (Tryptic Soy Agar with 5% Sheep Blood, Biomerieux), por cada réplica biológica. Se registró el patrón de crecimiento obtenido (actividad hemolítica continua débil, continua fuerte o discontinua, Apéndice 4.4) a los 24, 48, 72 horas y 10 días de incubación a 20°C.

4.4.2. Detección de Hbl (enterotoxina hemolítica)

Los aislamientos fueron crecidos en 15mL de TSB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C, (Ceuppens *et al.*, 2012)) hasta una carga bacteriana de 1×10⁶ufc/mL, efectuándose una réplica biológica. Luego, estos cultivos fueron centrifugados (7000rpm, 10min, 4°C), el sobrenadante obtenido fue filtrado (PVDF, 0.22µm, Millex GV) y conservado a 4°C por menos de 24 horas.

Se efectuó una única detección de Hbl por cepa, según las especificaciones del fabricante del kit BCET-RPLA Toxin Detection Kit. Se incluyó un control positivo provisto por el kit y un blanco del medio TSB estéril.

La técnica consiste en un ensayo de aglutinación reversa. En el cual partículas de látex son sensibilizadas con anticuerpos (Anti-Hbl) y ante la presencia del antígeno (Hbl) en solución se genera una reacción de aglutinación.

4.5. Crecimiento a 37°C en medio sólido

A partir del grupo de aislamientos de interés, se procedió a la determinar el crecimiento a 37°C en medio sólido. Se incluyen los controles biológicos C1, C2, C3 y C4 en el ensayo.

Los aislamientos y controles fueron crecidos 15mL de TSB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 30°C). (Ceuppens *et al.*, 2012) hasta una carga bacteriana de 1×10^6 ufc/mL. Estos cultivos se efectuaron duplicados biológicos. Un volumen de 10µL de inóculo se sembró por triplicado en LB-Agar para cada réplica biológica. Se registro presencia de crecimiento y diámetro del mismo (en caso de corresponder) a los 24, 48, 72 horas y 10 días de incubación a 37°C.

5. Análisis estadístico multivariado

5.1. Análisis estadísticos multivariados descriptivos

Los análisis estadísticos multivariados descriptivos efectuados en el presente Capítulo han sido: análisis de conglomerados, análisis de correspondencia múltiple y análisis de componentes principales, efectuados con el software Infostat, versión 2017p (Di-Rienzo *et al.*, 2011).

El análisis de conglomerado tiene como objeto la búsqueda de grupos similares de objetos, ya sea de muestras como variables. Para cualquier algoritmo de *cluster* es necesario seleccionar una medida de distancia y un método de agrupamiento. Para los datos binarios es recomendable la selección como índice de similitud el calculado según Dice y luego la conversión de este a distancia por la función $\sqrt{1-S}$ (Balzarini *et al.*, 2015). Los métodos de agrupamiento jerárquicos son utilizados cuando no se conoce la cantidad de grupos de conglomerados a esperar. Del conjunto de estos métodos se seleccionó el UPMGA (*unweighed pair-group arithmetic average method*), pese a que ensayaron varios sin obtener diferencias entre los dendogramas resultantes.

El análisis de correspondencia múltiple es una técnica exploratoria que permite representar gráficamente filas y columnas de una tabla de contingencia multidimensional, generando el ordenamiento de datos discretos respecto a la frecuencia de ocurrencia de cada nivel que adopta las variables de estudio. Este análisis sugiere relaciones de dependencia entre niveles de distintas variables en base a agrupamientos o diferenciaciones de grupos constatados en el gráfico resultante.

El análisis de componentes principales es una técnica de ordenamiento y reducción de dimensiones que permite examinar todos los resultados en un espacio de menor dimensión al original. Se construyen un número reducido de variables sintéticas o componentes (combinaciones lineales ortogonales normalizadas de las variables originales) que explican la variabilidad existente de los datos multivariados continuos estandarizados utilizados. Comúnmente, se representa dos variables sintéticas y se representa en un mismo espacio el ordenamiento de variables y casos mediante la construcción de un diagrama biplot. De este análisis puede interpretarse: similitudes y diferencias entre casos (proyección ortogonal de punto caso sobre eje componente), variables de mayor inercia que pueden explicar esos agrupamientos (proyección ortogonal de punto caso sobre vector variable), correlación entre variables.

5.2. Análisis estadísticos multivariados de inferencia

Los análisis estadísticos multivariados de inferencia efectuados en el presente Capítulo han sido: análisis de correspondencia canónica (CCA), análisis multivariado de la varianza (MANOVA) y análisis de regresión lineal múltiple.

El análisis de correspondencia canónica fue efectuado con el software Infostat, versión 2017p (Di-Rienzo, 2011), en interfase con el software R (3.4.0) utilizando el paquete estadístico *vegan*. Este análisis emplea técnicas de regresión multivariante para evaluar la inferencia de relaciones entre una matriz de observaciones (sitios por variables observadas) y una explicativa (sitios por variables ambientales que caracterizan dichos sitios). Para el caso de estudios ecológicos (Resultados y discusión, inciso 2.3) las variables observacionales presentan una distribución unimodal respecto a las variables ambientales (rango dinámico amplios) y en ese caso se utiliza el análisis de correspondencia canónica. En caso de que ambos grupos de variables presenten una relación lineal (rango dinámico de variables explicativa estrecho) se utiliza el análisis de correlaciones canónicas o de redundancia.

Es de destacar para este análisis que a medida que el número de variables ambientales aumenta con respecto al número de observaciones, el resultado del CCA se hace más dudoso, independientemente de que las relaciones observadas sean aparentemente fuertes. No obstante, se inicia el análisis con un número alto de variables ambientales las cuales se van depurando por falta de significancia en explicar la matriz de observaciones y/o colinealidad entre ellas. Este proceso se describe en el script adjunto (Apéndice 4.2).

El resultado del análisis se representa en un gráfico de triplot en el cual se construye con dos variables sintéticas (combinación lineal de variables explicativas) y se gráfica los casos (puntos) en relación con la totalidad de variables observacionales (puntos) y las variables explicativas significativas (vectores). En su interpretación es de destacarse que no supone una descripción de la totalidad de la estructura de matriz de observaciones, sino de la parte de la estructura de los datos de nuestra matriz de observaciones que puede ser explicada por la matriz ambiental de significancia. En esta representación las distancias entre puntos representativos de casos o variables observacionales son distancias chi-cuadrado y deben ser interpretadas como tales. Las proyecciones ortogonales sobre los vectores de las variables explicativas indican la magnitud de la distancia caso-caso y variable-variable. La distancia lineal caso-variable no es interpretable, pero la comparación de las proyecciones ortogonales del caso y variable sobre un mismo vector explicativo indican la influencia de la variable observacional sobre el caso observado.

El análisis multivariado de varianzas se utiliza para efectuar inferencias simultáneas sobre los efectos de los factores del modelo de análisis en caso de que los tratamientos ejecutados presenten una estructura en consecuencia del diseño experimental utilizado. A diferencia del análisis de varianza univariado, en este módulo se deberán seleccionar más de una variable dependiente. Es necesario probar los supuestos de multinormalidad de los residuos previo a su implementación (Balzarini *et al.*, 2008). La multinormalidad fue probada mediante el software Infostat, versión 2017p (Di-Rienzo, 2011), en interfase con el software R (3.4.0) utilizando el paquete estadístico *mvnrmtest*, que permite efectuar la prueba de Shapiro-Wilk para multivariantes. Dada la significancia del modelo se efectuó la prueba de comparación de medias de Hotelling corregido por Bonferroni con el software Infostat, versión 2017p.

El análisis de regresión lineal múltiple involucra un conjunto de técnicas estadísticas cuyo propósito es la construcción de un modelo para la estimación de la media de una variable dependiente a partir de una variable o varias variables independientes o también llamadas regresoras, constatando la significancia de relaciones causales. Las variables dependientes que se estudiaron fueron las actividades microbianas constatadas en medio líquido cuando las fuentes de fósforo eran: fitato de sodio (A_{miner}), FePO_4 (A_{Fe}), AlPO_4 (A_{Al}) y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (A_{Ca}). Las variables regresoras ensayadas fueron: la concentración de ácidos orgánicos obtenidos en el sobrenadante de cultivo (dentro del grupo de los siete ácidos orgánicos con capacidad de analítica de determinación), la reducción de pH del medio (ΔpH), los índices de Shannon y Simpson determinados con el software Infogen, versión 2016 (Balzarini *et al.*, 2015) para el perfil de ácidos orgánicos obtenidos y la actividad fitasa para el caso de A_{miner} .

Los análisis fueron efectuados con el software Infostat, versión 2017p (Di-Rienzo *et al.*, 2011). Como primera instancia se evaluó la multicolinealidad entre la totalidad de las variables regresoras en estudio corroborando que el factor de inflación de varianzas (VIF) tienda a la unidad. De este modo se evitó generar modelos redundantes de acotado rango dinámico de aplicabilidad. Como segundo aspecto se evaluó la significancia de cada variable regresora para el modelo mediante el estudio del gráfico de dispersión de residuos parciales de cada variable dependiente con las posibles variables regresoras (sugiere orden polinómico en que debe ingresar al modelo), el estadístico de Cp-Mallow (indicador de importancia relativa de las variables regresoras en explicar la variable dependiente) y el p-valor de significancia obtenido de la prueba T que propone como hipótesis nula la igualdad del valor poblacional del parámetro del modelo a cero. Con el criterio de información Akaike y Bayesiano (AIC), (BIC) (lo menor posible) se evaluó el mejor modelo de ajuste para un set de datos establecidos. Para la selección del modelo lineal múltiple de mejor ajuste se contempló un bajo error cuadrático medio de predicción (ECMP), y R^2_{adj} tendiente a la unidad, pudiendo intercomparar modelos de distintos sets de datos con estos dos criterios.

C. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Colección de bacterias formadoras de estructura de resistencia con potencial actividad movilizadora de fósforo del suelo

En la selección de los sitios de muestreo se contempló que los mismos difieran en contenido y forma predominante de fósforo en el suelo, para el grupo de sitios con y sin historia previa del cultivo de soja, respectivamente.

Se obtuvieron aislamientos a partir de raíces de plantas de soja y su correspondiente suelo rizoférico para los sitios sojeros, y de suelo no rizoférico para los sitios sin historia previa en este cultivo. Al optar por estos materiales de partida se buscó enriquecer la diversidad genética y funcional de los aislamientos obtenidos, con el fin de relevar entre ellos la capacidad funcional de movilizar el fósforo.

La colección se conformó por 182 aislamientos de bacilos gram positivos que presentaron la capacidad de formar estructuras de resistencia, entre los cuales se relevaron 25 morfotipos de colonia descritos en el Apéndice 4.1.

2. Caracterización de la colección bacteriana por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio sólido y selección del grupo de aislamientos promisorios (1° Nivel de *screening*).

- 2.1. Determinación semicuantitativa de actividad solubilizadora de $(\text{FePO}_4:\text{AlPO}_4:\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ y actividad mineralizadora en medio sólido.

Diferentes medios de cultivos han sido reportados para evaluar la capacidad de solubilizar y/o mineralizar el fósforo inorgánico y/o orgánico en medio sólido (Pikovskaya *et al.*, 1948; Angle *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1997; Nautiyal *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 2007; Jorquera *et al.*, 2008; Maougal *et al.*, 2014). En estos medios se busca simular la concentración y relación de macronutrientes y micronutrientes disponibles en el suelo. El medio líquido reportado en Maougal (2014) fue el seleccionado al ser un medio sintético, reproducible, que presenta la concentración y relación consensuada de los principales macronutrientes.

Las fuentes de fósforo ensayadas fueron: fitato de sodio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y la triple mezcla de FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. El nivel de fósforo total (mg-P/L) utilizado en estos tres medios fue 708ppm, encontrándose en orden con la concentración a la cual se encuentran en los medios citados. Sin embargo, el nivel de fósforo total para suelos de campo natural sin fertilización previa de Uruguay fue entre 200 y 800 ppm. Los contenidos de P en formas inorgánicas oscilan en términos generales entre 40 y 300 ppm, en tanto que en las formas orgánicas entre 60 a 300 ppm siendo inferiores a la concentración de trabajo (Hernández *et al.*, 1995).

Si bien se ha empleado ampliamente el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fósforo inorgánico para la selección *in vitro* de bacterias solubilizadoras, son numerosos los reportes en que se constata que los candidatos seleccionados mediante esta estrategia no manifiestan la capacidad de solubilizar al efectuarse el ensayo en planta (Bashan *et al.*, 2012). Esto en parte se atribuye a que la movilización de fósforo es un proceso complejo, afectado por numerosos factores químicos y biológicos, requiriendo una visión integradora de ambos aspectos para la

compresión de este. El utilizar múltiples fuentes de fósforo inorgánico busca contemplar la interacción química de las mismas, y modelar la fracción inorgánica del suelo por otros componentes menos solubles que $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Por ello, se decide efectuar la triple mezcla de FePO_4 , AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a la proporción reportada para suelos del Uruguay (46:35:19) (Hernández *et al.*, 1995).

Una vez corroborado los controles biológicos incluidos en cada corrida de análisis se recabaron los datos a los 6 días de incubación, tiempo de incubación al cual se obtuvo una mayor diferenciación entre aislamientos.

La capacidad funcional de mineralizar el P-Org se constató en el 13% del total de aislamientos, siendo del orden a lo obtenido por otras estrategias (Demirkan *et al.*, 2014). La capacidad funcional de solubilizar el P-Ca (crecimiento y formación de halo) fue de 18%. En la triple mezcla solo se obtuvo crecimiento para este tiempo de incubación en el 31% de los aislamientos.

En base a la totalidad de datos recabados se construyó una matriz de presencia/ausencia de crecimiento y formación de halo para los tres medios empleados y tras un análisis de conglomerados jerárquico por el método de UPGMA (*unweighed pair-group arithmetic average method*) se obtuvieron 13 grupos de conglomerados (Figura 2).

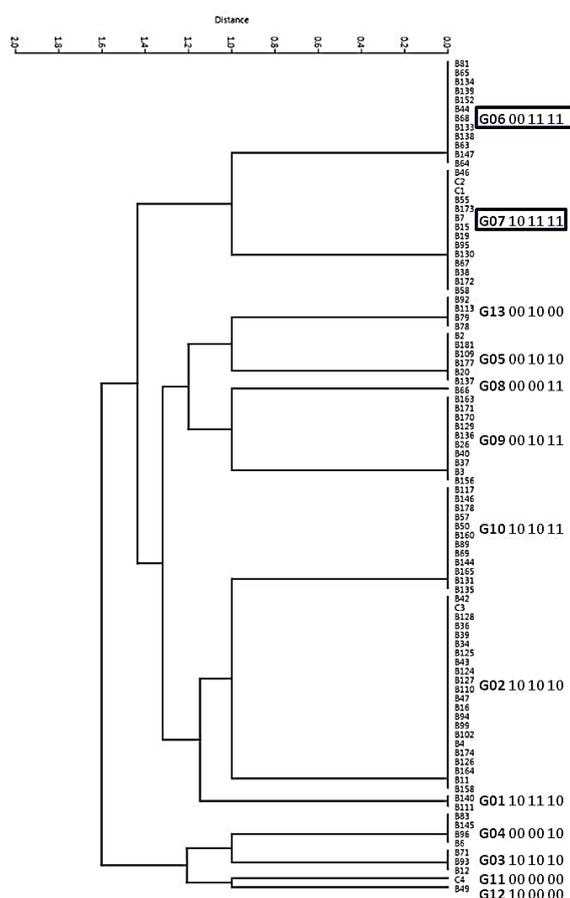


Figura 2. Dendrograma obtenido a partir de la matriz distancia basada en el índice de similitud (S) Dice y transformación $\sqrt{\text{1-S}}$, por el método de UPGMA. A cada conglomerado se le asigna una codificación fenotípica de acuerdo con una respuesta positiva (1) ó negativa (0) en crecimiento y formación de halo en los tres medios sólidos: PT, PCa y P-Org. Se enmarcan en azul los conglomerados preseleccionados. Del grupo G11 solo se representa un candidato de

los 91 que pertenecen a este conglomerado. El sufijo "ILLB" del nombre del aislamiento es sustituido por "B" en esta figura.

Los aislamientos pertenecientes a los grupos G6 y G7, crecieron y formaron halo en PCa y POrg. Los aislamientos pertenecientes al G7 crecieron además en PT a diferencia del G6. Estos 24 aislamientos preseleccionados pasaron al 2^{do} nivel de *screening*. Cabe mencionar que 11 de los 25 morfotipos constatados originalmente en la colección pasaron al 2^{do} nivel de *screening*.

Como primera aproximación, se constató una mayor abundancia de aislamientos con la capacidad funcional de interés aislados a partir de raíces de plantas de soja y suelo rizosférico, en comparación con los recabados a partir de suelo no rizoférico de sitios sin historia previa en este cultivo. Una eventual presión de selección ejercida por la planta y/o condiciones de cultivo sobre los microorganismos de la rizósfera (Mendes *et al.*, 2013), pudo haber seleccionado aislamientos cultivables con la capacidad de mineralizar P orgánico y/o solubilizar P inorgánico. Se ha reportado la presión de selección que ejerce la planta de distintos cultivares en la selección de bacterias solubilizadoras de P inorgánico, bajo diferentes manejos agronómicos en suelos nacionales (Azziz *et al.*, 2012). En dicho trabajo, al implementar una estrategia de aislamiento no sesgada al enriquecimiento de bacterias formadoras de estructuras de resistencia, se constató la selección del género bacteriano *Pseudomonas*, minimizando la recuperación de miembros del grupo *Bacillus s.l.* cultivables.

Estudios estadísticos multivariados de inferencia presentados a continuación en este manuscrito (inciso 2.3) confirman esta hipótesis.

2.2. Estudios filogenéticos a partir del gen *16S ARNr* y el gen *gyrB*.

Al grupo de aislamientos promisorios seleccionado (ILBB64, ILBB65, ILBB44, ILBB152, ILBB147, ILBB63, ILBB68, ILBB81, ILBB139, ILBB133, ILBB138, ILBB134, ILBB58, ILBB95, ILBB172, ILBB173, ILBB7, ILBB38, ILBB55, ILBB19, ILBB15, ILBB46, ILBB67, ILBB130) y a un aislamiento representativo de cada uno de los 25 morfotipos de colonia (para completar los 25 morfotipos se sumaron los aislamientos: ILBB71, ILBB166, ILBB58, ILBB40, ILBB172, ILBB11, ILBB69, ILBB20, ILBB21, ILBB181, ILBB13, ILBB154, ILBB149, ILBB180, ILBB162, ILBB70, ILBB123), se les efectuó la caracterización molecular en base a la secuenciación de los genes *16S ARNr* y *gyrB*.

En base al porcentaje de similitud de las secuencias parciales de nucleótidos del gen *ARNr 16S* de cada aislamiento con sus correspondientes secuencias tipos se identificaron 15 grupos filogenéticos (Apéndice 4.6).

Para el grupo *Paenibacillus* spp. se construyó el árbol filogenético con las secuencias del gen *16S ARNr* (Figura 3), en el que se distinguen 4 clados. En el primer clado se agruparon tres aislamientos (ILBB133, ILBB134, ILBB138) con la secuencia tipo de *Paenibacillus silvae* (DB13031) (100% Bootstrap). El segundo clado está formado por las secuencias tipo de *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus xylanexedens*, el cual no puede ser resuelto con las secuencias del gen *16S ARNr* (99% Bootstrap). Un tercer clado formado por la secuencia tipo de *Paenibacillus dongdonensis* (KUDC0114), y un cuarto clado fue conformado por las secuencias de la cepa tipo de *Paenibacillus durus* y el aislamiento ILBB68 (100% Bootstrap).

Para los aislamientos ILBB11, ILBB40, ILBB58, ILBB69, ILBB95, ILBB130, ILBB172, ILBB173 el estudio filogenético efectuado a partir de las secuencias del gen *16S ARNr* arrojó porcentajes de

similitud mayores al 98% con las secuencias tipo de *Bacillus megaterium* (ATCC 14581) y *Bacillus aryabhattai* (B8W22). A estos aislamientos se les asigna como identificación filogenética el taxa *Bacillus megaterium/aryabhattai*.

El estudio filogenético efectuado para los aislamientos ILBB81, ILBB162, ILBB44, ILBB7, ILBB70 consistió en la construcción de árboles filogenéticos que no se presentan en el manuscrito, no obstante, en la Tabla 8. se informa el porcentaje de similitud de estos aislamientos con la secuencia tipo del gen *16S ARNr* correspondiente.

Si bien el análisis de secuencias del gen *16S ARNr* es el método de identificación bacteriano por excelencia, su aplicación a la identificación de especies fuertemente relacionadas es de poca utilidad, como es el caso de las especies que integran el grupo *Bacillus cereus sensu lato* (Wang, 2007). Se ha confirmado que el polimorfismo de los productos de amplificación del gen *16S ARNr* de cepas pertenecientes al grupo *Bacillus cereus sensu lato* no permite su discriminación a nivel de especie (Borin, 1997).

Como alternativa se trabaja como marcador filogenético alternativo, el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad β de la DNA-girasa (La Duc *et al.*, 2004), al tratarse de un gen de copia única, altamente evolutivo, constitutivo (*housekeeping*) e independiente del fenotipo de virulencia que la cepa presente.

Se recurrió a este segundo marcador filogenético para los complejos que no pudieron ser resueltos por las secuencias del gen *16S ARNr*. Estos complejos son: el grupo *Bacillus cereus sensu lato* (Figura 4), *Lysinibacillus xylanilyticus/macroides* (Figura 5), *Lysinibacillus fusiformis/sphaericus/variens* (Figura 5) y *Bacillus simplex/muralis/butanolivorans* (Figura 6).

Dado que se obtuvieron árboles con un nivel de resolución y capacidad discriminante suficiente con las secuencias del gen *gyrB*, no se efectuaron estudios de filogenia concatenando de ambos genes.

En la Figura 4 se muestra el árbol filogenético para el grupo *Bacillus cereus sensu lato* en el que se distinguen dos clados (100% Bootstrap). En el primer clado (violeta) correlaciona con el Cluster I reportado por Punina (2013), y se distinguen dos grupos (75% Bootstrap). El grupo A, está conformado por un subgrupo constituido por cepas de *B.anthraxis* patogénicas, el aislamiento ILBB123, y la cepa *B.thuringiensis* (cepa BGSC 4B1), subgrupo Z (reportado como *Bt+Ba*). Otros subgrupos del grupo A definido por Punina *et al.* (2013) no se encuentran representados en la Figura 4. En el grupo B se encuentran dos subgrupos, el subgrupo Y (reportado como *B.cereus I*) en el cual se agruparon secuencias de cepas de *B. thuringiensis* con la secuencia de la cepa tipo de *B.cereus* (ATCC 14579 patogénica para el humano) y el subgrupo X (reportado como *Bt I*) conformado sólo por secuencias de *B. thuringiensis* con las cuales se agrupó la secuencia del aislamiento ILBB55. El segundo clado (verde), el cual correlaciona con el Cluster II publicado por Punina *et al.* (2013), está formado mayoritariamente por secuencias de cepas de *B.thuringiensis* utilizadas en la producción industrial y por las de los aislamientos ILBB19, ILBB38, ILBB71, ILBB139, ILBB147 y ILBB166. Para el aislamiento ILBB55 se efectuó el estudio de toxicidad aguda oral en ratones efectuado según a OECD Test Guideline 425 (el cual no se presenta en este manuscrito) para una dosis de 2000mg de esporas/Kg, cumplió las exigencias de la normativa vigente para inoculantes microbianos.

En la Figura 5 se muestra el árbol filogenético para el grupo *Lysinibacillus* spp. en el que se distinguen cinco clados. En el primer clado se agruparon cuatro aislamientos (ILBB63, ILBB64, ILBB65, ILBB149) con la secuencia tipo de *Lysinibacillus xylanilyticus* (DSM 23493) (97% Bootstrap). El segundo clado comprendió a las secuencias de los aislamientos ILBB0152 y ILBB154 y la secuencia tipo de *Lysinibacillus parviboronicapiens* (K13154) (99% Bootstrap). En el tercer clado se encontró la secuencia tipo del *Lysinibacillus macroides* (DSM 54), resolviendo el complejo: *Lysinibacillus xylanilyticus/macroides*. El cuarto clado se conformó por tres subgrupos, el primero incluyó la secuencia tipo de *Lysinibacillus boronitolerans* (NBRC 103108), el segundo la secuencia de *Lysinibacillus fusiformis* (RB21) y el tercero secuencias de *Lysinibacillus sphaericus* (78% Bootstrap). Por último, en el quinto clado se agruparon las secuencias del aislamiento ILBB180 con la cepa tipo *Lysinibacillus varians* (GY32) (100% Bootstrap). El estudio filogenético con las secuencias parciales del gen *gyrB* resolvió el complejo *Lysinibacillus fusiformis/sphaericus/variens*. Para el aislamiento ILBB7 no se pudo obtener una secuencia del gen *gyrB* del largo y calidad adecuada para agregar al árbol filogenético del grupo de *Lysinibacillus* spp. Por ello en base al estudio efectuado con la secuencia del gen *16S ARNr*, complementado con la capacidad de crecer en LB-NaCl (7%) y la posición terminal de espora en el bacilo (Ahmed *et al.*, 2007) se le asignó la identificación presuntiva de *Lysinibacillus fusiformis*.

La Figura 6 muestra el árbol filogenético del complejo *Bacillus simplex/muralis/butanolivorans* el cual logra resolverse por el análisis de la secuencia parcial del gen *gyrB* al identificarse tres clados. Un primer clado en el cual las secuencias de la cepa tipo de *Bacillus simplex* (Se2) se agrupó con la de seis aislamientos (ILBB13, ILBB20, ILBB21, ILBB67, ILBB181) (58% Bootstrap). El segundo constituido por las secuencias de la cepa tipo de *Bacillus butanolivorans* y el aislamiento ILBB15 (99% Bootstrap) y por último un tercer clado con la secuencia de la cepa tipo de *Bacillus muralis* (DSM 16288).

En el Tabla 7. se indica la identificación filogenética del grupo de los aislamientos promisorios (grupo de conglomerado G6 y G7) y los candidatos seleccionados de cada morfotipo de colonia.

Tabla 7. Identificación filogenética del grupo de aislamientos promisorios (grupo de conglomerado G6 y G7) y candidato seleccionado de cada morfotipo de colonia

Grupo conglomerado	Código B	Identificación filogenética	Morfotipo	Código B	Identificación filogenética
6	ILBB64	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1	ILBB71	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	ILBB65	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	2	ILBB20	<i>Bacillus simplex</i>
	ILBB44	<i>Bacillus pumilus</i>	3	ILBB58	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>
	ILBB152	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	4	ILBB21	<i>Bacillus simplex</i>
	ILBB147	<i>Bacillus thuringiensis</i>	5	ILBB149	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>
	ILBB63	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	6	ILBB166	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	ILBB68	<i>Paenibacillus durus</i>	7	ILBB40	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>
	ILBB81	<i>Bacillus marisflavi</i>	8	ILBB172	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>
	ILBB139	<i>Bacillus thuringiensis</i>	9	ILBB44	<i>Bacillus pumilus</i>
	ILBB133	<i>Paenibacillus silvae</i>	10	ILBB162	<i>Bacillus pseudomycoides</i>
	ILBB138	<i>Paenibacillus silvae</i>	11	ILBB154	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>
	ILBB134	<i>Paenibacillus silvae</i>	12	ILBB7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
7	ILBB58	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>	13	ILBB11	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>
	ILBB95	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>	14	ILBB38	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	ILBB172	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>	15	ILBB19	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	ILBB173	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>	16	ILBB181	<i>Bacillus simplex</i>
	ILBB7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	17	ILBB13	<i>Bacillus simplex</i>
	ILBB38	<i>Bacillus thuringiensis</i>	18	ILBB180	<i>Lysinibacillus varians</i>
	ILBB55	<i>Bacillus thuringiensis</i>	19	ILBB15	<i>Bacillus butanolivorans</i>
	ILBB19	<i>Bacillus thuringiensis</i>	20	ILBB46	<i>Bacillus simplex</i>
	ILBB15	<i>Bacillus butanolivorans</i>	21	ILBB69	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>
	ILBB46	<i>Bacillus simplex</i>	22	ILBB68	<i>Paenibacillus durus</i>
	ILBB67	<i>Bacillus simplex</i>	23	ILBB81	<i>Bacillus marisflavi</i>
	ILBB130	<i>Bacillus megaterium/aryabhatai</i>	24	ILBB70	<i>Virigibacillus arenosi</i>
			25	ILBB123	<i>Bacillus anthracis</i>

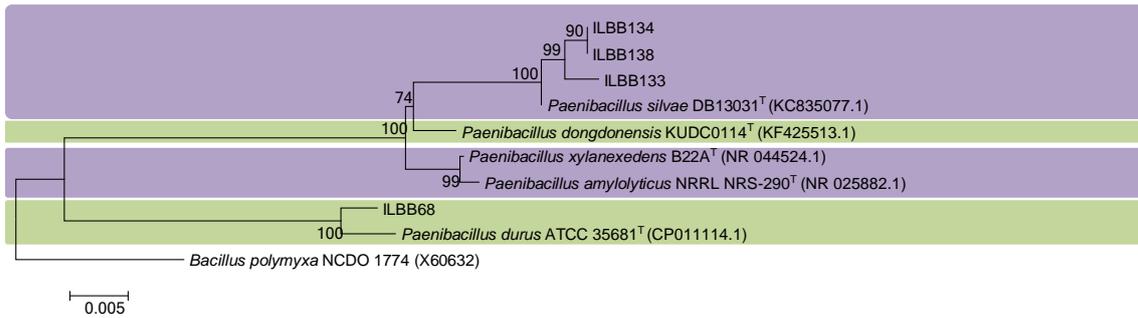


Figura 3. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de nucleótidos del gen *ARNr 16S*. Se incluyeron los aislamientos de interés y especies tipo depositadas en GenBank, las cuales se indican con la letra T. Las secuencias se analizaron por el método de *Neighbour Joining* y la distancia genética fue calculada con el modelo de *Kimura*. Los valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. La barra de escala es el promedio de los nucleótidos diferentes por sitio. Como grupo externo se utilizó *Bacillus polymyxa* NCDO 1774 (X60632).

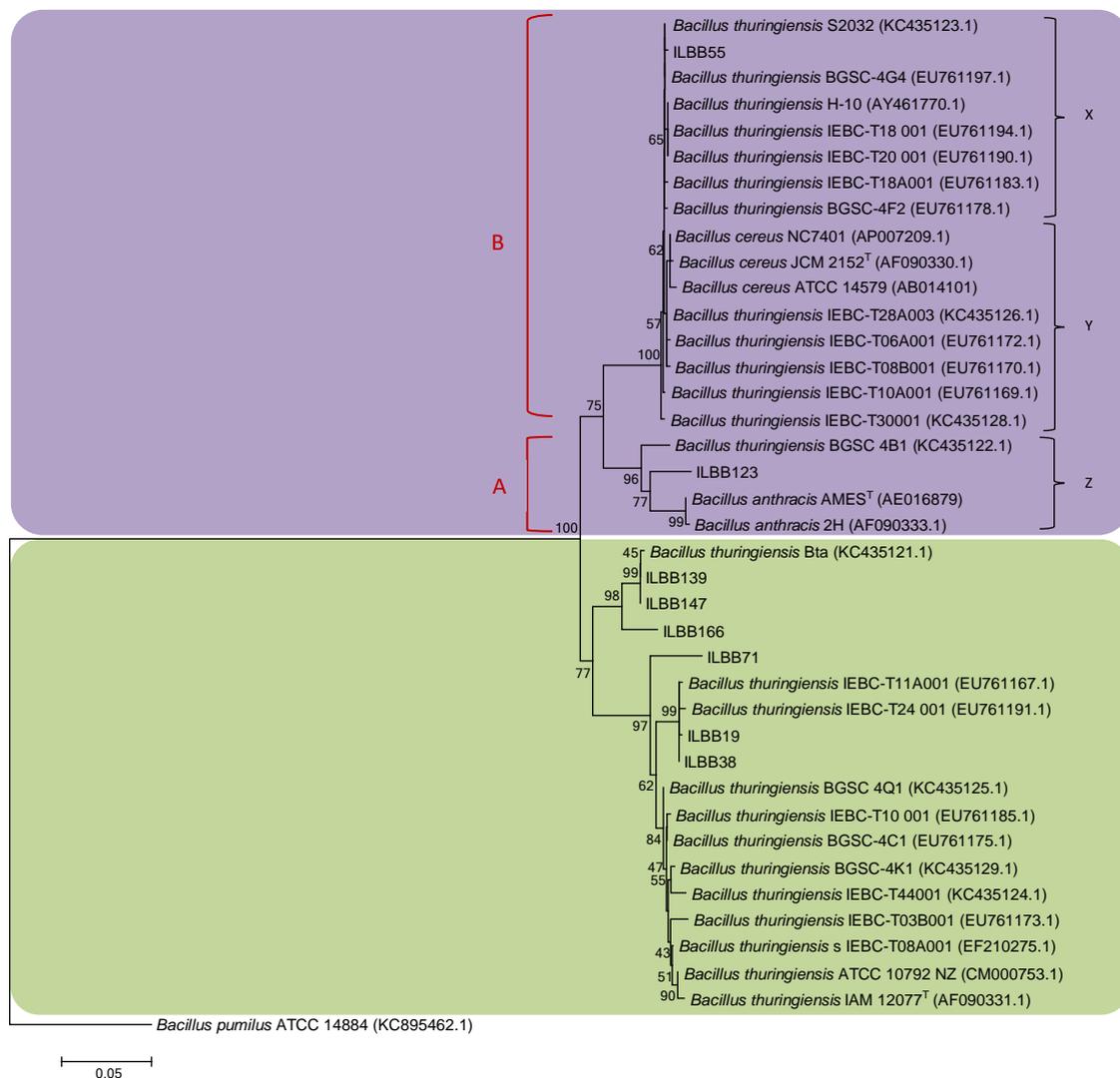


Figura 4. Árbol filogenético del grupo *Bacillus cereus* basado en la secuencia parcial de nucleótidos del gen *gyrB*. Se incluyeron los aislamientos de interés y especies tipo depositadas en GenBank, las cuales se indican con la letra T. Las secuencias se analizaron por el método de *Neighbour Joining* y la distancia genética fue calculada con el modelo de *Kimura*. Los valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. La barra de escala es el promedio de los nucleótidos diferentes por sitio. Como grupo externo se utilizó *Bacillus pumilus* ATCC 14884 (KC895462.1).

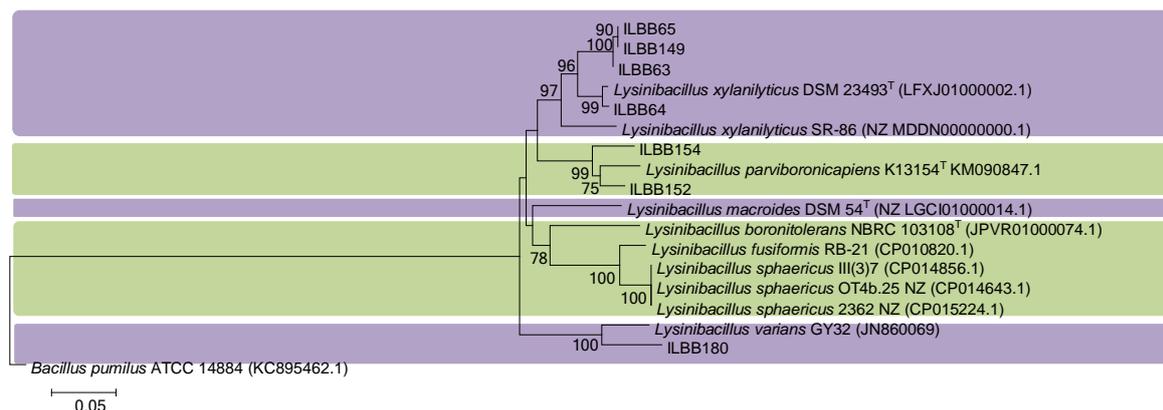


Figura 5. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de nucleótidos del gen *gyrB*. Se incluyeron los aislamientos de interés y especies tipo depositadas en GenBank, las cuales se indican con la letra T. Las secuencias se analizaron por el método de *Neighbour Joining* y la distancia genética fue calculada con el modelo de *Kimura*. Los valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. La barra de escala es el promedio de los nucleótidos diferentes por sitio. Como grupo externo se utilizó *Bacillus pumilus* ATCC 14884 (KC895462.1).

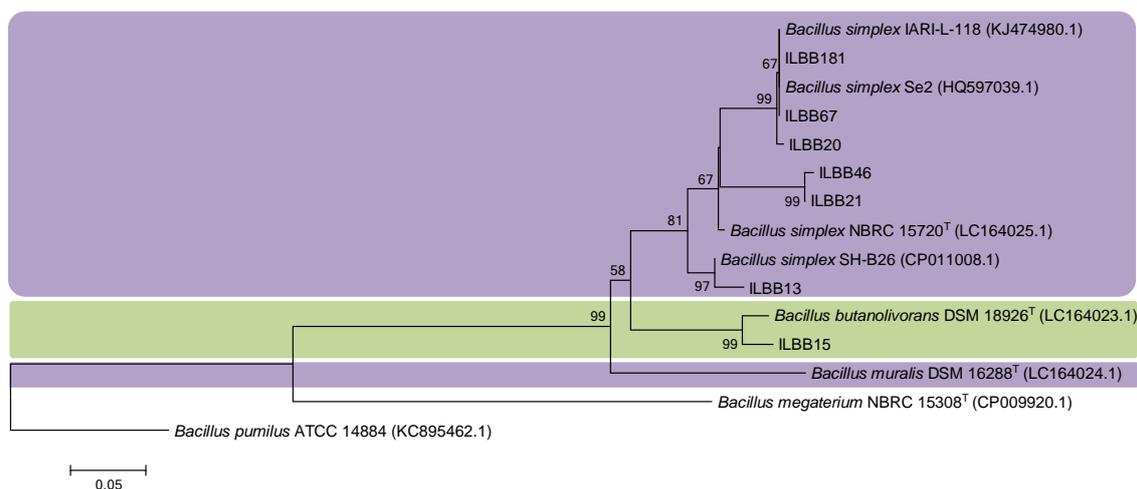


Figura 6. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de nucleótidos del gen *gyrB*. Se incluyeron los aislamientos de interés y especies tipo depositadas en GenBank, las cuales se indican con la letra T. Las secuencias se analizaron por el método de *Neighbour Joining* y la distancia genética fue calculada con el modelo de *Kimura*. Los valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas se muestran en los nodos. La barra de escala es el promedio de los nucleótidos diferentes por sitio. Como grupo externo se utilizó *Bacillus pumilus* ATCC 14884 (KC895462.1).

Tabla 8. Similitud de secuencia parcial de nucleótidos del gen *ARNr 16S*

Aislamiento	gen	Especie	Hit	Similitud (%)	Número acceso
ILBB7	16S	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NBRC15717 ^T	100	NR112569.1
ILBB81	16S	<i>Bacillus marisflavi</i>	TF-11 ^T	98	NR118437.1
ILBB44	16S	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061 ^T	99	AY876289.1
ILBB162	16S	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	DSM 12442 ^T	98	AM747226.1
ILBB70	16S	<i>Virigibacillus arenosi</i>	LMG 22166 ^T	99	AJ627212.1

Para el conjunto de aislamientos sujetos al estudio filogenético se identificaron en total 15 grupos como posibles especies. La secuenciación del genoma completo, estudios de hibridación *in silico* y pruebas bioquímicas confirmarían lo propuesto. No obstante, en el presente manuscrito se las mencionará como especies.

En el grupo de cepas constituido por los candidatos de cada uno de los 25 morfotipos, se encontraron presentes 14 de las 15 especies obtenidas. Por lo que la asignación de morfotipo fue degenerada, al establecer más de un morfotipo a una misma especie. Aquellas especies a las que se les asigna más de un morfotipo son: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus simplex* y el taxa *Bacillus megaterium/aryabhatai*. En parte esto puede atribuirse a las variaciones del morfotipo de colonia de *Bacillus s.l.* con el tiempo de incubación (Julianelle *et al.*, 1928).

En el grupo de cepas seleccionados por el 1^{er} nivel de *screening* se constataron 11 especies de las cuales las más representadas fueron la especie *Bacillus thuringiensis* y el taxa *Bacillus megaterium/aryabhatai*. Por tanto, una alta proporción de las especies recabadas en la colección se mantuvieron presentes dentro del grupo de aislamientos promisorios.

En cambio, los sitios sojeros agrupan con los grupos de conglomerados promisorios (G6 y G7) y con los morfotipos de colonia de mayor frecuencia en la colección (M18 y M20). Sin embargo, la distribución de los distintos sitios sojeros en relación con los niveles de los restantes factores no se encuentra resuelta mediante este análisis. En consecuencia, se efectúa un segundo análisis de correspondencia múltiple sólo para los aislamientos provenientes de los sitios sojeros. Se sustituye el factor morfotipo de colonia por el taxon que cada uno representa en base a lo obtenido en el estudio filogenético. Los siete niveles de este nuevo factor son: *Lysinibacillus* spp., *B. pumilus/B. safensis*, *B. thuringiensis*, *B. marisflavi*, *Paenibacillus* spp., *B. aryabhatai/B. megaterium*, *B. simplex/muralis/B. butanolivorans*. El factor grupo de conglomerado se sustituye por los factores capacidad mineralizadora y solubilizadora (cada uno a los niveles moviliza, no moviliza) (Figura 8).

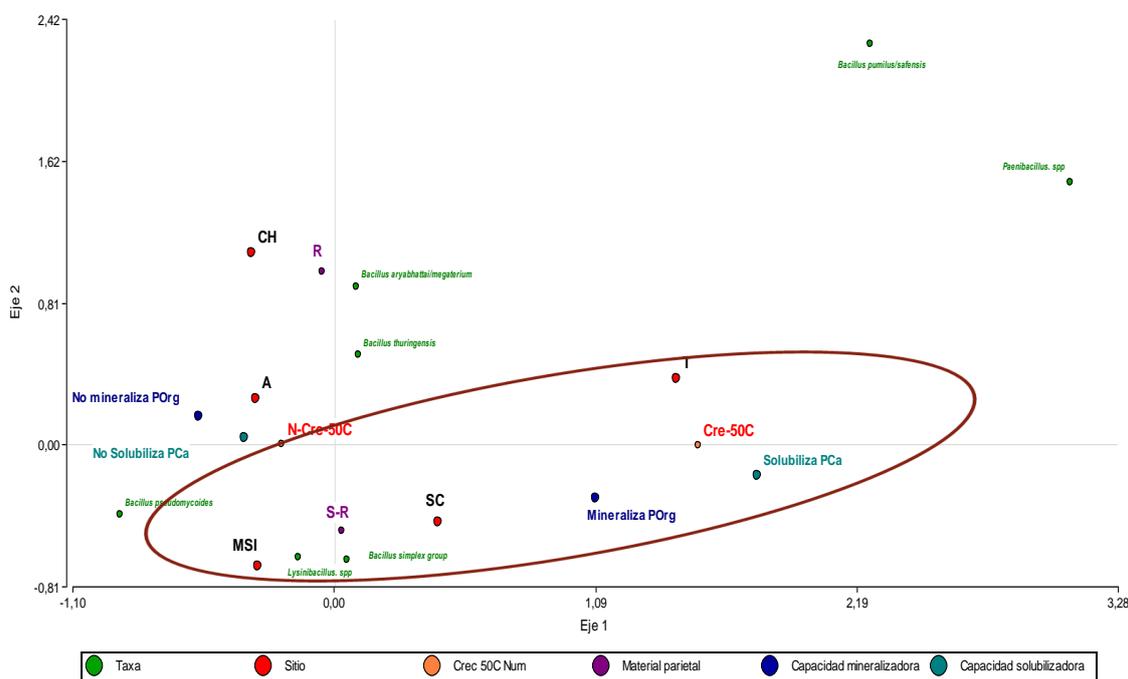


Figura 8. Biplot de un Análisis de Correspondencia Múltiple a partir de aislamientos obtenidos de sitios sojeros, correspondiente al cruce de las variables: sitio de muestreo, grupo taxonómico, material parental [raíz (R) /suelo rizoférico (S-R)], capacidad mineralizadora, capacidad solubilizadora, crecimiento a 50°C.

Este gráfico sugiere la dependencia entre la capacidad de movilizar el fósforo orgánico e inorgánico y crecimiento a 50°C, asociado a los aislamientos provenientes de la rizósfera de los sitios MSI, T, SC pertenecientes a los taxas *Lysinibacillus* spp. y *Bacillus simplex*.

Este análisis exploratorio nos permitió separar sitios sojeros que agrupan con la capacidad funcional de movilizar fósforo y otros que no, surgiendo el interés de evaluar la significancia de este agrupamiento mediante un análisis de inferencia estadística. En función de ello se realizó un análisis de correspondencia canónica (ACC) para los aislamientos obtenidos de la rizósfera de la planta de soja. La matriz explicativa se construyó a partir de los 15 parámetros fisicoquímicos del suelo de cada sitio listados en la Tabla 5. La matriz de observaciones se construyó con la abundancia de aislamientos que: mineralizan el PORG, solubilizan el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, crecen en la triple mezcla de fuentes de fósforo, crecen a 50°C, pertenecen a los taxas *B. thuringiensis*, *Lysinibacillus* spp., *B. simplex*. Solo se trabajó con estos tres taxas por ser de las más representadas en la colección, dada la necesidad de reducir el número de variables de

observaciones para no degenerar el análisis. Las abundancias se expresaron como frecuencia relativa al total de aislamientos obtenidos de la rizósfera de cada sitio. Tras la depuración de las variables explicativas ensayadas (tanto por colinealidad entre ellas o por no ser significativamente explicativa de la matriz de observaciones) se obtiene el siguiente diagrama triplot del ACC que explica el 77.5% de la variabilidad total de la matriz de observaciones (Figura 9).

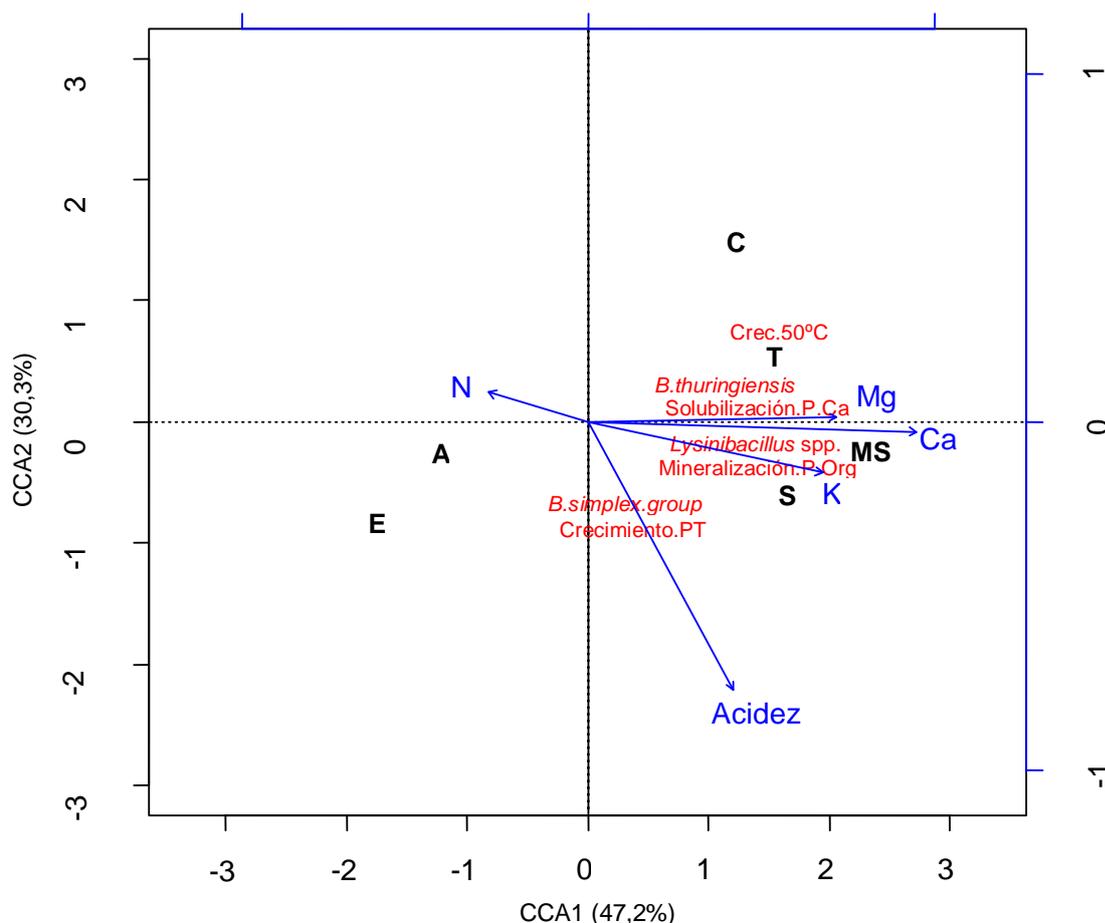


Figura 9. Triplot de Análisis de Correspondencia canónica. Objetos de estudio: Sitios sojeros: Aguila (A), Chaja (CH), Mercedes (MSI), Paraje Ramón Trigo (T), Zona Este (E). Variables cualitativas observaciones son la abundancia de aislamientos de suelo rizóferico que: mineralizan fósforo orgánico, solubilizan fósforo inorgánico, crecimiento en triple mezcla inorgánica, crecimiento a 50°C y pertenecen a los taxos: *Lysinibacillus* spp., *B.thuringiensis*, *B.simplex*.

De las 15 variables ensayadas 5 fueron las significantes, representadas como vectores en la Figura 9. Para el grupo de aislamientos estudiados las cepas que presentaron las capacidades funcionales de interés se encontraron ligadas a los taxos *Lysinibacillus* spp. y *B. thuringiensis*, y no así a *B. simplex* como lo sugería el ACM.

La capacidad de movilizar fósforo presentó una dependencia con los sitios sojeros SC, MSI, T, tal lo indicaba el ACM. Las proyecciones ortogonales de los sitios sobre las variables ambientales explicativas significativas representadas como vectores en el diagrama, caracteriza a estos sitios por presentar niveles medios a altos en el contenido de bases intercambiables y de bajos a

medio en la acidez titulable. Esto es coherente con lo reportado para la abundancia de bacterias solubilizadoras cultivables en suelos arroceros, donde se obtuvo una correlación significativa positiva con el contenido de bases intercambiables (Mg y K) (Kumar *et al.*, 2017).

Es de destacar que los resultados recabados no son extrapolables a inferencias ecológicas, dado el sesgo inherente a la técnica de cultivo mediante la cual puede explorarse menos de 1% de la comunidad microbiana del suelo, pudiendo recurrirse a otras técnicas de mayor cobertura para profundizar en esta hipótesis.

Como segunda perspectiva es de destacar la falta de significancia del fósforo asimilable determinado por las técnicas Bray I, Ácido Cítrico y resina de intercambio catiónico en explicar la variación total de la matriz observaciones. (Jorquera *et al.*, 2011). Una caracterización de estos suelos respecto al contenido de fósforo inorgánico y orgánico por separado, así como la profundización de las distintos componentes de fracción orgánica de fósforo por ³¹P-Espectroscopia de resonancia magnética (P-RMN) (Cade-Menun *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018), puede que ponga de manifiesto otras asociaciones de interés.

3. Caracterización del grupo de cepas promisorias por la capacidad de solubilizar y/o mineralizar fósforo inorgánico y/o orgánico en medio líquido y selección de grupo de interés (2° Nivel de *Screening*).

- 3.1. Cuantificación de actividad solubilizadora de $(\text{FePO}_4:\text{AlPO}_4:\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ y actividad mineralizadora en medio líquido.

La determinación de la actividad movilizadora de diferentes fuentes de fósforo en medio líquido tuvo por objetivos: corroborar la actividad funcional constatada en medio sólido y ordenar el grupo de cepas promisorias por medio de una variable cuantitativa para esta nueva etapa de selección (2^{do} nivel de *screening*).

Entre los factores que influyen en la determinación de la actividad movilizadora en medio líquido y dado la complejidad del fenómeno, deben contemplarse aspectos nutricionales, fisiológicos y de condiciones de cultivo (Behera *et al.*, 2014). Los factores estudiados fueron: generación del inóculo, evaluación del seguimiento del crecimiento del cultivo junto con la movilización de fósforo y selección de técnica analítica de cuantificación del ion ortofosfato en solución.

En la generación del inóculo fue necesario implementar una revitalización de la cepa previo a la inoculación que consistió en sembrar la cepa conservada en glicerol 25% en un medio sólido con la correspondiente fuente de fósforo a ensayar. A partir de este cultivo se generó el inóculo del medio líquido. La eventual pérdida de función se constató sólo para algunas cepas, no obstante se decidió incluir esta etapa de revitalización para la totalidad de las cepas y fuentes de fósforo ensayadas. En el caso de pérdida de la actividad mineralizadora, podría atribuirse a una eventual represión de la síntesis de fitasas cuando el cultivo sólido de partida para la generación del inóculo del medio líquido proviene de un medio rico en nutrientes (Konietzny *et al.*, 2004).

Otro aspecto que se evaluó fue el lavado del inóculo para la eliminación de iones ortofosfato u otras fuentes de fósforo disponibles, dado que la variable respuesta estudiada es la cantidad de ion ortofosfato liberado en relación con el tiempo de incubación. Hay reportes que optan por no lavar el inóculo, desestimando este aporte de fósforo (Nautiyal *et al.*, 1998; Jorquera, *et al.*, 2008). En pruebas intermedias se constató un incremento de la duración de la fase *lag* del cultivo con el lavado, por lo cual se desistió de lavar el inóculo y se efectuó la determinación del ion ortofosfato del medio de cultivo recién inoculado.

El seguimiento del crecimiento del cultivo en forma conjunta con la liberación del ion ortofosfato fue desestimado dado el interés de determinar la actividad microbiana inicial (la actividad fitasa del cultivo inicia en la etapa de transición entre las fases exponencial y estacionaria). La concentración del ion ortofosfato en un cultivo en fase estacionaria tardía es afectada por varios procesos microbianos y no solo por la mineralización (tales como la inmovilización y/o liberación del contenido celular en el ciclado de la biomasa microbiana). Algunos estudios no efectúan el seguimiento de la biomasa del cultivo al efectuar el seguimiento del ion ortofosfato en los menores tiempos de incubación, recurriendo a técnicas de sensibilidad analítica para su cuantificación (Sosanaka *et al.*, 2016). Tao *et al.* (2008) realizaron la determinación de fósforo en el sobrenadante del cultivo y en la biomasa a los tres días de incubación en un medio a base de lecitina de yema de huevo como fuente natural de fósforo orgánico. Para ese tiempo de incubación se constató que la totalidad del fósforo mineralizado es asimilado por el cultivo y la fracción remanente en el sobrenadante se encuentra por debajo del límite de detección de la

técnica analítica. Por lo que en este ensayo se efectuó el seguimiento de la liberación del ion ortofosfato a menores tiempos de incubación.

En la selección de la técnica analítica de cuantificación del ión ortofosfato en solución se contempló que fuese la de mayor sensibilidad analítica entre las distintas metodologías espectrofotométricas. Por ello, en base a un estudio previo se decidió trabajar con la técnica de azul de molibdeno, pese a que el rango dinámico de la misma es significativamente inferior al rango de trabajo teniendo que diluir la muestra previo a su determinación (Apéndice 3.1). La alta concentración inicial de ion ortofosfato proviene del reactivo de fitato de sodio que es elaborado a partir de una fuente natural (arroz).

La actividad mineralizadora y solubilizadora de los controles biológicos C1 y C4 se comportaron de acuerdo a lo esperado y no presentaron diferencias significativas entre las cuatro corridas, lo cual valida la comparación de los resultados obtenidos en diferentes corridas. Los blancos analíticos no presentaron niveles detectables de ion ortofosfato durante las 48h de incubación en ninguna de las corridas.

En la Figura 10. se representa la actividad solubilizadora y mineralizadora para las 24 cepas seleccionadas y los controles biológicos incluidos en cada corrida de análisis, ordenadas en forma decreciente respecto a la actividad mineralizadora, de izquierda a derecha.

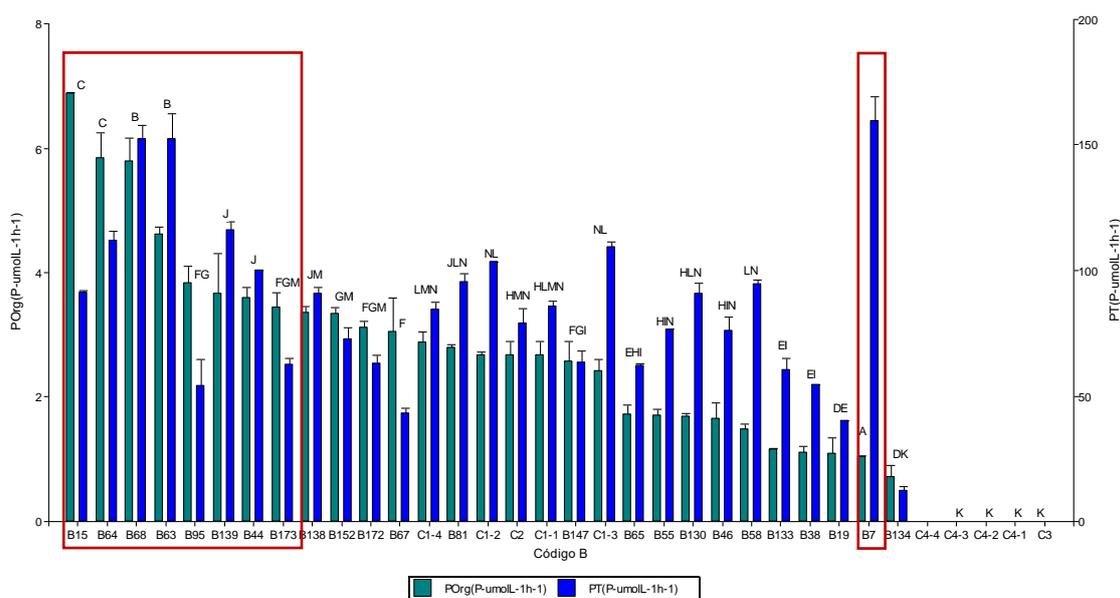


Figura 10. Actividad solubilizadora (PT) y mineralizadora (POrg) de C2, C3 y las cepas pertenecientes al G6 y G7. Actividad solubilizadora (PT) y mineralizadora (POrg) de C1 y C4 en las cuatro corridas también se representan en la figura. Las letras indican diferencia significativa (mediante MANOVA de un factor ($p \leq 0,05$) y comparación de medias mediante Prueba de Hotelling corregido por Bonferroni). Las cepas se ordenan en orden decreciente respecto a la actividad mineralizadora de izquierda a derecha. Se enmarcan en rojo las cepas que fueron preseleccionadas. El sufijo “ILLB” en el nombre de cepa es sustituido por “B” en esta figura.

La totalidad de las cepas presentaron actividad solubilizadora y mineralizadora cuantificables en las condiciones de cultivo ensayadas, corroborando la capacidad constatada en el medio sólido. Si bien solo se obtuvo crecimiento en la triple mezcla de fósforo para el ensayo en placa, cabe destacar que al extender el tiempo de incubación de 6 a 30 días se constató la formación de un halo de solubilización para este grupo de cepas.

Se obtuvo una correlación significativa entre ambas actividades ($\text{corr}=0.65$; $p<0,0001$), por lo que se preseleccionaron las 8 cepas con mayor actividad mineralizadora (ILBB15, ILBB139, ILBB63, ILBB95, ILBB44, ILBB64, ILBB68, ILBB173) y ILBB7 por su buen desempeño como solubilizadora.

La actividad solubilizadora estuvo entre $12-161 \mu\text{mol-Ph}^{-1}\text{L}^{-1}$ para la totalidad de los aislamientos en estudio y para el grupo de cepas seleccionado el rango fue entre $43-161 \mu\text{mol-Ph}^{-1}\text{L}^{-1}$. La actividad mineralizadora fue inferior a la solubilizadora, con valores entre $0,7-6,9 \mu\text{mol-Ph}^{-1}\text{L}^{-1}$ para las 24 cepas y para las 8 cepas seleccionadas (excluyendo la ILBB7) se acotó a $3,4-6,9 \mu\text{mol-Ph}^{-1}\text{L}^{-1}$.

El rango de conversión de la totalidad del fósforo suministrado en el medio fue de $525-4100 \mu\text{mol-PL}^{-1}$ y $22-165 \mu\text{mol-PL}^{-1}$ para las actividades solubilizadoras y mineralizadoras, respectivamente. Estos rangos se encuentran en orden de lo reportado (Tablas 1. y 3.) e inclusive se obtienen valores superiores para la mineralización absoluta.

Se constató una acidificación de ambos medios de cultivo por la totalidad de las cepas, resultados similares a los de Tao et al. (2008). La caída de pH en la triple mezcla de fósforo inorgánico estuvo entre $0,6-3,7$ ordenes de acidez, constatando una correlación positiva significativa con la actividad solubilizadora ($\text{corr}=0.63$; $p<0,0001$). Para el fosfato tricálcico se ha reportado como máximo una reducción del pH de dos órdenes de acidez (Chen *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2014). Varios estudios han encontrado una correlación de la cantidad absoluta solubilizada con la reducción del pH (Tao *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2000).

En el medio con fitato de sodio la acidificación fue superior ($1,3-3,9$ ordenes de acidez) y también presentó una correlación positiva significativa con la actividad mineralizadora ($\text{corr}=0.53$; $p<0,0001$). Tao et al. (2008) no constataron esta correlación.

La reducción del pH constatada en estos ensayos en medio líquido sería de mayor magnitud que lo esperado en el sistema suelo-agua-planta por la presencia de compuestos buffer en la rizósfera (Jorquera *et al.*, 2008).

La producción tanto de protones como ácidos orgánicos son reportadas como las estrategias principales para la solubilización de fuentes de fósforo inorgánico (Behera *et al.*, 2014) e inclusive se han reportado efectos positivos en la mineralización de fósforo orgánico (Patel *et al.*, 2010; Archana *et al.*, 2012). Esto puede atribuirse a que los ácidos orgánicos quelan los iones coordinados con la fuente de fósforo orgánico, dejando biodisponible los sitios de acción de las enzimas hidrolíticas del ion ortofosfato (Mullaney *et al.*, 2007).

Se recurre a un análisis de componentes principales (ACP) para la representación de los datos obtenidos que explica el 84.2% de variabilidad total de los resultados (Figura 11). El gráfico sugiere las correlaciones entre ambas actividades microbianas, y de cada una con su correspondiente reducción de pH. Sin embargo, el segundo componente (CP2) del ACP permitió identificar dos grupos de cepas que presentan una mayor capacidad de acidificar uno u otro medio.

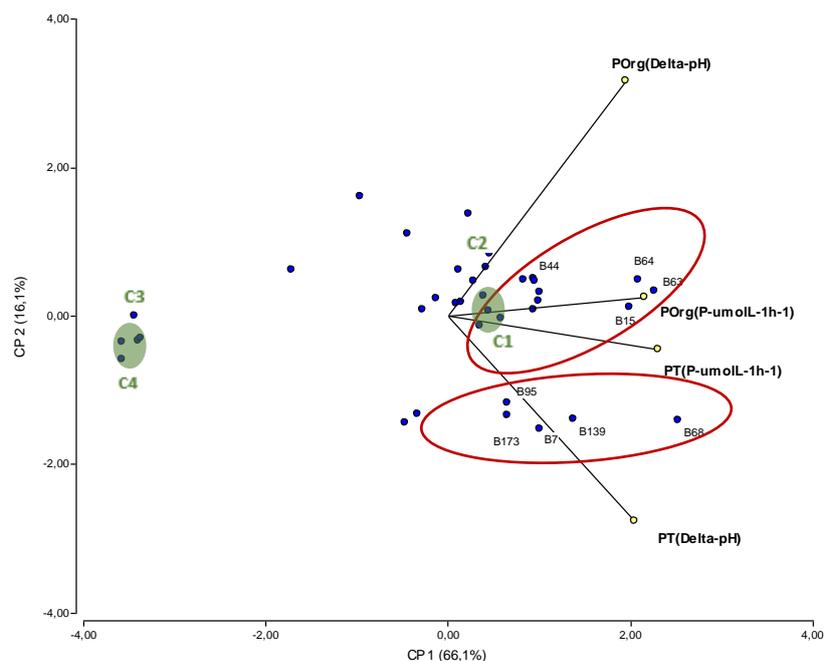


Figura 11. Gráfico Biplot de Análisis de Componentes Principales (ACP) de la actividad solubilizadora (PT) y mineralizadora (POrg), con su correspondiente reducción de pH en ambos medios a las 48 horas de incubación (PT(Delta-pH), POrg(Delta-pH)) de C1, C2, C3, C4 (marcados en verde) y las cepas pertenecientes al G6, G7 (marcados en azul). Se marcan en el gráfico las nueve cepas preseleccionadas. Se enmarcan en rojo dos grupos de cepas que se diferencian en una u otra actividad. El sufijo “ILLB” en el nombre de cepa es sustituido por “B” en esta figura.

A partir de estos resultados surgió el interés de estudiar una eventual correlación entre la identidad de los ácidos orgánicos secretados al medio y las distintas fuentes de fósforo y se pasa a contemplar que la cepa a seleccionar para la mineralización del fósforo orgánico deberá presentar ambas capacidades metabólicas (secreción de ácidos orgánicos y enzimas hidrolíticas) para garantizar el éxito de la estrategia biotecnológica.

Entre las nueve cepas seleccionadas se constataron 7 de las 11 especies del grupo de estudio. Por lo tanto, una alta proporción de las especies de la colección se mantienen representada en esta nueva etapa de *screening*.

4. Caracterización del grupo de cepas seleccionadas (3^{er} Nivel de *Screening*)

4.1. Cuantificación de actividad solubilizadora de FePO₄, AlPO₄, Ca₃(PO₄)₂.

Al haber constatado la actividad solubilizadora del grupo de cepas seleccionadas en la triple mezcla tanto en medio sólido como líquido, surgió el interés de ensayar las tres fuentes de fósforo inorgánico por separado al mismo nivel de fósforo total que el incorporado en los medios PT y POrg (Apéndice 1.2), 708mg-P/L. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 12, ordenados de mayor a menor respecto a la capacidad de solubilizar el FePO₄ y el resto ordenados respecto a la capacidad de solubilizar el AlPO₄.

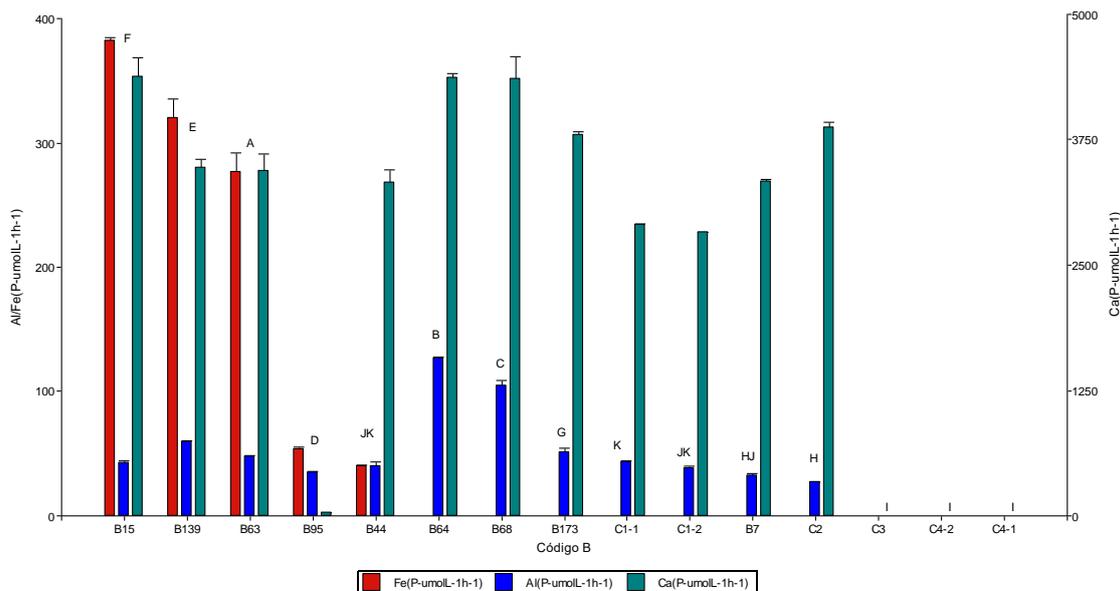


Figura 12. Actividad solubilizadora (PFe, PAI, PCa) de C2, C3 y las cepas promisorias del 3^{er} nivel de *screening*. Las actividades de C1 y C4 de las dos corridas también se representan en la figura. Las letras indican diferencia significativa (mediante MANOVA de un factor ($p < 0,05$) y comparación de medias mediante Prueba de Hotelling corregido por Bonferroni). El sufijo "ILLB" en el nombre de cepa es sustituido por "B" en esta figura.

La capacidad de solubilizar AlPO₄ y Ca₃(PO₄)₂ fue una funcionalidad ubicua entre las nueve cepas de estudio, no obstante, la solubilización del FePO₄ se encontró en cinco de las nueve cepas.

El rango de conversión de la totalidad del fósforo suministrado en los medio PFe, PAI y PCa fue de 523-2275 $\mu\text{mol-PL}^{-1}$, 182-758 $\mu\text{mol-PL}^{-1}$, 31-4604 $\mu\text{mol-PL}^{-1}$, respectivamente. Las conversiones obtenidas para el FePO₄ y Ca₃(PO₄)₂ se encuentran en el orden de lo reportado, en cambio para el AlPO₄ fueron un orden inferior (Tabla 1.). En este estudio se contactó la capacidad de solubilizar fuentes de fósforo inorgánico en miembros de *Bacillus s.l.* de los que no hay reporte previo.

El comportamiento distintivo constatado para la cepa ILBB7 en la actividad solubilizadora en la triple mezcla de fósforo inorgánico no se corroboró en este ensayo. Esto podría atribuirse a un eventual efecto sinérgico de su estrategia de solubilización cuando las tres fuentes de fósforo inorgánico están presentes, la cual no se constata cuando se ensayan por separado. Estudios que profundicen esta hipótesis deben ser llevados a cabo para aseverar esta afirmación.

La capacidad de solubilización de FePO_4 es de interés principal dado que para suelos de Uruguay la fracción de fósforo inorgánico se encuentra principalmente asociada a minerales de Fe como goethita (Hernández *et al.*, 1995).

4.2. Cuantificación de actividad fitasa

La cuantificación de la actividad fitasa tuvo como objetivos: corroborar que la liberación del ion ortofosfato constatado en la determinación de la actividad mineralizadora en medio líquido es atribuible a una actividad enzimática, y confirmar el ordenamiento de cepas obtenido de acuerdo a la funcionalidad metabólica.

En la determinación de la actividad fitasa influyen varios factores. Entre ellos se estudió: la determinación de actividad extracelular y/o total, las condiciones de cultivo de producción de la/s proteínas y la estrategia de concentración del extracto proteico.

Se decidió determinar la actividad fitasa extracelular al considerar que será la actividad potencial que pueda tener un efecto en el sistema agua/suelo/planta. Es de destacar que el género *Bacillus* es uno de los pocos géneros bacterianos con el potencial de producir fitasas extracelulares (Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2001; Idriss *et al.*, 2002; Dechavez *et al.*, 2011; Dan *et al.*, 2015; Rocky-Salani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018a), siendo lo usual que generen fitasas asociadas a la membrana periplásmica (Konietzny *et al.*, 2004).

Para la selección de las condiciones de producción se contempló generar el extracto proteico a partir de un mismo estadio fisiológico de los cultivos. Por ello, se efectuó una curva de crecimiento en medio POrg para cada cepa (Apéndice 4.3) confirmando que a las 48 horas de incubación la totalidad de las cepas alcanzan un estadio transicional a la fase estacionaria de crecimiento en la cual se reporta la inducción de la producción de fitasa ante una limitante energética y/o nutricional de rápida metabolización (enzimas “scavenger”) (Choi *et al.*, 2001; Konietzny *et al.*, 2004)).

En la selección de la estrategia de concentración del extracto proteico se consideró la necesidad de remover el fitato de sodio del medio POrg remanente en el extracto (pese a que se efectuó una cuantificación de contenido de ion ortofosfato al tiempo cero de incubación en la determinación de la actividad enzimática). Como segundo aspecto se buscó neutralizar el pH del extracto proteico dado que el objetivo de este ensayo es cuantificar la mineralización de fitato de sodio exclusivamente por la actividad enzimática y no por la acidificación de medio. En base a esto se decidió utilizar una columna de concentración, la cual presente un nivel de *cutoff* inferior (40-46 kDa) al tamaño reportado para fitasas del *Bacillus* spp. (Choi *et al.*, 2001; Dan *et al.*, 2015; Pay-Roy *et al.*, 2017)).

El ordenamiento del grupo de cepas de estudio depende de la unidad de expresión de la actividad enzimática. El expresar la actividad fitasa como actividad volumétrica, surge la interrogante de si el ordenamiento consecuente pondera aquellas cepas que produzcan mayor cantidad de fitasas o cepas que produzca enzimas con un menor K_m (constante del modelo de *Michaelis-Menten*). En respuesta a ello se estandarizó la actividad fitasa con el contenido total de proteínas presente en el extracto proteico (Actividad específica), sin embargo, no deja de ser una aproximación dado que no se estandariza por el contenido de fitasa exclusivamente.

En el Apéndice 4.8 se adjunta una tabla con la actividad volumétrica y específica determinada para las nueve cepas seleccionadas y los cuatro controles biológicos en estudio.

A partir de dicha tabla se efectuó un análisis de componentes principales (ACP) para la representación de la totalidad de los datos obtenidos, el cual explica el 80.6% de variabilidad total de los resultados (Figura 13).

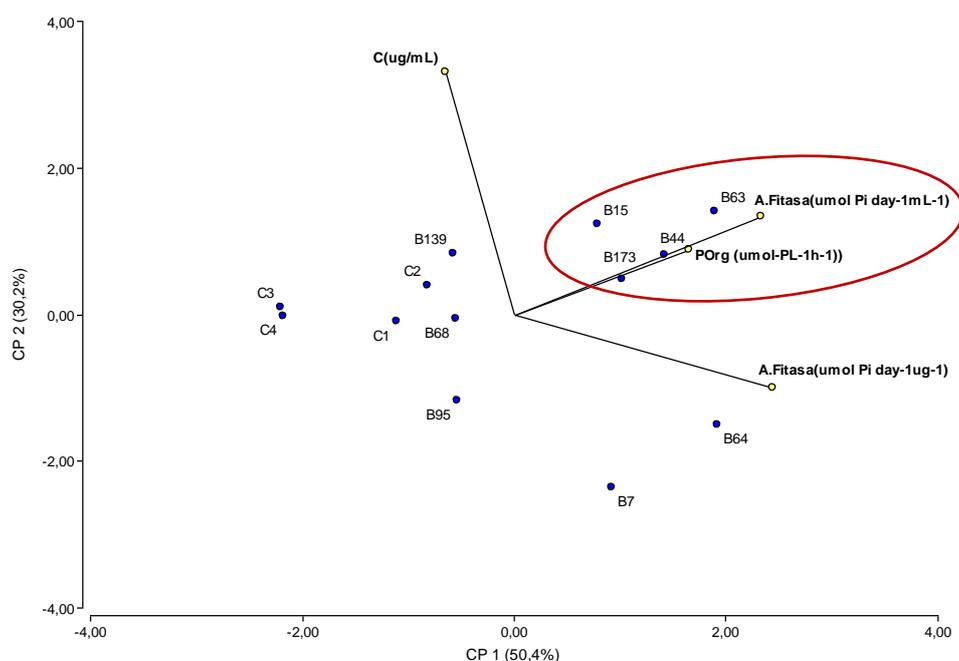


Figura 13. Gráfico Biplot de Análisis de Componentes Principales (ACP) de la actividad mineralizadora (POrg), actividad fitasa volumétrica ($\mu\text{mol-PmL}^{-1}\text{día}^{-1}$), actividad fitasa específica ($\mu\text{mol-P}\mu\text{g}^{-1}\text{día}^{-1}$) y el contenido de proteína total en el extracto concentrado $C(\mu\text{g mL}^{-1})$, de C1, C2, C3, C4 y las nueve cepas pertenecientes. Se enmarcan en rojo el grupo de cepas con mayor desempeño. El sufijo "ILLB" en el nombre de cepa es sustituido por "B" en esta figura.

En las nueve cepas con mayor desempeño en la actividad mineralizadora en medio líquido se constató actividad fitasa extracelular, confirmando la excreción de proteínas hidrolasas como una de las posibles estrategias para la mineralización del fósforo orgánico.

Si bien el rango de conversión de la totalidad del fósforo suministrado se encontró en orden semejantes para la actividad mineralizadora y fitasa ($22\text{-}165 \mu\text{mol-PL}^{-1}$ y $18\text{-}216 \mu\text{mol-PL}^{-1}$, respectivamente), es de contemplar que en el ensayo de determinación de la actividad fitasa la concentración de extracto proteico final es $\times 10$ respecto a la actividad mineralizadora, y la concentración de fitato de sodio es la mitad (estando en exceso en ambos ensayos). Por eso la tasa de conversiones de ambos ensayos no son inter-comparables. Otro aspecto en que se diferencian ambos ensayos es la acidificación constatada en la actividad mineralizadora, la cual no se constata en la determinación de la actividad fitasa al trabajar en un buffer a pH neutro.

Pese a ello, se confirmó una correlación positiva significativa entre la actividad mineralizadora y la actividad fitasa volumétrica a pH neutro ($p \leq 0,01$) y no así con la expresión de la actividad fitasa específica, tal como sugiere la Figura 13.

La actividad fitasa volumétrica constatada para el grupo de mayor desempeño (ILBB15, ILBB173, ILBB44, ILBB63, Figura 13) se encontró en el rango 0,11-0,23 $\mu\text{mol-PmL}^{-1} \text{ día}^{-1}$, con mayores contenidos de proteína en el extracto (393-469 $\mu\text{g mL}^{-1}$) respecto al total de cepas estudiadas.

La inter-comparación de los valores obtenidos con los datos bibliográficos es difícil dada la variedad de opciones ejecutadas en distintos factores que influyen en la determinación de la actividad fitasa (Tabla 4.). A pesar de que se sigue la metodología descrita por Maougal et al. (2014), en ese trabajo no se aislaron *Bacillus* spp. Por ello, la interpretación de estos resultados es la intra-comparación entre las cepas de estudio y su consecuente ordenamiento, el cual fue concordante con el obtenido por la actividad mineralizadora.

4.3. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos (AOs) mayoritarios secretados según la fuente de fósforo

Al constatar la acidificación del medio de cultivo en la movilización *in vitro* de las cuatro fuentes de fósforo ensayadas surgió el interés de evaluar la relación causal entre la identidad y concentración de los ácidos orgánicos no volátiles presentes en el medio con las tasas de movilización constatadas para las cepas caracterizadas en el 3^{er} nivel de *screening*. Para ello se propone efectuar un análisis de regresión entre cada actividad microbiana y el grupo de posibles variables regresoras.

Los ácidos orgánicos de interés a monitorear fueron seleccionados según referencias bibliográficas de ácidos orgánicos secretados: por *Bacillus* spp. ante diferentes fuentes orgánicas e inorgánicas de fósforo (ácidos cítrico, fumárico, succínico, láctico, glucónico (Zhong et al., 2017)), por cepas no necesariamente pertenecientes al género *Bacillus* a las cuales se constató la capacidad de secretar fitasas (ácido acético, pirúvico, glucónico (Sharma et al., 2013; Patel et al., 2010)) y por raíces de 112 genotipos de *Glycine max* ante condiciones deficitarias de fósforo (Ácido succínico, ácido láctico (Krishnapriya et al., 2016)).

La identidad de los ácidos orgánicos a ser secretados por las bacterias al medio está condicionada por la fuente de carbono y energía. Si bien, se ha reportado a los ácidos orgánicos como el principal grupo de compuestos químicos que constituyen los exudados radiculares de plantas de soja en condiciones deficitarias de fósforo (Krishnapriya et al., 2016), la mayoría de los estudios son con glucosa. Cabe destacar que los azúcares representan una fracción inferior de los exudados de radiculares de plantas de soja y la glucosa es el componente mayoritario de este grupo (Yaryura et al., 2008). En la rizósfera también se encuentra una fracción de glucosa que deriva de compuestos celulósicos y hemicelulósicos (Archana et al., 2012), Por eso se decide trabajar con esta fuente de carbono con el fin de obtener resultados comparables con los reportados (Tabla 4.).

En el Apéndice 4.9 se presentarán los resultados obtenidos para cada una de las cuatro fuentes de fósforo, para los cuales a continuación se presenta el análisis y discusión de los mismos.

4.3.1. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con fitato de sodio

La totalidad de las cepas en estudio presentaron la capacidad dual de producción de fitasas y secreción de AOs al medio, tal como ha sido reportado (Sharma et al., 2013). No obstante,

existen *Bacillus* spp. que solo presentan una u otra estrategia (Patel *et al.*, 2010). Ambas capacidades funcionales son de interés dado la inhibición de la hidrólisis enzimática del fitato al estar coordinado con iones metálicos y/o adsorbido a las partículas del suelo, siendo insuficiente un alto nivel de fitasa en la mineralización biológica ante la ausencia de AOs.

Los AOs identificados en las nueve cepas de estudio fueron: ácido glucónico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico y ácido succínico. A excepción del ácido pirúvico existe reportes de secreción de los restantes AOs por *Bacillus* spp. para la mineralización de fósforo orgánico (Tabla 2.). Entre los AOs identificados se encontró aquellos incrementados en los exudados radiculares de la planta de soja ante condiciones deficitarias de fósforo, (ácido succínico y láctico) (Krishnapriya *et al.*, 2016). Estas comparaciones son orientativas dado que no se efectuaron exactamente las mismas condiciones de cultivo.

Del análisis de regresión lineal múltiple para la actividad mineralizadora se obtiene un modelo de regresión con las siguientes bondades de ajuste: ECMP=2.20, R^2_{adj} =0.68 y criterios de información: AIC=92.4, BIC=98.7.

$$A_{miner}(\mu\text{mol } P_i \text{ h}^{-1} L^{-1}) = 14,52 A_{Fitasa}(\mu\text{mol } P_i \text{ h}^{-1} L^{-1}) + 0,68\Delta pH + 0,01 C_{Glucónico} (mM)$$

Se encontró una relación causal entre la actividad mineralizadora con: la actividad fitasa, la acidificación del medio de cultivo y la concentración de ácido glucónico. La actividad fitasa fue la variable regresora de mayor peso. Para los perfiles de AOs dominantes en la concentración del ácido glucónico corresponden una mayor tasa mineralización de P orgánico *in vitro*. La concentración de ácido glucónico en el sobrenadante del medio se encontró entre 13-50 mM, siendo el máximo esperado de 55mM ante una conversión total de la glucosa del medio a ácido glucónico.

Para *Bacillus subtilis* (modelo para el género *Bacillus sensu stricto*) cultivado en condiciones aerobias (8,5g/L de glucosa) ante limitantes de carbono y/o nitrógeno, el catabolismo comprende la vía de Embden-Meyerhof y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Dauner *et al.*, 2001). No obstante, ante condiciones limitantes de fósforo el metabolismo de la glucosa es por la vía de las pentosas fosfato, luego de un primer paso de oxidación directa de la glucosa por la acción de la glucosa-deshidrogenasa. Esta enzima convierte la glucosa en gluconato que luego pasa a gluconato 6-P por la acción de la gluconato-fosfatasa y mediante sucesivas reacciones se genera los intermediarios de la vía gliceraldehído 3-P y fructosa 6-P (Zamboni *et al.*, 2004). La glucosa-deshidrogenasa está anclada en la membrana y el dominio de actividad se enfoca hacia la cara externa de la membrana citoplasmática, secretando el gluconato al medio extracelular (Duine *et al.*, 1991). La oxidación directa de la glucosa es un proceso metabólico mediado por dos electrones y dos protones. Los electrones son transferidos directamente a una ubiquinona presente en la membrana citoplásmica (Goldstein *et al.*, 1993) y los protones se difunden libremente al medio de cultivo. Este puede ser el origen metabólico de la acidificación del medio y producción de ácido glucónico constatados. La fermentación de la fuente de carbono y energía ante condiciones de cultivo limitante en oxígeno también podría explicar la producción de AOs.

4.3.1. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con FePO_4

Cinco de las cepas en estudio presentaron la capacidad de acidificar y secretar AOs al medio, tal como ha sido reportado como estrategia de solubilización del FePO_4 para otras cepas miembro de *Bacillus s.l.* (Tabla 2.).

Los AOs identificados en estas cepas fueron: ácido glucónico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico y ácido succínico. Para esta fuente de fósforo existe reporte de secreción de ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido acético en condiciones de incubación semejantes por la cepa *Bacillus megaterium* P17 (Zhong *et al.*, 2017). Se vuelve a constatar entre los AOs de producción microbiana, a los AOs producidos por la planta de soja ante deficiencia de fósforo asimilable (Krishnapriya *et al.*, 2016).

La concentración de ácido láctico y succínico en el sobrenadante corresponde con lo reportado por Zhong *et al.* (2017), mientras que el ácido cítrico quintuplica lo reportado excepto para la cepa ILBBB44, que presentó una inferior actividad solubilizadora del FePO_4 . Esto sugiere una relación de dependencia del ácido cítrico y la actividad solubilizadora del FePO_4 siendo constatada su significancia mediante el análisis de regresión lineal múltiple. El ácido acético se encontró un orden por debajo de lo reportado, esto puede atribuirse a una pérdida por volatilidad en el procesamiento de las muestras, aunque las condiciones de cultivo tampoco fueron exactamente las mismas a las reportadas.

El modelo de regresión lineal múltiple presentó las siguientes bondades de ajuste: $\text{ECMP}=61.5$, $\text{R}^2_{\text{adj}}=0.75$ y criterios de información: $\text{AIC}=147$, $\text{BIC}=149$.

$$A_{Fe} (\mu\text{mol } P_i \text{ h}^{-1} \text{L}^{-1}) = 226,15 C_{\text{Cítrico}} (\text{mM})$$

Se encontró una relación causal entre la actividad solubilizadora del FePO_4 con la concentración de ácido cítrico como única variable regresora. De modo que los perfiles de AOs dominantes en la concentración de ácido cítrico se corresponden con una mayor tasa solubilización del FePO_4 *in vitro*.

Cabe destacar que si bien se constató la acidificación del medio de cultivo, es coherente que la reducción del pH del cultivo no haya sido una variable regresora significativa de la actividad solubilizadora del FePO_4 . Se reporta una reducción de la concentración de ión ortofosfato con la reducción del pH para la solubilización del FePO_4 y/o minerales de fósforo asociados a este metal (Olsen *et al.*, 1980).

El origen metabólico del ácido cítrico tanto puede provenir de la fermentación de la fuente de carbono y energía como de la respiración de ésta por la vía de Embden-Meyerhof y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

4.3.2. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con AlPO_4

La totalidad de las cepas en estudio presentaron la capacidad de acidificar y secretar AOs al medio, tal como ha sido reportado como estrategia de solubilización del AlPO_4 para otras cepas miembros de *Bacillus s.l.* (Tabla 2.).

Los AOs identificados en estas nueve cepas fueron: ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico y ácido succínico. En presencia de AlPO_4 existe reporte de secreción de: ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido acético en semejantes condiciones de incubación para la cepa *Bacillus megaterium* P17 (Zhong *et al.*, 2017). Se vuelve a constatar al igual que para las dos fuentes de fósforo anteriormente discutidas la presencia de los AOs liberados por la planta de soja como estrategia de incrementar el fósforo disponible.

La concentración de ácido succínico y cítrico en el sobrenadante corresponde con lo reportado por Zhong *et al.* (2017), mientras que la concentración de ácidos acético y láctico se encuentra un orden por debajo de lo reportado. Estas comparaciones son orientativas dado que las condiciones de cultivo no fueron exactamente las mismas.

El modelo de regresión lineal múltiple presento las siguientes bondades de ajuste: $\text{ECMP}=68.1$, $\text{R}^2_{\text{adj}}=0.74$ y criterios de información: $\text{AIC}=118$, $\text{BIC}=120$.

$$A_{Al}(\mu\text{mol } P_i \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}) = 26,85 A_{\text{Succínico}} (\text{mM})$$

Vuelve a encontrarse una relación causal entre la actividad solubilizadora con una única variable regresora. En este caso la misma fue entre la concentración del ácido succínico y la actividad solubilizadora del AlPO_4 .

Al igual que para la solubilización de FePO_4 , la acidificación del medio con AlPO_4 no se asocia a un incremento en la liberación de iones ortofosfato (Olsen *et al.*, 1980), siendo coherente no obtener a la reducción de pH del medio como variable regresora de significancia con la actividad solubilizadora del AlPO_4 .

El origen metabólico del ácido succínico también puede ser asociado a la fermentación de la fuente de carbono y energía o la respiración por la vía Embden-Meyerhof y el ciclo de los ácidos tricarbónicos.

4.3.3. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

La totalidad de las cepas en estudio presentaron la capacidad de acidificar y secretar AOs al medio, tal como ha sido reportado como estrategia de solubilización del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ para otras cepas pertenecientes al grupo *Bacillus s.l.* (Tabla 2.).

Los AOs identificados en estas nueve cepas fueron: ácido pirúvico, ácido láctico, ácido cítrico y ácido succínico. Para esta fuente de fósforo inorgánico existe reporte de secreción de: ácido láctico, ácido succínico y ácido cítrico (Vazquez *et al.*, 2000; Zhoug *et al.*, 2017). Los AOs liberados por la planta de soja ante la deficiencia de fósforo también fueron constatados para el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ al igual que para las tres fuentes de fósforo ya discutidas.

La concentración de ácido succínico y cítrico en el sobrenadante corresponde con lo reportado por Zhoug *et al.* (2017), mientras que la concentración de ácido láctico se encuentra un orden por debajo de lo reportado, al igual que en la solubilización del AlPO_4 .

El modelo de regresión lineal múltiple presento las siguientes bondades de ajuste: $\text{ECMP}=189$, $\text{R}^2_{\text{adj}}=0.90$ y criterios de información: $\text{AIC}=236$, $\text{BIC}=239$.

$$A_{Ca} (\mu\text{mol } P_i \text{ h}^{-1} \text{L}^{-1}) = 2503,11 \Delta\text{pH} + 1132,34 \text{ ShaW}$$

Para esta fuente de fósforo inorgánico se obtuvo una relación causal entre la actividad solubilizadora del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ con la acidificación del medio y el índice de diversidad de Shannon determinado para el perfil de ácidos orgánicos de cada cepa. Siendo los perfiles de AOs con mayor diversidad a los que corresponden una mayor tasa solubilización para el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *in vitro*. Los perfiles de AOs se constituyen sólo de los AOs con capacidad analítica para cuantificar.

Para el caso del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ la relación de la solubilidad de esta fuente de fósforo es inversa a la anteriormente discutida para el FePO_4 y AlPO_4 . Una acidificación del medio se asocia a una solubilización de fuentes de fósforo de calcio (Olsen *et al.*, 1980). En coherencia con ser una de las variables regresoras con mayor peso para modelar la actividad solubilizadora de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

4.3.4. Conclusiones preliminares y perspectivas

Se identificaron y cuantificaron AOs en las cuatro fuentes de fósforo estudiadas en las que se constataron la movilización del fósforo insoluble. Varios de los ácidos identificados para cada fuente de fósforo corresponden con los reportados para otras cepas de *Bacillus s.l.* en semejantes condiciones de cultivo, a concentraciones en torno a lo esperado. Se constataron relaciones causales de significancia para las cuatro fuentes de fósforo con las variables regresoras propuestas. No obstante, es de destacar que estos resultados obtenidos no son extrapolables para otras cepas, género bacteriano, condiciones y diseños de ensayo, o eventualmente en la movilización de fósforo insoluble que pueda tener lugar en el sistema suelo-planta-agua. Sería de interés recurrir a otras capacidades analíticas de otros grupos de compuestos químicos (fenoles, proteínas, azúcares, aminoácidos, proteínas, entre otros) que permita profundizar en el estudio de la respuesta metabólica de estas y otras cepas pertenecientes al grupo *Bacillus s.l.* ante la deficiencia de fósforo, tanto en ensayo *in vitro* como *in vivo*.

4.4. Actividad hemolítica y crecimiento a 37°C en medio sólido

En diferentes cepas del grupo *Bacillus s.l.* se ha reportado la producción de toxinas eméticas y diarreas asignables a la toxina cereulida y enterotoxinas (hemolíticas (Hbl), no hemolíticas (Nhe) y citotoxinas K (CytK)), respectivamente (Arnesen *et al.*, 2008). La actividad hemolítica también es atribuible a las citotoxinas K, pero se diferencia de las restantes en formar el poro transmembrana mediante una única proteína perteneciente a la familia de barril- β , mientras que las otras generan el poro por tres unidades proteicas (B, L1, y L2) que se reportan estar en iguales proporciones cuando la actividad hemolítica tiene lugar (Dietrich *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2005).

Es pertinente efectuar un estudio toxicológico de las cepas de estudio previo a su liberación al ambiente. Si bien en un comienzo se ha asignado a las toxinas Hbl ser el factor de virulencia primario en los casos de intoxicación por cepas pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus sensu lato*, en la actualidad se ha reportado la presencia ubicua de los genes que codifican para Nhe mientras que los genes que codifican para Hbl y CytK se reportan están presentes en menos del 50% en este grupo de cepas (Moravek *et al.*, 2006). Se ha demostrado que estos factores de virulencia se localizan en elementos genéticos de alta movilidad para el grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Lapidus *et al.*, 2007).

Como una primera aproximación a un estudio toxicológico se evaluó la capacidad de producción de enterotoxinas hemolíticas del grupo de cepas seleccionadas, mediante un *screening* en medio sólido (Blood Agar) y posterior confirmación de presencia de Hbl por el inmunoensayo, BCET-RPLA Toxin Detection.

Dada la inestabilidad reportada para las toxinas Hbl (por temperatura y/o actividad proteasa) (Granum *et al.*, 1993), las condiciones y tiempo de incubación son cruciales para no asignar falsos negativos. En base a lo reportado por Fermanian *et al.* (2000) se seleccionaron las condiciones de incubación del *screening* en medio sólido. La elección del tiempo de incubación resulta ser un factor clave dado que el patrón de hemólisis discontinuo puede convertirse en continuo al extenderse el tiempo de incubación, falseando así los resultados. La actividad hemolítica positiva se asigna el patrón de hemólisis discontinuo dado los distintos coeficientes de difusión y diferentes concentraciones emitidas en los distintos estadios de crecimiento de los tres componentes proteicos (B, L1, L2) (Beecher *et al.*, 1994). Por ello, se registraron los resultados obtenidos para cada cepa a distintos tiempos de incubación.

Para la detección de la toxina Hbl por inmunoensayo, las condiciones de producción y conservación del extracto a ensayar se efectuó de acuerdo a lo reportado por Ceuppens *et al.* (2012). Dada la ausencia de reactividad cruzada de los componentes del medio TSB (blanco de medio) y constatando el patrón de aglomeramiento esperado para el control positivo, se registraron los resultados obtenidos (Tabla 9.).

Tabla 9. Actividad hemolítica y crecimiento a 37°C del grupo de cepas de interés

	Act.Hemolítica placa	Detección Hbl ($\geq 2\text{ng/mL}$ cultivo)	Crec 37°C
C4	CS	NO	NO
C3	CS	NO	SI
ILBBB63	CW	NO	SI
ILBBB7	CW	NO	SI
C2	D	SI	SI
ILBBB139	D	SI	SI
ILBBB15	N	NO	NO
ILBBB44	N	NO	NO
ILBBB64	N	NO	NO
ILBBB68	N	NO	NO
ILBBB173	N	NO	SI
ILBBB95	N	NO	SI
C1	N	NO	NO

CS, Patrón de crecimiento continuo fuerte. CW, Patrón de crecimiento continuo débil. D, Patrón de crecimiento discontinuo. N, Ausencia de crecimiento

Las cepas ILBB139, ILBB7 y ILBB63 presentaron actividad hemolítica positiva en placa. La cepa ILBB139 (*Bacillus thuringiensis*), presentó un patrón de crecimiento discontinuo atribuible a la producción de enterotoxinas hemolíticas. Esto se confirmó mediante la detección por el kit (a un nivel mayor a 2ng-Hbl/mL cultivo). Las cepas ILBB7 y ILBB63 presentaron un patrón de crecimiento continuo débil, el cual no es atribuible a la producción de Hbl. Esto también se confirmó por kit con el límite de detección anteriormente mencionado. La actividad hemolítica positiva y producción de enterotoxinas para cepas de *Bacillus thuringiensis* ha sido reportada anteriormente (Damgaard *et al.*, 1995; Perani *et al.*, 1998; Prüss *et al.*, 1999). Hay reportes para cepas de *Bacillus subtilis* de producir citotoxinas (From *et al.*, 2005) y no así Hbl, como si se obtuvo para C2. Es de destacar que no hay reportes de reactividad cruzada entre citotoxinas y Hbl para el kit empleado. Por lo que se debería recurrir a la metodología analítica de referencia (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa) para confirmar el resultado obtenido.

El crecimiento a 37°C se utiliza como indicador de riesgo potencial para la salud humana. Este atributo estuvo ligado a la totalidad de las cepas que presentaron actividad hemolítica positiva (ILBB139 y C2) y algunas en las que no se detectó dicha capacidad.

Habiendo constado la capacidad de producir Hbl dentro del grupo de cepas de interés, se profundizará el estudio toxicológico recurriendo a otras metodologías que evalúen el riesgo de liberación de estos microorganismos al ambiente. Esta etapa será realizada dentro del proyecto en que se inscribe esta tesis por el IP-Montevideo.

D. CONCLUSIONES

La estrategia de aislamiento permitió generar una colección de bacterias formadoras de estructuras de resistencia (*Bacillus s.l.*) de la cual se seleccionaron e identificaron filogenéticamente 9 cepas que fueron capaces de mineralizar y solubilizar fósforo.

Las cepas con la función de interés se obtuvieron principalmente de raíces de plantas de soja y suelo rizosférico, por lo cual se evidenció un posible efecto de selección por parte de la planta de soja hacia bacterias con esta capacidad metabólica.

Si bien se constató la producción de ácidos orgánicos ante fuentes de fósforo orgánica e inorgánica, se comprobó que la actividad mineralizadora de P orgánico se atribuye en parte a la producción de fitasas extracelulares.

Se verificó un desempeño diferencial entre las cepas seleccionadas según su actividad hemolítica, producción de enterotoxinas y crecimiento a 37°C, siendo necesario realizar estudios de toxicidad en mamíferos para descartar algunas cepas o verificar su inocuidad previo a su liberación al ambiente.

El desempeño diferencial *in vitro* obtenido para estas cepas se complementó con estudios *in planta* que no se incluyen en este trabajo. Se estudió la absorción de fósforo en planta de soja co-inoculadas con rizobios y permitió seleccionar a las cepas ILBB592 Y ILBB139, para el ensayo de habilidad industrial que se detalla en el Capítulo 2.

La cepa ILBB592 (Abreo, 2018) se aisló a partir de suelo rizoférico de planta de maíz, y fue incluida en este trabajo como control biológico positivo por su capacidad de movilizar el fósforo *in vitro* (control biológico C2). Si bien en la evaluación *in vitro* presentó un desempeño intermedio, se demostró su habilidad de mejorar la nutrición de P en plantas de soja mediante bioensayos efectuados con anterioridad (Cerecetto, 2018) y en simultáneo a este trabajo.

La cepa ILBB139 presentó crecimiento a 37°C en medio sólido y a la capacidad de producir enterotoxinas hemolíticas. No obstante, dado su desempeño diferencial en los bioensayos en planta fue una de las cepas seleccionadas para la etapa de bioproducción, siendo condicionada su eventual liberación al ambiente al resultado que obtenga en el estudio de toxicidad aguda oral en ratones (OECD Test Guideline 425).

E. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abreo, E., Valle, D., Mujica, V., Altier, N. (2018). Pathogenicity and virulence factors of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Bacillus* spp. towards *Argyrotaenia sphaleropa* larvae (Lepidoptera). *Journal of Applied Entomology*, 1-11.

Acuña, J.J., Jorquera, M.A., Martínez, O.A., Menezes-Blackburn, D., Fernández, M.T., Marschner, P., Greiner, R., Mora, M.L. (2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11 (3), 1-12.

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163 (2), 173-181.

American public health association. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 21th Edition 2005, 4500 – PA, B y E, pp 4-146 - 4-151, 4-153 - 4-155.

Angle, J. S., Mcgrath, S.P., Chaney, F.L. (1991). New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3674-3676.

Archana, G., Buch, A., Naresh-Kumar, G. (2012). Pivotal role of organic acid secretion by rhizobacteria in plant growth promotion. In, Satayanarayan T, Johri BN, Prakash AA *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*. Springer, Heidelberg, 35–53.

Arnesen, L.P.S., Fagerlund, A., Granum, P.E. (2008). From soil to gut, *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32,579–606.

Azziz, G.; Bajsa, N.; Haghjou, T.; Taulé, C.; Valverde, A.; Igual, J. M. & Arias, A. (2011) Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Appl. Soil Ecol* (61),320– 326.

Balzarini, M., Bruno, C., Córdoba, M., Teich, I. (2015). *Herramientas en el Análisis Estadístico Multivariado*. Escuela Virtual Internacional CAVILA. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., Robledo, C.W. (2008). *Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.

Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. *Bacteriological reviews*, 16(1), 1-29.

Bashan, Y., Kamnev, A.A. & de-Bashan, L.E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils*, 49(4), 465–479.

Beecher, D.J., Wong, A.C. (1994). Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Appl Environ Microbiol* 60, 4614–4616.

Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R, Dutta, S.K., Thatoi, H.N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3,97–110.

Beretta, A., Bassahun, D., Torres, D. (2016). Acidez titulable del suelo a pH = 7: al filtrar el extracto y controlar el pH con electrodo. *Agrociencia* 20, 45 – 50.

- Beretta, A., Silbermann, A.V., Paladino, L., Torres, D., Bassahun, D., Musselli, R., García-Lamohte, A. (2014). Soil texture analyses by hydrometer, modifications of the Bouyoucos method. *Ciencia e Investigación Agraria*, 41,263 – 271.
- Borin, S., Daffonchio, D., Sorlini, C., (1997). Single strand conformation polymorphism analysis of PCR-tDNA fingerprinting to address the identification of *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 87– 93.
- Bray, R.H. y Kurtz, L.T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59, 39-45.
- Cade-Menun, B. J. (2017) phosphorus forms in cropland soils with solution ^{31}P -NMR: past studies and future research needs. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4,19-31.
- Cawthray, G.R. (2013). An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. *J Chromatogr A.* 5(1-2),233-240.
- Ceretto, V. (2018) Evaluación de bacterias pertenecientes a colecciones nacionales por su capacidad de actuar sobre la fitodisponibilidad del fósforo: selección, mecanismos involucrados y potencial uso como biofertilizantes en plantas de Soja (*Glycine max*). Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias-Udelar.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Hamelink, S., Van de Wiele, T., Boon, N., Uyttendaele, M. (2012) Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne pathogens and disease.* 9(12), 1130-1136.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34,33–41.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M. (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.*, 20,287-292.
- Chun, Jongsik; Lee, Jae-Hak; Jung, Yoonyoung; Kim, Myungjin; Kim, Seil; Kwon Kim, Byung; Lim, Young-Woon (2007). "EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57 (10), 2259–2261.
- Damgaard, P. (1995). Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12,245–250.
- Dan, S.K., Nandi, A., Banerjee, G., Ghosh, P., Ray, A.K. (2015). Purification and Characterization of Extracellular Phytase from *Bacillus licheniformis* Isolated from Fish Gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 85 (3), 751-758.
- Dauner, M., Storni, T., Sauer, U. (2001). *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J Bacteriol*, 183(24),7308-7317.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.), *Biol. Fertil. Soils* 24 358-364.

- Dechavez, R., Serrano, A., Nuñal, S., Caipang, M.A.C. (2011). Production and characterization of phytase from *Bacillus* spp. as feed additive in aquaculture. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation International Journal of the Bioflux Society*, 4. 394-403.
- Demirkan, E., & Baygın, E., Usta, A. (2014). Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochemistry*. 39, 206–214.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2011). InfoStat, versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dietrich, R., Fella, C., Strich, S., Märtlbauer, E. (1999) Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 65, 4470–4474.
- Duine, J.A. (1991) Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem* 200, 271–284.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretière, M.H., Monthan, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 260: 232–240.
- ESRI 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.
- Farhat A., H. Chouayekh, M. Farhatben, K. Bouchaala, S. Bejar. (2008). Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Mol. Biotechnol.*, 64, 1234-1245.
- Fermanian, C., Wong, A.C.L. (2000). Improved in vitro detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 57,1–8.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazabal, V., Granum, P.E. (2005). Toxin-Producing Ability among *Bacillus* spp. Outside the *Bacillus cereus* Group. *Applied And Environmental Microbiology*, 71(3), 1178–1183.
- Gohar, M., Gilois, N., Graveline, R., Garreau, C., Sanchis, V., Lereclus, D. (2005) A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* 5, 3696–3711.
- Goldstein, A.H., Rogers, R.D. and Mead, G. (1993) Mining by microbes. *Biotechnology* 11, 1250–1254.
- Granum, P.E., Brynestad, S., Osullivan, K., Nissen, K. (1993). Enterotoxin from *Bacillus cereus*: Production and biochemical characterization. *Neth Milk Dairy J* 47,63–70.
- Hernández, J., Otegui, Zamalvide, J. (1995). Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos del Uruguay. Facultad de Agronomía, Montevideo. *Boletín de Investigaciones* N°43. 32p.
- Hill, J.E., Kysela, D., Elimelech, M. (2007). Isolation and assessment of phytate-hydrolysing bacteria from the DelMarVa Peninsula. *Environ Microbiol* 9,3100–3107.
- Howson, S.J., Davis, R.P. (1983). Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Micro Technol* 5,377–382.

- Hung, P.Q., Annapurna, K. (2004). Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). *Omonrice* 12,92–101.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 148(7),2097-109.
- Jackson, M. L. (1964), *Análisis químico de suelos*. Omega, S.A. Barcelona, España, 111-120.
- Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Marschner, P., Greiner, R., Fernandez, M.T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D., Mora, M.L. (2011). Identification of b-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils, *FEMS Microbiol. Ecol.* 75,163-172.
- Jorquera, M.A., Hernández, M.T., Rengel, Z., Marschner, P., Mora, M.L. (2008) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol Fertil Soils* (44),1025–1034.
- Jorquera, M.A., Mora, M.L. *Bacillus*-like Phosphobacteria in Agronomic Volcanic Soils From Chile, 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, 1-6 August, 2010, Brisbane, Australia.
- Julianelle, L.A. (1928). Bacterial variation in cultures of Friedlander's *Bacillus*. *J Exp Med.* 47(6),889-902.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinen, N., Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 2079-2085.
- Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H., Oh, T.-K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microbial Technol.*, 22, 2-7.
- Kimura, M., (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111– 120.
- Konietzny, U., Greiner, R. (2004). Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35,11-18.
- Krishnapriya, V., Pandey, R. (2016). Root exudation index: screening organic acid exudation and phosphorus acquisition efficiency in soybean genotypes. *Crop and Pasture Science* 67, 1096-1109.
- Kumar, A., Rai, L.C. (2017). Soil organic carbon and availability of soil phosphorus regulate abundance of culturable phosphate solubilizing bacteria in paddy fields of the indo-gangetic plain. *Pedosphere*. Manuscript.
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M.A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A.K., Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*), *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29,1361-1369.
- La Duc, M.T., Satomi, M., Agata, N., Venkateswaran, K. (2004). *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J Microbiol Methods*, 56(3),383-94.

- Lane, D.J., Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2),697-703.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S. (2007). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem Biol Interact.*
- Liu, H., Wu, X.Q., Ren, J.H., Ye, J.R. (2011). Isolation and identification of phosphobacteria in popular rhizosphere from different regions of china. *Pedosphere* 21(1), 90–97.
- Liu, J., Cade-Menun, B.J., Yang, J., Hu, Y., Liu, C.W., Tremblay, J., LaForge, K., Schellenberg, M., Hamel, C., Bainard, L.D. (2018). Long-term land use affects phosphorus speciation and the composition of phosphorus cycling genes in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1643.
- Liu, L., Li, A., Chen, J., Su, Y., Li, Y., Ma, S. (2018a). Isolation of a Phytase-Producing Bacterial Strain from Agricultural Soil and its Characterization and Application as an Effective Eco-Friendly Phosphate Solubilizing Bioinoculant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49 (8), 984-994.
- Maougal, R.T., Brauman, A., Plassard, C., Abadie, J., Djekoun, A., Drevon, J. (2014). Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris*) under P deficiency. *European Journal of Soil Biology* (62),8-14.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*, 37(5),634–63.
- Moravek, M., Dietrich, R., Buerk, C., Broussolle, V., Guinebretière, M.H., Granum, P.E., Nguyen-The, C., Märtlbauer, E. (2006) Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett* 257, 293–298.
- Mullaney, E.J., Ullah, A.H.L. (2007). *Inositol phosphates linking agriculture and the environment*, CABI Publishing, Wallingford, 97-110.
- Nautiyal, C.S. (1998). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1;170(1),265-270.
- Olsen, S.R. Khasawneh, F.E. (1980). Use and limitations of physical-chemical criteria for assessing the status of phosphorus in soils. In: Khasawneh, F.E. et al. (eds.) *The Role of Phosphorus in Agriculture*. Madison, Wis. American Society of Agronomy, 361-410.
- Pal-Roy, M., Datta, S., Ghosh, S. (2017). A novel extracellular low-temperature active phytase from *Bacillus aryabhatai* RS1 with potential application in plant growth. *Biotechnology Progress*, 33 (3), 633-641.
- Patel, J.K., Singh, A.K., Nareshkumar, G., Archana, G. (2010). Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Applied Soil Ecology.* 44(3),252-261.
- Perani, M., A. H. Bishop, and A. Vaid. (1998). Prevalence of b-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific d-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160,55–60.
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.

- Prüß, B. M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtlbauer, E., & Scherer, S. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5436–5442.
- Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., Lebsky, V.K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol* 6,629–642.
- Puente, M.E., Li, Y.C., Bashan, Y. (2009). Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany* 66, 389–401.
- Punina, N. V., Zotov, V. S., Parkhomenko, A. L., Parkhomenko, T. U., & Topunov, A. F. (2013). Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from different geo-ecological regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and *gyrB* genes and by AP-PCR and saAFLP. *Acta Naturae*, 5(1), 90–100.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A. (1997). Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can. J. Microbiol.* (43),509-516.
- Rocky-Salimi, K., Hashemi, M., Safari, M., Mousivand, M. (2016). A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46. *Journal of Advanced Research*, 7 (3), 381-390.
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17 (4-5), 319-339.
- Saitou, N., and M. Nei. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* (4),406-425.
- Sandilya, S.P., Bhuyan, P.M., Gogoi, D.K. (2016). Solubilization and plant growth promotion ability of rhizobacteria of *R. communis* L Growing in Assam, India. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*1-8.
- Selvakumar, G., Bindu, G.H., Panneerselvam, P., Ganeshamurthy, A.N. (2016). Potential and Prospects of Aerobic Endospore-Forming Bacteria (AEFB) in Crop Production. In: Islam M., Rahman M., Pandey P., Jha C., Aeron A. (eds) *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, Cham.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2,587, 1-14.
- Soltis, P. S., and D. E. Soltis. (2003). Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science* (18),256-267.
- Suman, A., Yadav, A.N., Verma, P. (2016) Endophytic Microbes in Crops: Diversity and Beneficial Impact for Sustainable Agriculture. In: Singh D., Singh H., Prabha R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. (30),2725-2729.
- Tao, G.C., Tian, S.J., Cai, M.Y., Xie, G.H. (2008). Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere* 18(4), 515–523.

Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils* 30,460–468.

Wang, L, Lee, F., Tai, C., Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (57),1846-1850.

Wright, A.F., Bailey, J.S. (2001). Organic carbon, total carbon, and total nitrogen determinations in soils of variable calcium carbonate contents using a Leco CN-2000 dry combustion analyzer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32,3243-3258.

Yadav, H., Gothwal, R.K., Solanki, P.S., Nehra, S., Sinha-Roy, S., Ghosh, P. (2014) Isolation and characterization of thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from a phosphate mine and their rock phosphate solubilizing abilities. *Geomicrobiology Journal*. Accepted manuscript.

Yamamoto, S., Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* (61), 1104–1109.

Yaryura, P.M., León, M., Correa, O.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., García, A.F. (2008). Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Curr Microbiol*, 56(6),625-32.

Zamboni, N., Fischer, E., Laudert, D., Aymerich, S., Hohmann, H. P., & Sauer, U. (2004). The *Bacillus subtilis* *yqjI* gene encodes the NADP⁺-dependent 6-P-gluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway. *Journal of bacteriology*, 186(14), 4528-34.

Zamuz, E.M., Castro, J.L. (1974) Evaluación de métodos de análisis de suelos para la determinación de fósforo asimilable. *Boletín técnico del Ministerio de Agricultura y Pesca* 15, 1-15.

Zhong, C., Jiang, A., Huang, W., Qi, X., Cao, G. (2017). Studies on the acid-production characteristics of *Bacillus megaterium* strain P17. *Materials Science, Energy Technology, and Power Engineering I*.

BIOPRODUCCION Y FORMULACION DE ESPORAS DE ILBB592

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Optimizar el proceso de producción de las cepas ILBB139 y ILBB592 en fermentador (escala de laboratorio).
- B. Elaborar formulaciones piloto a partir del cultivo de esporas producido, y evaluar la viabilidad de los formulados en el tiempo.

Tabla de Contenidos

A.	INTRODUCCION.....	81
1.	Formulación de medio de cultivo	81
1.1.	Selección de componentes del medio de cultivo a evaluar significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación	81
1.2.	Diseño experimental de selección de factores de significancia	83
1.2.1.	Diseño factorial completo	83
1.2.2.	Diseño factorial fraccionado.....	83
1.3.	Optimización de factores de significancia para cada variable respuesta	84
1.4.	Optimización de múltiples variables respuesta	84
2.	Optimización de condiciones de producción.....	85
2.1.	Modo de operación discontinuo (batch)	85
2.2.	Modo de operación semicontinuo (fedbatch)	87
3.	Formulación de esporas de <i>Bacillus</i> spp.....	89
B.	MATERIALES Y METODOS	90
1.	Optimización de medio de cultivo de las cepas ILBB139 y ILBB592 a escala matraz.....	90
1.1.	Caracterización de extractos proteicos	90
1.2.	Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB139 y ILBB592	90
1.2.1.	Condiciones de cultivo en matraz.....	90
1.2.2.	Diseño experimental selección de factores de significancia	90
1.2.3.	Cuantificación de título y eficiencia de esporulación en medio líquido	90
1.2.4.	Análisis estadístico.....	91
1.3.	Optimización de medios de cultivo	91
1.3.1.	Diseño experimental de optimización de factores para ILBB139	91
1.3.2.	Diseño experimental de optimización de factores para ILBB592	91
1.3.3.	Análisis estadístico.....	92
1.3.4.	Ajuste del modelo	92
1.3.5.	Localización del óptimo	92
1.4.	Verificación de variables respuestas y funcionalidad de interés en el punto óptimo, cálculo de error de predicción e intercomparación con medio clásico	93
2.	Optimización de condiciones de producción para la cepa ILBB592.....	93
2.1.	Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en matraz.....	93
2.1.1.	Condiciones de fermentación.....	93
2.1.2.	Métodos analíticos.....	93
2.1.3.	Cálculo de parámetros descriptivos, cinéticos y estequiométricos del proceso	93

2.2.	Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en biorreactor en modo de operación discontinuo (batch).....	93
2.2.1.	Condiciones de fermentación.....	93
2.2.2.	Métodos analíticos.....	94
2.2.3.	Cálculo de parámetros descriptivos, cinéticos y estequiométricos del proceso .94	
2.2.4.	Verificación de funcionalidad de interés del cultivo de esporas producido	94
2.3.	Estudio de cinética de crecimiento en de la cepa ILBB592 en MEBM en biorreactor en modo de operación semicontinuo (fedbatch)	94
2.3.1.	Determinación de tolerancia máxima a glucosa ILBB592 en MEBM	94
2.3.2.	Descripción y modelado de estrategia de alimentación de glucosa	95
2.3.3.	Condiciones de fermentación.....	95
2.3.4.	Métodos analíticos.....	96
2.3.5.	Cálculo de parámetros descriptivos, cinéticos y estequiométricos del proceso .96	
2.3.6.	Verificación de funcionalidad de interés del cultivo de esporas producido	96
3.	Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas y líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592 producido en un biorreactor de escala de laboratorio	96
3.1.	Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592	96
3.1.1.	Diseño experimental	96
3.1.2.	Metodología	96
3.2.	Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592.	97
3.2.1.	Diseño experimental	97
3.2.2.	Metodología	97
3.3.	Análisis estadístico univariado	97
C.	RESULTADOS Y DISCUSION	98
1.	Optimización de medio de cultivo de las cepas ILBB139 y ILBB592 a escala matraz.....	98
1.1.	Selección y caracterización de materias primas.....	98
1.1.1.	Selección de componentes de medio de cultivo a evaluar	98
1.1.2.	Caracterización de extractos proteicos.....	98
1.2.	Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB139 y ILBB592	99
1.2.1.	Selección de diseño experimental de selección de factores de significancia	99
1.2.2.	Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB139	100
1.2.3.	Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB592	102
1.3.	Optimización de medios de cultivo	103

1.3.1.	Selección de diseño experimental de optimización de factores	103
1.3.2.	Optimización de medio de cultivo para ILBB139	104
1.3.3.	Optimización de medio de cultivo para ILBB592	107
2.	Optimización de condiciones de producción para la cepa ILBB592	110
2.1.	Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en matraz y en biorreactor en modo de operación discontinuo (batch)	110
2.2.	Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en biorreactor en modo de operación semicontinuo (fedbatch).....	114
2.2.1.	Determinación de tolerancia máxima a glucosa ILBB592 en MEBM	114
2.2.2.	Selección de inicio y estrategia de alimentación de glucosa.....	115
2.2.3.	Estudio de cinética microbiana.....	116
2.2.4.	Ajuste de datos experimentales al modelo propuesto	118
2.2.5.	Oportunidades de mejora del proceso en base al modelo obtenido	119
3.	Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas y líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592 producido en un biorreactor de escala de laboratorio	119
3.1.	Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592	119
3.2.	Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592	120
3.3.	Conclusiones y perspectivas en la formulación de esporas	122
D.	CONCLUSIONES.....	122
E.	REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS.....	123

A. INTRODUCCION

1. Formulación del medio de cultivo

1.1. Selección de componentes del medio de cultivo a evaluar significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación

La formulación del medio de cultivo debe asegurar el crecimiento celular, formación de los productos de interés (con los rendimientos y las velocidades requeridos) y suministrar la energía para el mantenimiento celular.

Los requerimientos nutricionales varían considerablemente entre microorganismos y en función del tipo de metabolismo celular a favorecer. Es posible efectuar la distinción entre los nutrientes necesarios en las siguientes categorías de componentes: macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representadas por las fuentes de C, N; micronutrientes, representados por las sales de Fe, Mn, Ca, Zn, entre otros agregados, en cantidades de miligramo por litro; y los factores de crecimiento, que son generalmente componentes orgánicos suministrados en bajas concentraciones, que no se metabolizan ni sintetizan por la célula y son incorporados a estructuras celulares para funciones metabólicas específicas tales como vitaminas, algunos aminoácidos, entre otros.

Si bien a partir del análisis elemental de las células cultivadas sería posible definir la composición del medio de cultivo es necesario contemplar en la formulación: elementos no asimilados en biomasa y liberados al medio como productos, limitaciones cinéticas, requerimientos metabólicos específicos (precursores, inductores), componentes que inhiben el crecimiento celular y la formación del producto.

Mediante la selección del tipo y cantidad de uno o más componentes del medio de cultivo es posible controlar la actividad metabólica. Un medio óptimo sería aquel que: permita un rápido crecimiento microbiano, alto rendimiento de productos, bajos costos (no excesos de componentes), calidad reproducible (disponibilidad y estabilidad de materias primas), que contemple la disponibilidad del nutriente para ser utilizado por la célula (prevenir quelación y/o precipitación de iones metálicos), evite la formación de espuma, no interfiera en la recuperación de producto, no favorezca el crecimiento de contaminantes.

Los *Bacillus s.l.* emplean el sistema de *Quorum Sensing* para dar inicio al proceso de esporulación que ocurre a alta densidad celular en condiciones de estrés, durante la fase estacionaria de un proceso de fermentación (Schleifer *et al.*, 2001). Para la esporulación de especies de *Bacillus s.l.*, se han reportado diversos requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo, particulares de cada cepa para la producción de esporas.

En la Tabla 1. se enumera los componentes de medio de cultivo reportados como significativos para el título y eficiencia de esporulación en ensayos de optimización del medio de cultivo, para tres de los principales taxa del grupo *Bacillus s.l.*

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo de significancia estadística reportada para la esporulación de *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus* spp. y *Bacillus subtilis* en incubación aerobia

	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Lysinibacillus</i> spp.	<i>Bacillus subtilis</i>
Fuentes de carbono	Glucosa (Elsayed <i>et al.</i> , 2014) (Ben Khedher <i>et al.</i> , 2011) (Farrera <i>et al.</i> , 1998) Glicerol (Ben Khedher <i>et al.</i> , 2011)	(-)	Glucosa (Posada-Uribe <i>et al.</i> , 2015)
Fuentes de nitrógeno sintéticas	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Elsayed <i>et al.</i> , 2014) (Liu <i>et al.</i> , 1998)	NH ₄ Cl (Huang, 2016)	Citrato de amonio (Sreekumar <i>et al.</i> , 2010)
Fuentes de nitrógeno complejas	Extracto levadura (Ben Khedher <i>et al.</i> , 2011) Tapioca (Liu <i>et al.</i> , 1998) Harina de soja (Farrera <i>et al.</i> , 1998)	Harina de maíz (Huang, 2016) Harina de soja (Huang, 2016)	Extracto de carne (Posada-Uribe <i>et al.</i> , 2015) Peptona (Sreekumar <i>et al.</i> , 2010) Licor de maíz (Chen <i>et al.</i> , 2010) Harina de soja (Chen <i>et al.</i> , 2010) Extracto de levadura (Chen <i>et al.</i> , 2010)
Sales	KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ (Elsayed <i>et al.</i> , 2014) MnSO ₄ (Ben Khedher <i>et al.</i> , 2011) CaCO ₃ (Liu <i>et al.</i> , 1998)	CaCl ₂ (Huang, 2016)	MgSO ₄ (Posada-Uribe <i>et al.</i> , 2015)

Altos niveles de glucosa reprimen el proceso de esporulación (Schaeffer *et al.*, 1965). Esto se atribuye a la represión de la síntesis de diversas enzimas hidrolíticas extracelulares y las del ciclo de Krebs (Tobisch *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 1997). Las enzimas hidrolíticas extracelulares permiten acceder a otras fuentes de carbono y energía al agotarse las fuentes fácilmente asimilables disponibles. La transcripción de las enzimas del ciclo de Krebs se induce durante la esporulación (Grossman *et al.*, 1995) ya que permiten obtener la energía necesaria y los intermediarios esenciales para la misma (Ireton *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1997).

Las fuentes de nitrógeno sintéticas y complejas se listan en la Tabla 1. como significativas en la esporulación de *Bacillus s.l.* Utilizar componentes sintéticos químicamente definidos asegura la reproducibilidad y control del bioproceso, reduce el riesgo de contaminación por las materias primas empleadas y asegura mayor facilidad de purificación del producto. En cambio, las fuentes complejas no solo aportan los macronutrientes, sino también micronutrientes y factores de crecimiento, que en caso de ser un medio enteramente sintético deben de ser incorporadas por separado impartiendo un costo en el proceso. Sin embargo, las fuentes complejas indefinidas presentan un mayor riesgo de contaminación, de reproducibilidad y control del proceso (fuentes variables, discontinuas).

La relación carbono-nitrógeno (C/N) del medio seleccionado debe ser tal que evite la reducción del pH por fermentación, dado que tiene un efecto negativo en el crecimiento y título de esporas final. Si bien es un parámetro de bioproducción cepa específico, para *Bacillus s.l.* se reporta como óptima la relación C:N de 7,5:1 (Farrera *et al.*, 1998; Dulmage, *et al.*, 1990).

Para la esporulación se encuentra ampliamente reportado el efecto positivo de alta concentración de sales. Elementos como Ca, Mn, Mg, Fe, y Zn (a la concentración adecuada) son

esenciales para este, al ser constituyentes de la membrana de la espora (Hageman *et al.*, 1984). Se ha reportado un efecto significativo de los mismos sobre el tamaño, la morfología, la densidad y la resistencia térmica de las esporas producidas (Xu-Zhou *et al.*, 2017). Sin embargo, altas concentraciones de metales pesados pueden inhibir el crecimiento microbiano de algunas cepas (Cho *et al.*, 2009).

1.2. Diseño experimental de selección de factores de significancia

En un sistema determinado por diversos factores, la influencia de los mismos sobre el sistema puede diferir según se realicen variaciones en un factor o en otro o varios factores a la vez. Por ello, en una primera instancia se evalúa qué factores tienen influencia significativa sobre las variables respuesta en estudio, si los mismos interactúan entre sí y cuáles serán los factores que definen el sistema y serán mantenidos constantes (Teófilo *et al.*, 2006). En una segunda instancia, se debe seleccionar qué diseño experimental se usará contemplando los costos en que se incurrirá, tiempo requerido para la realización del experimento, entre otros aspectos.

Dos diseños a los cuales se puede acudir son, diseño factorial completo y fraccionado.

1.2.1. Diseño factorial completo (2^K)

Un diseño factorial completo estudia todos los factores de interés y todos los efectos de los mismos sobre las variables respuestas. Se entiende por efecto a la variación ocurrida en la respuesta, cuando el o los factores se mueven desde el nivel bajo (-) hacia el nivel alto (+). Los efectos pueden ser clasificados como efectos principales y efectos de interacción o de segundo orden (efecto producto de la interacción de más de un factor). Si se investiga una combinación de K factores en dos niveles (usual en experimentos exploratorios), un diseño factorial implicará la realización de 2^K experimentos (Teófilo *et al.*, 2006).

1.2.2. Diseño factorial fraccionado (2_R^{K-b})

La principal desventaja de un diseño factorial completo es el número de experimentos a realizar. En cambio, el diseño factorial fraccionado contempla que los efectos de alto orden (producto de la interacción de 4 o más factores) son casi siempre no significativos o no son blanco de interés de estudio, por lo que la realización de experimentos para la estimación de los mismos resulta irrelevante. Mediante la correcta selección de que fracción de experimentos ejecutar es posible obtener la información necesaria e equiparable a un diseño factorial completo.

Todo diseño factorial fraccionado se define por el número de factores a estudiar (K) y la magnitud de la fracción (b). El principal criterio que determina qué fracción del diseño factorial completo ejecutar es el nivel de resolución (R). Este parámetro define el orden en el que se confunden los efectos dado el fraccionamiento. En la Tabla 2. se presenta la información de significancia y de confusión que se desprenden de diseños con resolución III, IV, V.

Tabla 2. Información recabada en diseños factoriales de resolución III, IV, V

Resolución	Significancia	Confusión (Alias)
III	Ningún efecto principal se confunde con otro efecto principal.	Los efectos principales se confunden con interacciones de dos factores y estas con otras interacciones de dos factores.
IV	Los efectos principales no se confunden entre factores principales ni con interacciones de dos factores.	las interacciones de dos factores se confunden entre ellas.
V	Los efectos principales no se confunden entre factores principales ni con interacciones de dos factores, las interacciones de dos factores no se confunden entre ellas.	Las interacciones dobles se confunden con las interacciones de tres factores.

Al definir k y R queda definido el generador, la matriz de planificación (en la que se enlistan los tratamientos a efectuar) y la matriz de confusión (en la que se enlistan los alias entre efectos). Los alias se desprenden de emplear la misma combinación de observaciones para estimar los mismos efectos.

1.3. Optimización de factores de significancia para cada variable respuesta

Luego de determinar los factores significativos en el sistema de estudio se procede a la optimización de los mismos. Ello implica encontrar los valores de los factores de estudio de mejor respuesta deseada (máxima, o mínima) en la región de optimización previamente definida, confinada dentro de la región de operabilidad. La metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, (RSM)), es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en la que una respuesta de interés recibe la influencia de diversos factores de carácter cuantitativo (Almeida, 2008).

Para la implementación de esta técnica se diseña un experimento que proporciona valores de la variable respuesta en el entorno de optimización, a partir de los cuales se obtiene un modelo matemático que se ajusta a los datos experimentales recabados.

$$Y = \eta + \varepsilon = f(x_1, x_2, \dots, x_i) + \varepsilon$$

El valor real esperado η se considera que está influenciado por niveles los factores i . Donde ε es el error observado de la variable respuesta Y . De tal forma la relación de $\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_i)$ existente entre η y los niveles de los s i factores puede representarse a través de una hipersuperficie: la superficie de respuesta.

A partir de dicho modelo se localiza el óptimo una vez establecidas las condiciones de optimización prefijas. Por último, la verificación experimental del óptimo arrojado por el modelo debe efectuarse utilizando la combinación de los niveles dados por este. En base al resultado experimental recabado se calcula el error de predicción del modelo obtenido.

1.4. Optimización de múltiples variables respuesta

En el caso que resulte de interés localizar el óptimo incluyendo múltiples variables respuestas (y_i) es necesario partir de un modelo de superficie de respuesta para cada una y a partir de las mismas, y luego encontrar el conjunto de niveles de los factores de estudio que optimice las variables o por lo menos las mantenga dentro del rango deseado.

Un enfoque útil para la optimización de múltiples respuestas es usar la técnica de optimización simultánea (Derringer *et al.*, 1980). Su procedimiento consiste en usar la función con condición

de deseable. Para lo cual se convierte cada modelo de superficie respuesta en la función de condición de deseable individual (d_i) que presenta un codominio entre:

$$0 \leq d_i \leq 1$$

Donde si la respuesta (y_i) está en su meta u objetivo, entonces $d_i = 1$, en cambio si la respuesta está fuera de la región de aceptable $d_i = 0$. Por último, las variables respuesta del sistema se eligen para maximizar la función con condición de deseabilidad global (D)

$$D = (d_1, d_2 \dots d_m)^{1/m}$$

Donde m son el número de variables respuestas a considerar.

2. Optimización de condiciones de producción

2.1. Modo de operación discontinuo (batch)

El cultivo por lotes, discontinuo o batch, es una modalidad de operación por el cual el medio de cultivo esterilizado en el fermentador es inoculado con microorganismos, y los mismos crecen en las condiciones fisicoquímicas adecuadas para el proceso. Las únicas entradas y salidas del sistema son los gases (aire, CO₂, etc) y si es necesario, se agrega antiespumante y ácido o base para control del pH. Se considera que el volumen de medio en el fermentador permanece constante y no deberían ser significativas las variaciones de volumen por el agregado de sustancias o la toma de muestras.

El bioreactor en modo de operación batch es un sistema interactuante entre el medio intra y extracelular (Bailey *et al.*, 1996), donde las células crecen y utilizan los nutrientes y la composición del medio de cultivo va cambiando con el tiempo, lo que puede alterar las reacciones químicas que ocurren en las células. Las reacciones ocurren de manera simultánea, pero son reguladas por controles celulares internos. Estos controles habilitan a la célula a modificar las velocidades de las reacciones de su ruta metabólica y sus capacidades de producción dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales presentes en el medio.

Los procesos discontinuos pueden generar bajos rendimientos cuando el sustrato en altas concentraciones (a tiempo inicial), inhibe, reprime o desvía el metabolismo celular a productos que no **interesan**.

Tabla 3. Comparación de producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus megaterium* en modo de operación batch.

Especie	Ref (*)	Título esporas(ufc/mL)	Biomasa(g/L)	Az(g/L) (*)	Objetivo bioproducir
<i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73)	Farrera <i>et al.</i> , 1998	2.3×10^{10}	NI	40	Bioinsecticida
<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> (H-14)	Elsayed <i>et al.</i> , 2014	1.5×10^8	16	NI	Esporas
<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> (IPS-82)	Boniolo <i>et al.</i> , 2012	3.8×10^9	15	14	Esporas
<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> (HD-1)	Rowe <i>et al.</i> , 2013	NI	5	8	Biomasa
<i>Bacillus thuringiensis var. medellin</i> (163–0131)	Vallejo <i>et al.</i> , 1999	9.0×10^8	8	NI	Esporas
<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> (H-14)	Kraemer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996	3.8×10^9	NI	13	Esporas
<i>Bacillus megaterium</i> (BA-019)	Kanjanachumpol <i>et al.</i> , 2012	NI	32	NI	Biomasa/PHB
<i>Bacillus megaterium</i> (YYBm1)	David <i>et al.</i> , 2011	NI	8	15	Biomasa/Anticuerpo
<i>Bacillus megaterium</i> (BA-019)	Kunraecha <i>et al.</i> , 2011	NI	8	20	Biomasa/PHB

(*) (Ref) Referencia bibliográfica; (Az) Azúcares totales inicio fermentación; (NI), no se informa.

2.2. Modo de operación semicontinuo (fedbatch)

En el cultivo semicontinuo o fedbatch, uno o más nutrientes se adicionan al fermentador durante la operación, de modo de controlar la cantidad disponible de nutrientes en el medio de cultivo. En consecuencia, el volumen del medio varía durante la operación. El flujo de alimentación del medio de cultivo puede ser continuo o intermitente, con una velocidad de adición constante o variable en el tiempo de operación.

La estrategia de alimentación puede ser controlada o no en base a un variable de estado descriptiva del proceso durante el período de operación (*feed-back* ó *feed-forward*, respectivamente). En caso de que la variable control sea la concentración del sustrato en el medio del cultivo sería un fedbatch con retroalimentación de control directo, y de tomar otra variable de estado u operacional que se cuantifique durante el proceso como variable control sería un fedbatch con retroalimentación de control indirecto (pH, CO₂, O₂, coeficiente respiratorio, entre otros).

El inicio y final de la alimentación es otro parámetro fundamental que define el desempeño de este modo de operación.

Si bien la estrategia de operación en fedbatch requiere un mayor control del bioproceso, implica una operación más compleja ejecutada por operarios entrenados para la toma de decisión sobretodo en caso de no disponer de elementos de control automáticos.

No obstante, este modo de operación permite el uso de sustratos que inhiben el crecimiento en altas concentraciones y son limitantes del proceso. A su vez, se emplea en cultivos en que la biomasa presenta altas demanda de oxígeno. Permite obtener un crecimiento microbiano orientado y reducir la formación de productos secundarios indeseados que puede ocurrir ante un exceso de sustrato. De este modo, la alimentación de nutrientes se realiza de modo de que tenga lugar el desarrollo de dos fases: crecimiento y producción. Problemas de alta viscosidad o solubilidad del sustrato también puede sobrellevarse con esta estrategia.

Diferentes estrategias de alimentación han sido implementadas para obtener cultivos de *Bacillus s.l.* de alta densidad celular, tales como: flujo y concentración de sustrato constante (Kang *et al.*, 1993; López-López *et al.*, 2004; Sarrafzadeh *et al.*, 2014), flujo constante y concentración de sustrato creciente en el tiempo en forma lineal (Mignone *et al.*, 1992), flujo intermitente con concentración de sustrato constante (Kanjachumpol *et al.*, 2013), flujo intermitente con concentración de sustrato creciente en el tiempo en forma exponencial (Amin *et al.*, 2008), flujo creciente en el tiempo en forma exponencial y concentración de sustrato constante (Hollmann *et al.*, 2004).

Cada estrategia se encuentra ligada a un objetivo de bioproducción diferente. Para la bioproducción de esporas de *Bacillus s.l.* hay reportes de que la estrategia de alimentación a un flujo intermitente sería superior a la de un flujo constante para una concentración de sustrato dada (Kang *et al.*, 1993; López-López *et al.*, 2004; Kanjanachumpol *et al.*, 2013). Sin embargo, sistemas de producción de esporas de *Bacillus s.l.* con flujo de alimentación constante también se reportan (Mignone *et al.*, 1992; Sarrafzadeh *et al.*, 2014).

Tabla 4. Comparación de producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus megaterium* en modo de operación fedbatch. Caracterización de estrategia de alimentación

Especie	Ref (*)	Titulo esporas (ufc/mL)	Biomasa (g/L)	Estrategia de alimentación				Az(g/L)	Objetivo bioproducir
				F (*)	dF/dt (*)	dS/dt (*)	Control (*)		
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i> (H-14)	Mignone <i>et al.</i> , 1992	NI	16	Constante	Nula	Lineal	Feed-forward	NI	Biomasa
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>kurstaki</i> (H-serotipo)	Amin <i>et al.</i> , 2008	2.3×10^{12}	NI	Intermitente	-	Exponencial	Feed-forward	126	Bioinsecticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>kurstaki</i> (HD-1)	Kang <i>et al.</i> , 1992	4.0×10^9	36	Constante	Nula	Nula	Feed-forward	54	Esporas
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>kurstaki</i> (HD-1)	Kang <i>et al.</i> , 1992	1.3×10^{10}	73	Intermitente	Nula	Nula	Feed-forward	100	Esporas
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-1	Vu <i>et al.</i> , 2010	1.3×10^9	NI	Intermitente	Nula	Nula	Feed-back (OD)	NI	Bioinsecticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>medellin</i> (163–0131)	Vallejo <i>et al.</i> , 1999	9.0×10^8	25	Intermitente	Nula	Nula	Feed-forward	NI	Esporas
<i>Bacillus megaterium</i> (BA-019)	Kanjanachumpol <i>et al.</i> , 2012	NI	76	Constante	-	Exponencial	Feed-forward	325	Biomasa/PHB
<i>Bacillus megaterium</i> (BA-019)	Kanjanachumpol <i>et al.</i> , 2012	NI	90	Intermitente	-	Nula	Feed-forward	660	Biomasa/PHB
<i>Bacillus megaterium</i> (DSMZ 90)	Sabra <i>et al.</i> , 2008	NI	9	Constante	Nula	Nula	Feed-forward	100	Biomasa/PHB
<i>Bacillus megaterium</i> (YYBm1)	David <i>et al.</i> , 2011	NI	8	Intermitente	-	Exponencial	Feed-forward	85	Biomasa/Anticuerpo
<i>Bacillus megaterium</i> (YYBm1)	David <i>et al.</i> , 2011	NI	17	Constante	Nula	Nula	Feed-back (OD)	55	Biomasa/Anticuerpo
<i>Bacillus megaterium</i> (YYBm1)	David <i>et al.</i> , 2011	NI	10	Intermitente	-	Exponencial	Feed-forward	35	Biomasa/Anticuerpo
<i>Bacillus megaterium</i> (BA-019)	Kupreecha <i>et al.</i> , 2011	NI	72	Intermitente	-	-	Feed-back (pH)	NI	Biomasa/PHB

(*) (Ref) Referencia bibliográfica; (F) Flujo: constante, variable, intermitente; (dF/dt) Variación de flujo de alimentación en el tiempo: nula, constante, exponencial, asintótico; (dS/dt) Variación de concentración de sustrato limitante de solución de alimentación: nula, constante, exponencial, asintótico; (Control) Estrategia de control de alimentación: Feed-back, Feed-forward. (Az) Azúcares totales agregada en etapa de alimentación; (NI), no se informa.

3. Formulación de esporas de *Bacillus* spp.

La formulación de un producto microbiano usualmente se constituye de la biomasa de microorganismo de interés e ingredientes que mejoren la supervivencia y eficiencia de la aplicación del producto (Schisler *et al.*, 2004). La estabilización de esporas de *Bacillus* spp. se efectúa tanto en formulaciones sólidas como líquidas, reportándose un mayor desempeño para las formulaciones sólidas (Lumsden *et al.*, 1995).

Hay diferentes estrategias para inhibir reversiblemente la germinación de la spora durante la preservación del formulado. Entre ellas se destaca: la reducción de la actividad de agua (Lumsden *et al.*, 1995), la ausencia de fuentes de carbono y energía y la ausencia de oxígeno (atmósfera controlada) (Guérin *et al.*, 2016).

Para la elaboración de formulaciones sólidas de esporas de *Bacillus* spp. distintos procesos son llevados a cabo. Entre ellos se encuentra:

-impregnación y secado de material inerte inorgánico (talco, vermiculita, bentonita, rocas fosfato, tierra de diatomea, sulfato de calcio) y orgánico (turba, carbón, tapioca) (Fravel *et al.*, 1998; Sorokulova *et al.*, 2008), para la obtención de un polvo o granulado humectante (Bryant *et al.*, 1994).

-concentración y secado por: evaporación (*spray drying*) (Sundaram *et al.*, 1995), ósmosis inversa, ultrafiltración, nanofiltración y centrifugación (Marx *et al.*, 2017). El producto resultante de estos procesos puede ser formulado tal cual, o enriquecido mediante distintos componentes para obtener ya sea un polvo humectante, granulado humectante o formulado líquido de base oleosa.

Entre las principales desventajas asignables a las formulaciones sólidas se han reportado: dificultades de esterilización del soporte sólido inerte, inconsistencia de desempeño agronómico (la actividad microbiana puede ser limitada por bajas tasas de transferencia de oxígeno), incompatibilidad con tecnologías de microirrigación.

La elaboración de formulaciones líquidas de base acuosa es de los procesos de formulación anteriormente mencionados más sencillos. Consiste en la incorporación de distintos estabilizadores al cultivo microbiano resultante de la bioproducción. Las formulaciones líquidas de esporas de *Bacillus* spp. fundamentalmente se basan en esta metodología para la cual se reportan resultados promisorios mediante el agregado de surfactantes que estabilicen el coloide dada la hidrofobicidad de la corteza de la spora (Ramyabharathi *et al.*, 2016; Velineni *et al.*, 2011; Sridhar *et al.*, 2004).

B. MATERIALES Y METODOS

1. Optimización de medio de cultivo de las cepas ILBB139 y ILBB592 a escala matraz

1.1. Caracterización de extractos proteicos

Se seleccionaron distintos extractos proteicos disponibles en el mercado producidos a granel mediante procesos estandarizados, para evaluar su significancia en el título de esporas y en la eficiencia de esporulación de ILBB139 y ILBB592. Extractos de levadura (EP1, EP2 y EP3) y de maíz (EP4) se seleccionaron y caracterizaron por los siguientes parámetros en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas de INIA La Estanzuela: carbono orgánico (C.Org) (Wright *et al.*, 2001), nitrógeno total (N) (Wright *et al.*, 2001), y fósforo total (P) (Silva *et al.*, 2009). El análisis se efectuó sin réplicas analíticas sobre una única muestra.

1.2. Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación

1.2.1. Condiciones de cultivo en matraz

Los aislamientos fueron crecidos en 15mL LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). El inóculo fue lavado con solución salina (NaCl 0.85% en agua Mili-Q) con el fin de no modificar el medio a ensayar. Un volumen de 1mL de cada cepa fue sembrado hasta alcanzar una carga bacteriana inicial en el matraz de 1×10^6 ufc/mL. Los medios ensayados se informan en la matriz de diseño del Apéndice 4.10.1. En la totalidad de los experimentos se incorporó 1mL/matraz de solución stock de sales (Apéndice 2.3). Se trabajó en condiciones de incubación aerobias (10mL de medio en matraces de 125mL, 180rpm (Incubator Shaker ES-60)) a 28°C durante 48 horas.

1.2.2. Diseño experimental selección de factores de significancia

Se trabajó con la mayor cantidad de factores que la capacidad analítica y logística del laboratorio permitió de modo de no condicionar la viabilidad de ejecución de los ensayos. Este criterio se adoptó en base en el principio de Pareto, que postula que solo unos pocos factores son los responsables de los cambios significativos en la respuesta.

Los componentes del medio de cultivo seleccionados para la evaluación de su significancia en las variables respuestas de estudio se efectuaron en base a lo reportado y a la disponibilidad de las materias primas en el mercado. Los factores ensayados fueron: glucosa (Glu), extractos proteicos (EP1, EP2 EP3 y EP4), NH_4SO_4 (N), KH_2PO_4 (P), MgCl_2 (Mg) y MnSO_4 (Mn).

Un diseño factorial fraccionado 2^{9-3} de resolución IV, a dos niveles, en dos bloques fue empleado para determinar cuáles de los nueve factores preseleccionados tienen un efecto significativo sobre el título de esporas y eficiencia de esporulación de ILBB592 y ILBB139 cultivados en matraz según el inciso 1.2.1. En el Apéndice 4.10.2 se ilustra la tabla de niveles de factores utilizado para ambas cepas.

1.2.3. Cuantificación de título de esporas y eficiencia de esporulación en medio líquido

La determinación del número de células viables totales (células vegetativas y esporas) y de esporas por unidad de volumen se efectuó por la técnica de recuento en placa por microgota (Naghili *et al.*, 2013). Para la determinación del número de esporas por unidad de volumen una alícuota del cultivo se incubó a 80°C durante 10 minutos (shock térmico, (Apéndice 4.7)) previo a la determinación de la carga bacteriana por la técnica de recuento en placa por microgota.

La técnica de recuento en placa por microgota consistió en efectuar diluciones seriadas (de base 10) de una alícuota del caldo con shock térmico y otra alícuota sin shock térmico para cada cultivo. Las diluciones 10^{-1} hasta la dilución 10^{-10} se efectuaron en placa de Elisa de 96 pozos con

pipeta multicanal. 10 μ L de las diluciones 10⁻² hasta la dilución 10⁻⁹ se sembraron en LB-Agar. Luego que las gotas son absorbidas al medio se incubaron las placas a 28°C durante 16 horas. Se contó el número de colonias presentes en la dilución contable ((3-30) colonias) y se calculó el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de cultivo (ufc/mL).

La eficiencia de esporulación se determinó como la relación de esporas (recuento de cultivo con shock térmico) respecto al total de células viables (recuento de cultivo sin shock térmico).

1.2.4. Análisis estadístico

El software estadístico *Design Expert*® 7.0.0 (State-Ease, Inc., Minneapolis, USA) fue utilizado para efectuar el diseño experimental, análisis de regresión lineal múltiple y análisis gráficos de los datos obtenidos. La evaluación de la significancia de los efectos de los factores se efectuó por opciones gráficas (diagrama de Pareto-método de Bonferroni, gráfico de Daniel-test Shapiro Wilk) y mediante métodos paramétricos (Análisis de la varianza (ANOVA)) con un nivel de confianza del 95%, tras la verificación de los supuestos de independencia de datos, homocedasticidad de varianza y distribución normal. Dado que las variables respuestas título de esporas y eficiencia de esporulación son de conteo o de proporción de conteo con distribución de *Poisson*, se efectuó las transformaciones del $\log_{10}X$ y $\sqrt{X + 1}$, respectivamente para el cumplimiento de los supuestos del ANOVA.

1.3. Optimización de medios de cultivo

Las condiciones de cultivo en matraz y la determinación de las variables respuestas a optimizar se efectuaron tal como se describe en los incisos 1.2.1 y 1.2.3, respectivamente.

1.3.1. Diseño experimental de optimización de factores para ILBB139

Los factores optimizados fueron la concentración de glucosa, EP3 y MnSO₄. Los factores no significativos NH₄SO₄, KH₂PO₄ y MgCl₂ pasan a incorporarse al nivel medio respecto al trabajado en el ensayo de selección de factores (1.5g/L, 3.0g/L y 0.6g/L, respectivamente).

Para el factor EP3 se efectuó un ensayo previo de definición de zona de optimización, bajo un diseño de un factor a seis niveles (0g/L, 5.0g/L, 10 g/L, 15 g/L, 25 g/L, 50 g/L, 100 g/L) por duplicado. Glucosa y MnSO₄ no se incorporan al medio de cultivo en este ensayo.

El diseño experimental de optimización realizado fue un central compuesto (CCD) factorial a dos niveles, aumentado con punto central y axial para el ajuste de un modelo cuadrático (2^{3+star}). Los puntos axiales se calcularon con un $\alpha=1.41$ para obtener un diseño rotatable, y el punto central efectuado por triplicado en cada experimento. El experimento fue independientemente efectuado por duplicado. Sobre el promedio de las réplicas independientes se efectuó el análisis estadístico correspondiente. En el Apéndice 4.11 se informa la matriz de diseño y la tabla de niveles de factores utilizada.

1.3.2. Diseño experimental de optimización de factores para ILBB592

Los factores optimizados fueron la concentración de EP2 y MnSO₄. Los factores no significativos glucosa, NH₄SO₄, KH₂PO₄ y MgCl₂ pasan a incorporarse al nivel medio respecto al trabajado en el ensayo de selección de factores (5.0g/L, 1.5g/L, 3.0g/L y 0.6g/L, respectivamente).

Para el factor EP2 se efectuó un ensayo previo de definición de zona de optimización, bajo un diseño de un factor a seis niveles (5.0g/L, 10 g/L, 15 g/L, 25 g/L, 50 g/L, 100 g/L) por duplicado. MnSO₄ no se incorporan al medio de cultivo en este ensayo.

El diseño experimental de optimización realizado fue un central compuesto (CCD) factorial a dos niveles, aumentado con punto central y axial para el ajuste de un modelo cuadrático (2^{2+star}). Los

puntos axiales se calcularon con un $\alpha=1.41$ para obtener un diseño rotatable, y el punto central efectuado por triplicado en cada experimento. El experimento fue independientemente efectuado por duplicado. Sobre el promedio de las réplicas independientes se efectuó el análisis estadístico correspondiente. En el Apéndice 4.12 se informa la matriz de diseño y la tabla de niveles de factores utilizada.

1.3.3. Análisis estadístico

1.3.3.1. Ajuste del modelo

Se analizó el ajuste de los diseños experimentales ejecutados para cada cepa con un modelo polinómico de segundo orden (Ecuación 1) por la metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, (RSM)).

$$y(x_i) = b_o + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde $y(x_i)$ y x_i representa cada variable respuesta, e independiente respectivamente; b_o , b_i , b_{ii} , b_{ij} corresponden a los coeficientes de interacción, efecto lineal, efecto cuadrático y efecto de interacción, respectivamente; y ε representa el error aleatorio del modelo. La depuración de que términos del polinomio a ser incluidos en cada modelo se efectuó de acuerdo con la técnica de eliminación *backward* evaluando la significancia de cada termino y el cumplimiento de los principios de parsimonia y jerárquico. El modelo seleccionado final para cada variable respuesta para cada cepa fue aquel que tuvo: mayor idoneidad del modelo (mayor F_o de regresión), mayor R^2_{aj} y menor falta de ajuste (*Lack of Fit* (LOF)), tal cual lo calculó el software estadístico *Design Expert*® 7.0.0 (State-Ease, Inc., Minneapolis, USA).

1.3.3.2. Localización del óptimo

La respuesta predicha por el modelo de segundo orden ajustado para cada variable respuesta de estudio, es empleada para generar una función de deseabilidad parcial (d_i) (Ecuación 2).

$$d_{i(y(x_i))} = \begin{cases} 0, & y(x_i) < L_i \\ \left(\frac{y(x_i)-L_i}{U_i-L_i}\right)^s & L_i \leq y(x_i) \leq U_i \\ 1, & y(x_i) \geq U_i \end{cases} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde $y(x_i)$ es la respuesta predicha con el modelo ajustado (Ecuación 1), L_i y U_i son los valores de la respuesta más alto y bajo obtenidos en el ensayo de optimización, respectivamente; y s es el valor de ponderación de la variable respuesta en la optimización múltiple (s igual a la unidad fue utilizado para ambas variables respuestas). Con d_i definido para cada variable respuesta, se combinan en una función de deseabilidad global (D) para cada cepa las dos variables respuesta de estudio (Ecuación 3).

$$D = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum_{i=1}^n r_i}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde n es el número de variables y r_i es la importancia asignada a cada respuesta en la optimización múltiple (r_i igual a la unidad fue utilizado para ambas variables respuestas).

1.3.4. Verificación de variables respuestas y funcionalidad de interés en el punto óptimo, cálculo de error de predicción e intercomparación con medio clásico

Se verifican los medios de cultivo óptimos predichos para las cepas ILBB139 y ILBB592 (*Medio Esporulación Bacillus thuringiensis* (MEBT) y *Medio Esporulación Bacillus thuringiensis* (MEBM), respectivamente) determinando por triplicado el título y la eficiencia de esporulación (inciso 1.2.3), en las condiciones de producción descritas en el inciso 1.2.1. El cálculo del error de predicción de cada variable respuesta para cada cepa se efectuó según Apéndice 5.

En el punto óptimo se verifica nuevamente la capacidad funcional de mineralizar el fitato de sodio en placa para cada cepa según el inciso 2.1 de Materiales y Métodos del Capítulo 1. Se incluyendo una etapa previa de germinación de spora para constatar la capacidad metabólica de interés (1mL del cultivo esporulado se siembra en 15mL de LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C)).

Se efectuó un ensayo de intercomparación del medio optimizado obtenido para cada cepa con el medio clásico de esporulación de *Bacillus s.l.* (2SG, Leighton, 1971) (Apéndice 1.1.3), en las condiciones de producción descritas en el inciso 1.2.1.

2. Optimización de condiciones de producción para la cepa ILBB592

2.1. Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en matraz

2.1.1. Condiciones de fermentación

La cepa ILBB592 fue crecida en 15mL LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). Un volumen de 1mL del cultivo se inoculó por matraz alcanzando una carga bacteriana inicial de 1×10^6 ufc/mL. Se trabajó en condiciones de incubación aerobias (10mL del medio MEBM en matraces de 125mL, 180rpm (Incubator Shaker ES-60)) a 28°C durante 48 horas.

2.1.2. Métodos analíticos

Para el seguimiento del proceso a lo largo del tiempo se determinaron las siguientes variables de estado: biomasa (turbidimetría (600nm) y correlación con peso seco) (Apéndice 4.14), azúcares reductores en solución (Apéndice 3.3), título de esporas, eficiencia de esporulación (inciso 1.2.3) e inspección de pureza y/o estadio celular del cultivo por microscopía óptica con contraste de fases. Se aplicó la técnica de cancelación de matraz y se efectuaron dos réplicas biológicas a cada tiempo.

2.1.3. Cálculo de parámetros descriptivos, cinéticos y estequiométricos del proceso

Los parámetros descriptivos del proceso determinados fueron: duración de fase lag (T_{lag}), duración de fase exponencial (T_{exp}), concentración de biomasa final (X_{final}), conversión de azúcares reductores máxima ($X_{Smáx}$); los parámetros cinéticos fueron: productividad volumétrica máxima de biomasa ($Q_{Xmáx}$), velocidad máxima de consumo de azúcares reductores ($Q_{Smáx}$), velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{máx}$), velocidad específica máxima de consumo de azúcares ($q_{Smáx}$) y el parámetro estequiométrico fue el coeficiente de rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$). El cálculo de los mismos se detalla en el Apéndice 6.

2.2. Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en biorreactor en modo de operación discontinuo (batch)

2.2.1. Condiciones de fermentación

Un fermentador Bioflo Celligen 310 equipado con cuatro baffles y dos turbinas Rushton de 6 paletas, de 5L de volumen útil, fue empleado en modo de operación discontinuo.

Para generar el inóculo del biorreactor, la cepa ILBB592 fue crecida en 15mL LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). Un volumen de 1mL de este cultivo se inóculo en 15mL de MEBM (matraces de 125mL, 180rpm (Incubator Shaker ES-60), 16 horas, 28°C). El biorreactor se inoculó con 20mL (al 1%) del cultivo anteriormente descrito a 2L de MEBM, alcanzando una carga bacteriana inicial de 1×10^6 ufc/mL (biomasa inicial 0,5g/L).

Las variables operacionales temperatura, porcentaje de oxígeno disuelto (OD) se mantuvieron constantes durante la totalidad de la corrida a 28°C y 20%, respectivamente. El OD del medio se mantuvo constante mediante regulación automática de la agitación y la aireación a través del algoritmo de control PID (*Proportional–Integral–Derivative controller*) y la cascada de eventos detalla en el Apéndice 8. El pH se monitoreó durante la corrida y se toma como variable de estado para describir el estadio fisiológico del cultivo. El agregado de antiespumante no fue necesario durante las 48 horas que se monitoreo el proceso.

2.2.2. Métodos analíticos

Las variables de estado determinadas durante el proceso son las enlistadas en el inciso 2.1.2, determinando la totalidad de las mismas por duplicado a cada tiempo de muestreo. Se efectuaron dos réplicas genuinas del proceso.

2.2.3. Cálculo de parámetros descriptivos, cinéticos y estequiométricos del proceso

Los parámetros del proceso calculados fueron los mencionados en el inciso 2.1.3, para cada réplica genuina.

2.2.4. Verificación de funcionalidad de interés del cultivo de esporas producido

A partir del cultivo esporulado se siembra un 1mL del cultivo en 15mL de LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). A partir de este inóculo se constata la capacidad funcional de mineralizar el fitato de sodio en medio sólido según el inciso 2.1 de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

2.3. Estudio de cinética de crecimiento de la cepa ILBB592 en MEBM en biorreactor en modo de operación semicontinuo (fedbatch)

2.3.1. Determinación de tolerancia máxima a glucosa para la cepa ILBB592 en MEBM

La tolerancia máxima de la cepa ILBB592 a glucosa se determinó bajo las condiciones de cultivo detalladas en el inciso 1.2.1, en el medio MEBM (Apéndice 1.3.2). Los niveles de glucosa evaluados fueron: 5, 10, 15, 25, 50 y 150 g/L. Las variables respuestas determinadas por duplicado biológico a las 48 horas de incubación fueron: título de esporas y eficiencia de esporulación (inciso 1.2.3), pH del medio, y concentración de azúcares reductores remanentes. La concentración de azúcares reductores se determinó según el inciso 3.3 del Apéndice. La conversión de azúcares reductores se calculó como el porcentaje de la cantidad de azúcares reductores consumido (cantidad inicial menos final) con relación a la cantidad inicial de azúcares reductores.

2.3.2. Descripción y modelado de estrategia de alimentación de glucosa

La estrategia de alimentación de glucosa implementada fue una alimentación asintótica (Figura 1).

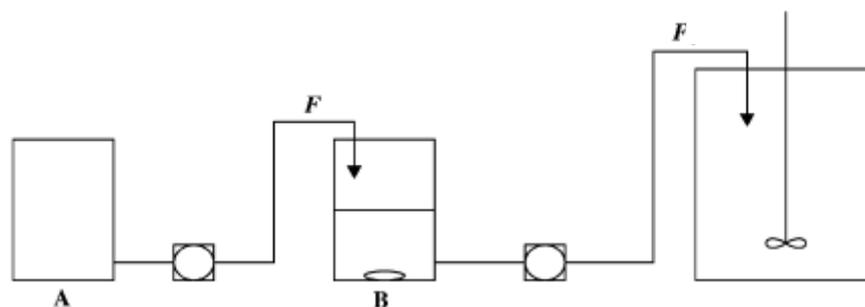


Figura 1. Esquema representando estrategia de alimentación asintótica (Cheng *et al.*, 2002). A. Reservorio de solución concentrada. B. Reservorio de solución diluida. F. flujo volumétrico

La misma consistió en un reservorio A de solución concentrada de glucosa que se transfiere a un segundo reservorio B de solución diluida a un flujo F. A su vez, la solución de reservorio B alimenta al reactor a un flujo F, de modo que el volumen del reservorio permanece constante durante toda la etapa de alimentación y la concentración de glucosa en el reservorio B varía en forma asintótica en función del tiempo tendiendo a la concentración del reservorio A.

El cálculo de la concentración de glucosa en ambos reservorios se efectuó en base al modelo propuesto en el Apéndice 7.1, fijando los parámetros en listados en Apéndice 7.2.

2.3.3. Condiciones de fermentación

Un fermentador Bioflo Celligen 310 equipado con cuatro baffles y dos turbinas Rushton de 6 paletas, de 5L de volumen útil, fue empleado en modo de operación semicontinuo.

La generación del inóculo e inoculación de biorreactor se realizó tal se describe en el inciso 2.2.1, con un volumen inicial del medio de cultivo MEBM de 1.5L.

Las variables operacionales de control y monitoreo en este modo de operación del equipo fueron las mismas que en el modo de operación discontinuo (inciso 2.2.1). En este proceso el agregado de antiespumante tampoco fue necesario durante las 48 horas de monitoreo.

El inicio de la alimentación fue a las 8 horas de fermentación, en condiciones de alta biomasa y baja velocidad específica de crecimiento (con el fin de evitar la acumulación de sustrato limitante), baja eficiencia de esporulación (menor al 10%), bajo nivel de glucosa remanente en el medio (menor al 10% del contenido inicial). Un rápido incremento del OD dio indicio de la culminación de la etapa batch.

La alimentación se efectuó a un flujo volumétrico constante de 0.072L/h en el sistema de alimentación asintótico descrito en el inciso 2.3.2. La concentración de glucosa en el reservorio de dilución (S_d) fue de 10,6g/L y los restantes componentes fueron incorporados en proporción a lo descrito para el medio MEBM. La concentración de glucosa en el reservorio de solución concentrada (S_c) fue de 71,7g/L y los restantes componentes fueron incorporados en proporción a lo descrito para el medio MEBM, exceptuando el extracto proteico (EP2) 45g/L. El volumen de solución de ambos reservorios fue de 0.8L y el reservorio de dilución contó con agitación durante la etapa de alimentación.

2.3.4. Métodos analíticos

Las variables de estado determinadas durante el proceso son las del inciso 2.1.2, determinandolas por duplicado a cada tiempo de muestreo. Se efectuaron dos réplicas genuinas del proceso.

2.3.5. Cálculo de parámetros descriptivos, cinéticos y estequiométricos del proceso

Los parámetros descriptivos del proceso determinados fueron: duración de fase lag (T_{lag}), duración de fase exponencial (T_{exp}), concentración de biomasa final (X_{final}), conversión de azúcares reductores máxima ($X_{Smáx}$); los parámetros cinéticos fueron: velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{máx}$), velocidad específica máxima de consumo de azúcares ($q_{Smáx}$) y el parámetro estequiométrico fue el coeficiente de rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$). El cálculo de los mismos se detalla en el Apéndice 6.

2.3.6. Verificación de funcionalidad de interés del cultivo de esporas producido

A partir del cultivo esporulado se siembra un 1mL del cultivo en 15mL de LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). A partir de este inóculo se constata la capacidad funcional de mineralizar el fitato de sodio en medio sólido según el inciso 2.1 de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

3. Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas y líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592 producido en un biorreactor de escala de laboratorio

3.1. Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592

3.1.1. Diseño experimental

Se estudió la estabilidad de la spora en formulación líquida en el tiempo mediante el agregado de distintos estabilizadores. Para ello se planteó un diseño factorial completo de los siguientes factores: polivinilpirrolidona, PVP (FL1) (dos niveles: 0 g/L y 20 g/L); glicerina (FL2) (dos niveles: 0 (v/v)% y 1 (v/v)%); glutamato monosódico (FL3) (dos niveles: 0 g/L y 20 g/L) y el tiempo de almacenamiento a 22°C (FL4) (0, 1, 2 y 4 meses). De la combinación de FL1, FL2 y FL3 a sus dos niveles se obtienen los ocho tratamientos que se siguen en el tiempo.

Se agregó un control externo de esporas lavadas y secadas. Se empleó la técnica de cancelación de bolsa/ependorf, siendo éstas las unidades experimentales de estudio.

Para cada tiempo de almacenamiento se determinó por duplicado biológico la concentración de esporas (inciso 1.2.3) y la capacidad funcional de mineralizar fitato de sodio en medio sólido (inciso 2.2.4). Cabe destacar que las concentraciones de cada componente se informan por litro de formulación líquida.

3.1.2. Metodología

El cultivo de esporas obtenido de la producción del biorreactor en modo de operación fedbatch se agregó en una relación 1:3 en los ocho tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8) resultantes de la combinación de los factores de estudio FL1, FL2 y FL3 (Apéndice 4.13.1). Las ocho formulaciones líquidas se alícuotaron y sellaron en bolsas de polipropileno (12cm × 20cm) en condiciones asépticas.

Para el control externo se centrifugaron 2mL de cultivo (12000rpm, 3min) en eppendorf de 2mL (previamente secado a 45°C, termostatzado en desecador y pesado, hasta peso constante), se removió el sobrenadante y se efectuaron dos lavados con suero fisiológico (0,85% NaCl). Posteriormente se secó a 45°C hasta peso constante y se registró el peso final.

3.2. Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592.

3.2.1. Diseño experimental

Se estudió la estabilidad en el tiempo de la espora en formulación sólida para distintos soportes inertes. Para ello se planteó un diseño factorial completo de los siguientes factores: caolín (FS1); turba (FS2); espora lavada y seca (FS3) y el tiempo de almacenamiento a 22°C (FS4) (0, 1, 2, 3, 4, 5 meses). Se empleó la técnica de cancelación de bolsa/Falcon/ependorf, siendo estas las unidades experimentales de estudio.

Para cada tiempo de almacenamiento se determinó por duplicado biológico la concentración de esporas (inciso 1.2.3) y la capacidad funcional de mineralizar fitato de sodio en medio sólido (inciso 2.2.4) en las formulaciones a base de caolín y la espora seca lavada. Para la formulación a base de turba se determinaron las mismas variables respuestas por duplicado analítico en cada tiempo de estudio.

3.2.2. Metodología

El cultivo de esporas obtenido de la producción del biorreactor en modo de operación fedbatch se empleó para la elaboración de los tres formulados sólidos. Para el formulado a base de caolín nacional se centrifugó 50mL del cultivo de esporas (6000rpm, 5min) en Falcon de 50mL (previamente secado a 45°C, termostatzado en desecador y pesado, hasta peso constante). Al pellet resultante (equivalente a 0.6g de biomasa seca) se le incorporó en forma aséptica 3g de la mezcla sólida a base de caolín nacional y se amasó dentro del Falcon con varilla de vidrio hasta la homogenización del formulado. A la mezcla sólida a base de caolín nacional se le incorporó carboximetilcelulosa (CMC) 1% y carbono activado 1%. La mezcla fue esterilizada en fracciones de 3g en bolsas de polipropileno por calor húmedo (121°C, 20min, 0.1MPa).

Para el formulado de impregnación de turba se inyectaron en forma aséptica 100mL de cultivo de esporas por bolsa de 100g de turba estéril neutralizada (Daason S.A.).

El formulado/control de la espora seca y lavada se elaboró de igual modo que el control externo descrito en el inciso 3.1.2. Cabe destacar que este control se incorporó tanto en la formulación líquida y sólida dado que se emplearon distintos lotes de producción. Los proveedores de los componentes empleados en las formulaciones se detallan en el Apéndice 9.

3.3. Análisis estadístico univariado

La estabilidad de la carga de esporas de cada formulación (líquida y sólida) seguida en el tiempo se efectuó mediante un análisis de varianza (ANAVA) con el tiempo como único factor de estudio. Se probaron los supuestos de normalidad de residuos (Prueba Shapiro-Wilks) y homocedasticidad de varianza (Prueba de Levene), previo a su implementación. Para los casos en que se obtuvo una significancia en el modelo propuesto se efectuó la prueba de comparación de medias LSD-Fisher con un $p \leq 0.05$.

C. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Optimización de medio de cultivo de las cepas ILBB139 y ILBB592 a escala matraz

1.1. Selección y caracterización de materias primas

1.1.1. Selección de componentes de medio de cultivo a evaluar

Las materias primas en estudio fueron seleccionadas en base a una revisión bibliográfica de aquellos componentes del medio de cultivo para los cuales se ha reportado tener una significancia estadística en el título de esporas y en la eficiencia de esporulación. La búsqueda bibliográfica se sesgo para las taxa más representadas en el proceso de *screening* (*Lysinibacillus* spp., *Bacillus thuringiensis*) y el *Bacillus subtilis* al ser tomado como modelo biológico de estudio (Tabla 1.).

Cabe destacar que existen reportes de optimización de medios de cultivo para esporulación de *Bacillus thuringiensis* y *Lysinibacillus* spp. En cambio, para *Bacillus megaterium* se encuentran referencias bibliográficas de medios de cultivos optimizados para la producción de biopolímeros (polihidroxialcanoatos (PHA)) (López *et al.*, 2012; Grage *et al.*, 2017), proteínas (Sindhu *et al.*, 2006; Vary *et al.*, 2007; Biedendieck *et al.*, 2016), biotransformaciones (Brill *et al.*, 2014) y biofertilizantes en fermentación sólida (Liu *et al.*, 2018), por ello no se lista en la Tabla 1.

1.1.2. Caracterización de extractos proteicos

Dada la significancia reportada de los extractos proteicos en el título y eficiencia de esporulación para *Bacillus s.l.* (Ben Khedher *et al.*, 2011; Sreekumar *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010), se decidió caracterizar a las fuentes complejas a ser utilizadas.

Los resultados obtenidos se informan en la Figura 2. Dado que no se efectuaron réplicas en las determinaciones analíticas no fue posible efectuar un análisis estadístico paramétrico de comparación de medias. Entre las cuatro fuente proteicas parece no haber mayor diferencia entre el contenido de C.Org. No obstante, se sugiere una diferencia en el contenido de N entre extractos proteicos de distintos orígenes, siendo EP4 el único extracto proteico de origen vegetal (extracto de maíz) analizado para el cual se obtuvo un menor contenido de N. EP1, EP2, y EP3 son extractos de levadura.

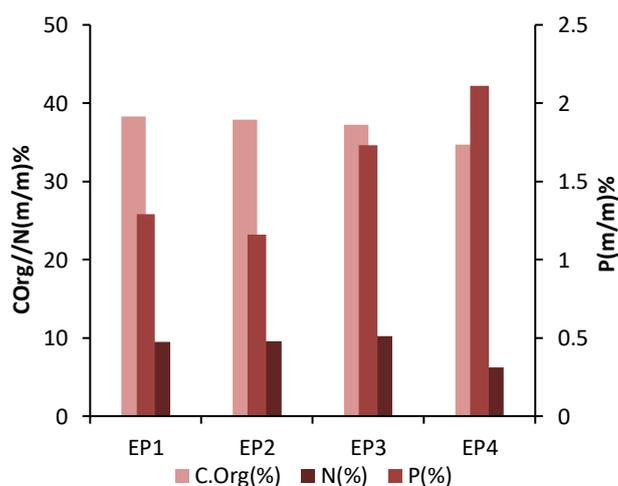


Figura 2. Gráfico de barras de carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo total de los extractos de levadura EP1, EP2, EP3 y EP4.

Cabe mencionar que la utilización de extracto proteico como factor de estudio hace que los medios a optimizar sean semi-definidos, donde la única fuente compleja a ser empleada sea el extracto proteico significativo para cada cepa. El origen de estos extractos proteicos asegura el suministro de determinados factores de crecimiento esenciales para el crecimiento celular, que en caso de ser un medio netamente sintético deben ser agregados al medio de cultivo, impartiendo un costo extra en el proceso de bioproducción y complejizando aún más el proceso de optimización al tener que incorporar más factores de estudio.

1.2. Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB139 y ILBB592

1.2.1. Diseño experimental de selección de factores de significancia

Dada la necesidad de evaluar la significancia de nueve componentes de medio de cultivo en las variables respuesta de estudio, se recurrió a un diseño factorial a dos niveles fraccionado. De ejecutarse todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en un diseño factorial completo requeriría 512 corridas (Tabla 5.). No obstante, si se desea estudiar a los efectos principales e interacciones dobles como efectos no ignorables (bajo la premisa de cumplimiento del principio de jerarquización de efectos) se requeriría como mínimo 45 corridas (9 efectos principales de cada factor y 36 interacciones dobles (C_2^9 , combinaciones de 9 factores tomadas de a 2)). Contemplando el número de efectos estimables para los distintos diseños factoriales fraccionados (Tabla 5.) se seleccionó el diseño factorial fraccionado 2^{9-3} que reduce el diseño factorial completo a una octava parte del mismo.

Tabla 5. Número de experimentos, efectos estimables y efectos ignorables para distintos diseños de nueve factores a dos niveles

Diseño Factorial	Nº Experimentos	Nº Efectos estimables	Nº Efectos no ignorables
2^9	512	511	45
2^{9-1}	256	255	45
2^{9-2}	128	127	45
2^{9-3}	64	63	45
2^{9-4}	32	31	45

El diseño seleccionado es de resolución IV, por lo que los efectos principales no se confunden entre ellos ni con interacciones dobles, pero sí puede confundir interacciones dobles entre sí, tal como se informa en la matriz de confusión (Apéndice 4.10.3). Otras características del diseño también fueron contempladas para la selección del mismo. Se buscó seleccionar un diseño que sea ortogonal, rotatable, eficiente y presente bajos coeficientes de *Leverage*.

Las 64 corridas se aleatorizaron en dos semanas de trabajo distintas dado limitantes de equipamiento y de tiempo, por lo que la variable “semana” se tomó como factor de bloqueo.

1.2.2. Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB139

Para la evaluación de la significancia de los efectos estudiados sobre las dos variables respuestas se presenta el diagrama de Pareto- método de Bonferroni, gráfico de Daniel y tabla de análisis de varianza Figura 3.

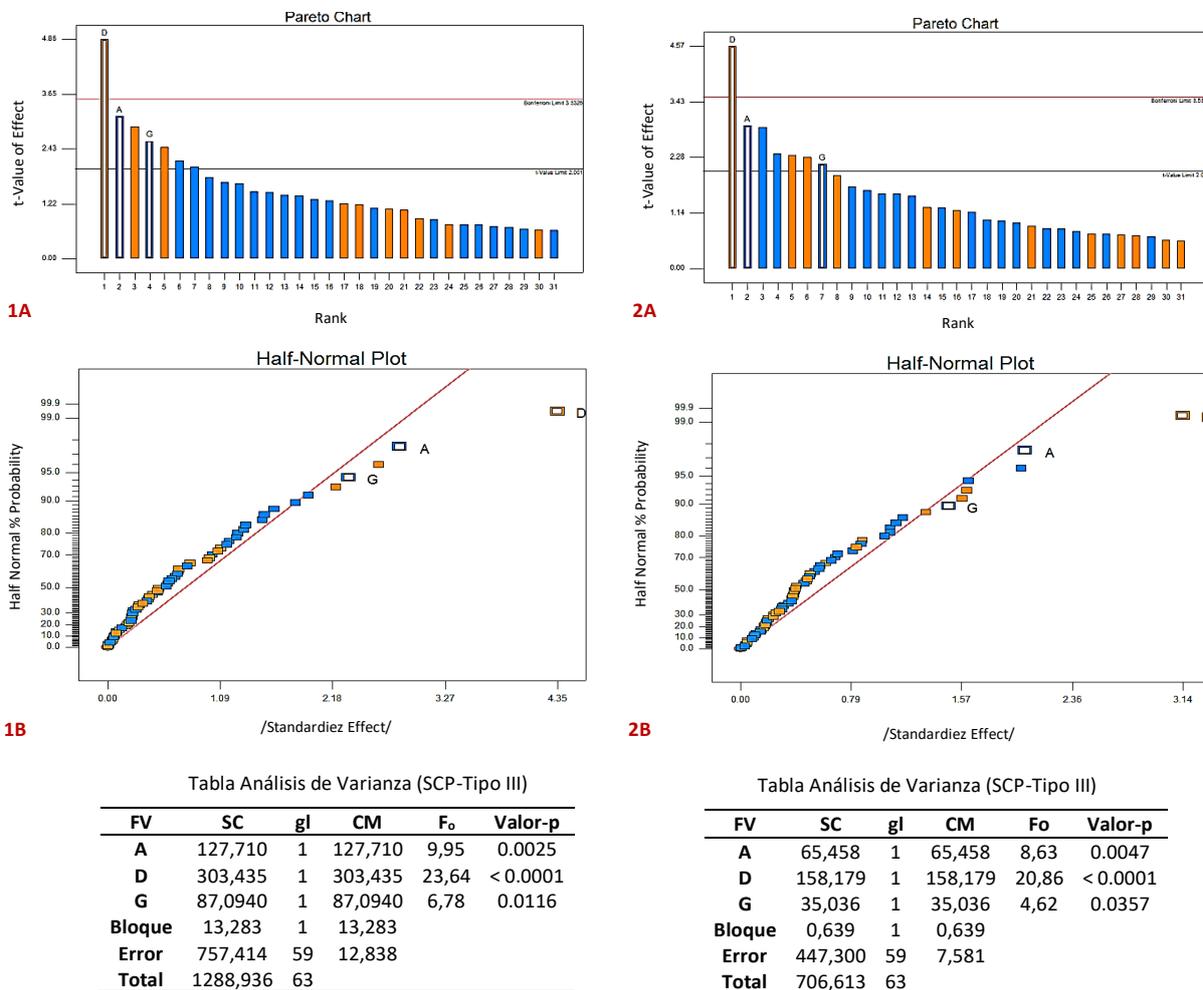


Figura 3. Diagrama de Pareto-método de Bonferroni (A), gráfico de Daniel (B) y tabla de análisis de varianza (C) (FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales) para la cepa ILBB139, en las variables respuesta: título de esporas (1) y eficiencia de esporulación (2). El factor A, D, G es la concentración de glucosa, EP3 y MnSO₄, respectivamente. En las figuras A y B el color naranja y azul corresponden a efectos positivos y negativos, respectivamente.

De los cuatro extractos proteicos ensayados los extractos de levadura presentaron efectos positivos significativos (Apéndice 4.10.4), en cambio, el extracto de maíz genera un efecto negativo significativo (Apéndice 4.10.4) en ambas variables respuestas.

En el diagrama de Pareto-método de Bonferroni (Figura 3, 1A y 1B) y gráfico de Daniel (Figura 3, 2A y 2B) se constata un marcado efecto positivo y significativo para el extracto proteico EP3, al caer en la zona de significancia del método de Bonferroni en el diagrama de Pareto y alejarse de la recta (la cual representa los efectos experimentales en función de los efectos teóricos que se obtendrían de presentar una distribución normal) en el diagrama de Daniel, en ambas variables respuestas.

El extracto proteico EP3 que tuvo un efecto positivo de mayor magnitud en ambas variables respuestas para la cepa ILBB139, se encontró dentro del grupo de extractos proteicos con mayor contenido de N, y dentro del mismo fue aquel que presentó una mayor relación P/C.Org (Figura 2).

Para el conjunto de efectos que caen en la zona dudosa de significancia en el diagrama de Pareto (entre el $t_{\text{límite}}$ de Bonferroni y el $t_{\text{crítico}}$) el criterio tomado para la selección de los factores a evaluar su significancia en el ANOVA fue la selección de efectos principales (por el Principio Jerárquico, el cual postula que los efectos principales serán de mayor importancia que interacciones dobles, triples, etc para modelar la variabilidad de la respuesta), incluyendo en el conjunto de factores seleccionados una única fuente de extracto proteico de las cuatro ensayadas. De aquí se seleccionó a los factores: glucosa y MnSO_4 , para evaluar su significancia y modelar la variabilidad de la respuesta.

De la selección de los factores EP3, glucosa y MnSO_4 se obtienen p -valor de significancia en el ANOVA (Figura 3, 3A y 3B), y el remanente de efectos que pueden ser estimados por el diseño (60 efectos estimables restantes) que no presentaron evidencia significativa para rechazar el supuesto de normalidad (Prueba *Shapiro-Wilks*; p -valor de 0.979 y 0.415, para las variables 1 y 2) pasaron a conformar el error. Esto es coherente con el principio de Pareto el cual postula que, al partir de una elevada cantidad de factores en la fase inicial de un experimento solo unos pocos son los responsables de la mayor variabilidad de la respuesta.

Cabe mencionar que los efectos A (glucosa), D (EP3) y G (MnSO_4) son en realidad debido al alias: $[A] = A$, $[D] = D + EGH$, $[G] = G + DEH$ (Apéndice 4.10.3). Sin embargo, puesto que es plausible que la interacción de tres factores y de órdenes superiores sea insignificante, se concluye que los efectos A, D y G son los seleccionados para la optimización.

1.2.3. Selección de componentes del medio de cultivo de significancia en título de esporas y eficiencia de esporulación para ILBB592

Para la evaluación de la significancia de los efectos estudiados sobre las dos variables respuestas se presenta el diagrama de Pareto- método de Bonferroni, gráfico de Daniel y tabla de análisis de varianza Figura 4.

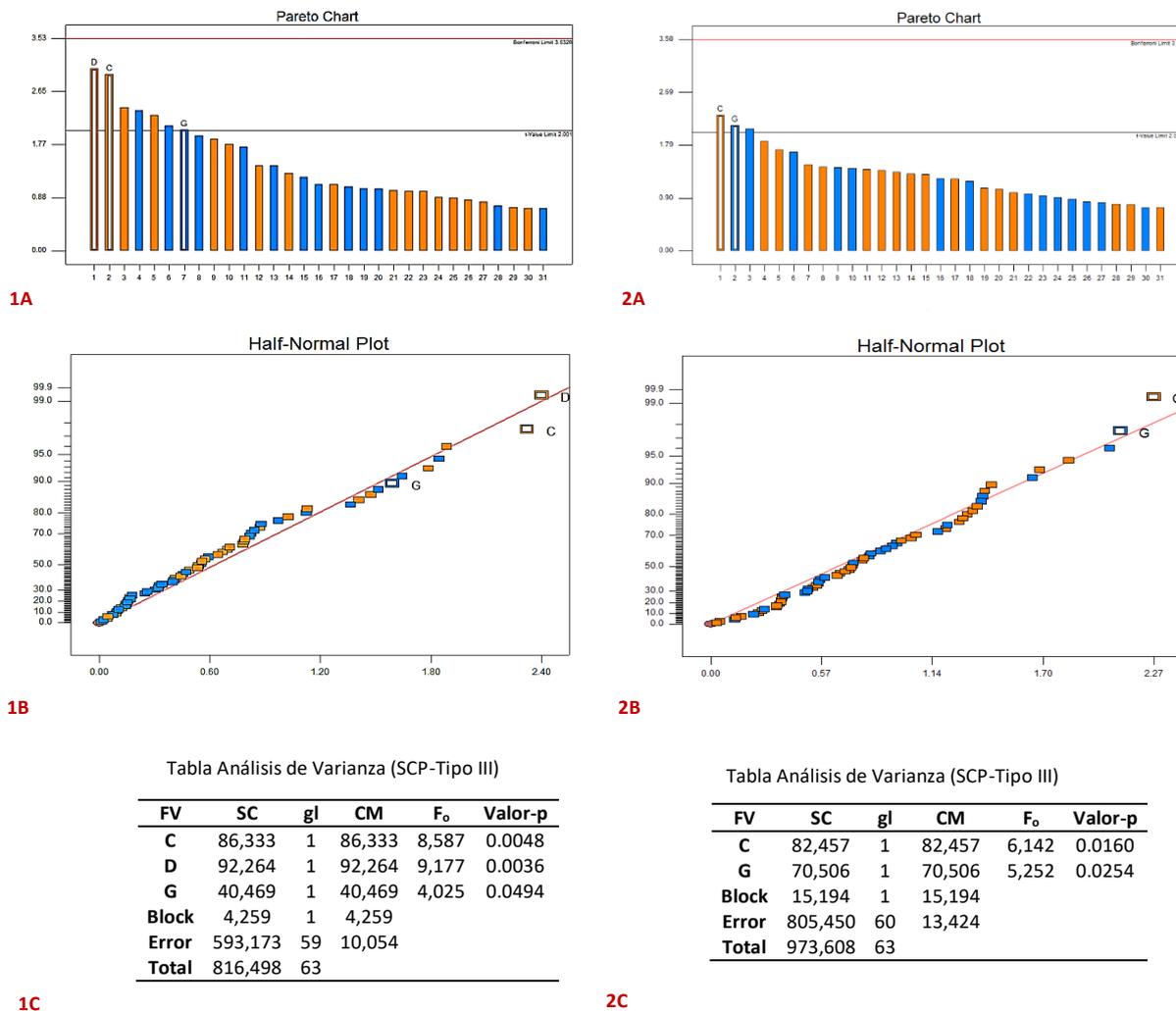


Figura 4. Diagrama de Pareto-método de Bonferroni (A), gráfico de Daniel (B) y tabla de análisis de varianza (C) (FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales) para la cepa ILBB592, en las variables respuesta: título de esporas (1) y eficiencia de esporulación (2). Los factores C, D, G son las concentraciones de EP2, EP3 y MnSO₄, respectivamente. En las figuras A y B el color naranja y azul corresponden a efectos positivos y negativos, respectivamente.

De los cuatro extractos proteicos ensayados, EP1, EP2 Y EP4 generaron un efecto positivo y significativo en ambas variables respuestas (Apéndice 4.10.5). No obstante, EP3 fue significativo para para el título de esporas y no así para la eficiencia de esporulación (Apéndice 4.10.5). Dado que EP2 presentó un efecto positivo significativo para ambas variables respuestas, es el extracto proteico seleccionado a evaluar su significancia en el ANOVA. Para ILBB592 el extracto de maíz genera un efecto positivo y significativo, siendo lo contrario a lo obtenido para ILBB139.

Para el conjunto de efectos que caen en la zona dudosa de significancia en el diagrama de Pareto (entre el $t_{\text{límite}}$ de Bonferroni y el $t_{\text{crítico}}$) (Figura 4, 1A y 1B) y se apartan paulatinamente de la recta en el gráfico de Daniel (Figura 4, 2A y 2B), el criterio tomado para la selección de los factores a evaluar su significancia en el ANOVA fue la selección de efectos principales incluyendo un solo factor de los extractos proteicos utilizados, ya mencionado. De aquí se seleccionó al factor MnSO_4 para evaluar su significancia en modelar la variabilidad de las respuestas.

De la selección de los factores EP2 y MnSO_4 se obtienen p -valor de significancia en el ANOVA (Figura 4, 3A y 3B), y el remanente de efectos que pueden ser estimados por el diseño (61 efectos estimables restantes) que no presentaron evidencia significativa para rechazar el supuesto de normalidad (Prueba *Shapiro-Wilks*; p -valor de 0.689 y 0.384, para las variables 1 y 2) pasaron a conformar el error.

Los efectos C (EP2) y G (MnSO_4) son en realidad debido al alias: [C] = C, [G] = G + DEH (Apéndice 4.10.3). Sin embargo, puesto que es plausible que la interacción de tres factores y de órdenes superiores sea insignificantes, se concluye que los efectos C y G son los seleccionados para la optimización.

El extracto proteico EP2 que tuvo un mayor efecto positivo en las variables respuestas para la cepa ILBB592, se encuentra al igual que EP3 (extracto proteico seleccionado para ILBB139) dentro del grupo de extractos proteicos ensayados con mayor contenido de N. Si bien EP2 no difiere circunstancialmente de EP1 en las relaciones N/C Org y P/C Org, el fabricante de ambos extractos de levadura reporta para EP2 ser enriquecida en manganeso, hierro y zinc. Esto es coherente con la significancia obtenida para la cepa ILBB592 de un nivel basal de manganeso en el medio de cultivo para que esporule en condiciones óptimas.

1.3. Optimización de medios de cultivo

1.3.1. Selección de diseño experimental de optimización de factores

En la selección de un diseño experimental de optimización, ciertos atributos son deseables para ajustar un modelo de predicción de una respuesta por la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). Interesa estudiar la adecuabilidad del modelo, falta de ajuste; ejecutar los ensayos en bloque; que los diseños de orden superior se construyan secuencialmente; estimar el error de predicción del modelo, de los coeficientes del modelo; estimar la varianza de predicción en la región experimental; calcular los parámetros del modelo de forma simple sin requerir un elevado número de niveles en cada variable independiente, resultando en un número de corridas factible de ejecutar.

En base a lo reportado para el modelado del título de esporas y eficiencia de esporulación para *Bacillus s.l.* en relación con distintos constituyentes de medio de cultivo (Posada-Urbe *et al.*, 2015) es de esperarse una superficie respuesta con curvatura, por lo que se seleccionó un diseño experimental de optimización para ajustar un modelo de segundo orden.

El diseño central compuesto (DCC) se trata de un diseño factorial 2^k (o factorial fraccionado de Resolución V), siendo k el número de factores a optimizar. El aumentar el diseño experimental con réplicas del punto central permite estudiar la bondad de ajuste del modelo (al estimar el error experimental puro). El incorporar al diseño más de dos niveles por factor, al introducir el punto central y los puntos axiales, permite modelar una curvatura de la superficie de respuesta obtenida de análisis de regresión lineal múltiple y obtener un modelo de segundo orden.

Dos parámetros del diseño deben especificarse: el número de réplicas del punto central y la distancia del punto axial al centro del diseño. Para que el diseño sea rotatable $\alpha = \sqrt[n_F]{n_F}$ siendo n_F el número de puntos experimentales utilizados en la fracción factorial del diseño. Que el diseño sea rotatable significa que proporciona una precisión de estimación igual en todas las direcciones,

siendo una característica de interés dado el desconocimiento a priori de la localización del óptimo.

Si bien para este diseño es necesario un mayor número de corridas respecto a otros que también permiten obtener modelos de segundo orden (*Box-Behnken*), una de las principales ventajas que el DCC presenta, es el permitir la ejecución de experimentos secuenciales incorporando puntos experimentales para mejorar el ajuste del modelo.

1.3.2. Optimización de medio de cultivo para ILBB139

1.3.2.1. Prueba intermedia de selección de zona de optimización para EP3

Para la selección de la zona de optimización del factor EP3 fue necesario efectuar un ensayo previo que ampliase el rango dinámico de trabajo que se utilizó en el ensayo de selección de factores de significancia (0-5 g/L), dado que en el mismo se obtuvo solo un incremento de las variables respuestas de estudio. Por ello se decidió trabajar en el rango 0-100 g/L con el fin de constatar un incremento y reducción de las variables respuestas con el incremento de la concentración de EP3 y así definir el rango dinámico de optimización. En la Figura 5. se presentan los resultados obtenidos.

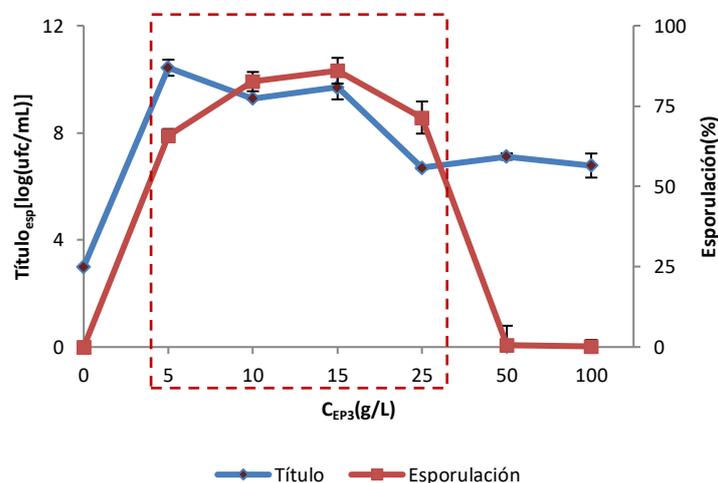
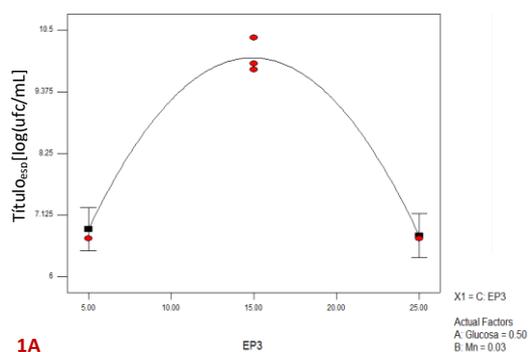


Figura 5. Gráfico de dispersión con línea de título de esporas (ufc/mL) y eficiencia de esporulación para los distintos niveles de EP3 ensayados. El cuadro rojo punteado indica la zona de optimización seleccionada. Cada punto representa el promedio de tres réplicas \pm la desviación estándar.

En base a la tendencia observada se seleccionó el rango dinámico de optimización (5-25) g/L para EP3.

1.3.2.2. Ajuste de modelo propuesto para el modelado del título de esporas y eficiencia de esporulación a partir de los factores de significancia

Los modelos polinómicos de segundo orden ajustados para cada variable respuesta de estudio se presentan en la Figura 6.



1A

Tabla Análisis de Varianza (SCP-Tipo III)

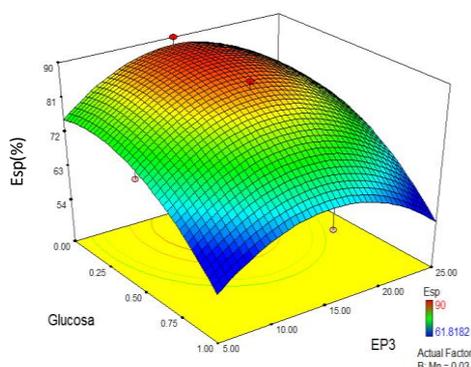
FV	SC	gl	CM	F _o	Valor-p
Modelo	16,589	2	8,295	85,972	< 0,0001
C	0,0163	1	0,0163	0,168	0,688
C ²	16,573	1	16,573	171,776	< 0,0001
Residual	1,351	14	0,0965		
Lack of Fit	1,160	12	0,0966	1,012	0,599
Puro Error	0,191	2	0,0955		
Total	17,940	16			

1B

$$Título_{esp} [\log(ufc/mL)] = -0,03C^2 + 0,9C + 2,9$$

$$R_{Adj}^2 = 0,91$$

1C



2A

Tabla Análisis de Varianza (SCP-Tipo III)

FV	SC	gl	CM	F _o	Valor-p
Modelo	808,684	4	202,171	14,796	0,0001
C	0,212	1	0,212	0,0155	0,9030
A	512,930	1	512,930	37,538	< 0,0001
C ²	249,296	1	249,296	18,244	0,00110
A ²	104,487	1	104,487	7,647	0,0171
Residual	163,972	12	13,664		
Lack of Fit	97,305	10	9,731	0,292	0,926
Puro Error	66,667	2	33,333		
Total	972,656	16			

2B

$$Esp(\%) = -0,1C^2 - 32,9A^2 + 3,8C + 12,3A + 59,8$$

$$R_{Adj}^2 = 0,87$$

2C

Figura 6. Modelo de regresión cuadrático reducido de la variable respuesta en función de sus factores de significancia (A), tabla de análisis de varianza y prueba de falta de ajuste (B) (FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales) y modelo de regresión de segundo orden de mejor ajuste y su R_{aj}^2 (C) para la cepa ILBB139, en las variables respuesta: título de esporas (1) y eficiencia de esporulación (2). Los factores A, B y C, son las concentraciones de glucosa, $MnSO_4$, y EP3, respectivamente. El factor no representado en la figura se fijó al valor medio de su correspondiente rango dinámico.

El análisis de varianza del diseño experimental de optimización CCD para la cepa ILBB139 indicó que $EP3 \times EP3$ (C^2) tuvo un efecto significativo en el título de esporas (p -valor 0,0001; Figura 6, 1B), si bien el término EP3 (C) no fue significativo para la variable respuesta de estudio este fue incluido en el modelo polinómico final por el principio de jerarquía. El p -valor del modelo y la prueba de falta de ajuste (0,0001; 0,599; Figura 6, 1B) indican que el modelo se ajusta adecuadamente con los datos experimentales. La ecuación del polinomio de segundo orden (Figura 6, 1A-1C) obtenido del análisis de varianza, presenta un R_{Adj}^2 de 0,91 indicando que menos del 9,3% de la variabilidad total no es explicada por el modelo.

Para la eficiencia de esporulación los términos $EP3 \times EP3$ (C^2), $glucosa \times glucosa$ (A^2), y glucosa (A) generaron un efecto significativo (p -valor: 0,0011; 0,017; 0,0001; respectivamente; Figura 6, 2B) y nuevamente el término EP3 (C) se incluyó en el modelo por el principio de jerarquía. El p -valor del modelo y la prueba de falta de ajuste (0,0001; 0,926; Figura 6, 2B) indican que el modelo se ajusta adecuadamente con los datos experimentales. La ecuación del polinomio de segundo orden (Figura 6, 2A-2C) obtenido del análisis de varianza, presenta un R_{Adj}^2 de 0,87 indicando que

menos del 9,9% de la variabilidad total no es explicada por el modelo. La superficie de respuesta obtenida presentó una forma de loma, dando cuenta de la correcta selección del entorno experimental de trabajo al contener el punto estacionario centrado en el mismo.

La concentración de MnSO_4 (B) pese a ser uno de los factores incluidos en el diseño de optimización por los resultados obtenidos en el ensayo de selección de factores de significancia, no generó un efecto significativo en ninguna de las dos variables de estudio. Cabe destacar que el MnSO_4 fue de los tres factores seleccionados el de mayor p -valor y cayó en la zona dudosa de significancia en el diagrama de Pareto de ambas variables respuesta (Figura 3).

1.3.2.3. Localización del óptimo

A partir de los modelos de segundo orden obtenidos para cada variable respuesta se construye su correspondiente función de deseabilidad parcial. A partir de las mismas se calculó la función de deseabilidad global y con el criterio de optimización preestablecido se obtiene el punto óptimo (Figura 7).

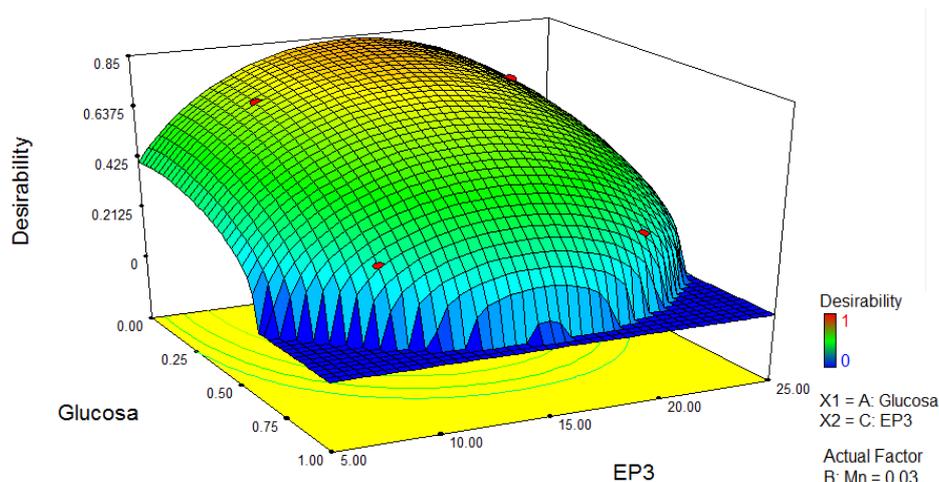


Figura 7. Función de deseabilidad global de las variables respuestas título de esporas y eficiencia de esporulación en función de los factores significativos en el diseño de optimización. Los factores A, B y C, son las concentraciones de glucosa, MnSO_4 , y EP3, respectivamente. El factor de estudio no representado en la figura se fijó al valor medio de su correspondiente rango dinámico.

La Figura 7 presenta una amplia zona en con valores de deseabilidad global altos, destacando ser una zona de optimización robusta.

El punto óptimo se localizó a 0 g/L, 0 g/L y 14,9 g/L de glucosa, MnSO_4 y EP3, respectivamente con un valor de deseabilidad global de 0,87. En dicho punto las variables respuestas se predijeron tomar valores de 9,5 log ufc/mL y 88% para el título de esporas y eficiencia de esporulación, respectivamente.

El base a lo obtenido se propone como medio óptimo para la esporulación del ILBB139 al medio MEBT (*Medio Esporulación Bacillus thuringiensis*) detallado en Apéndice 1.3.1.

Se ha reportado como óptimo de esporulación en condiciones de producción en batch para *Bacillus thuringiensis* HD-73 una relación molar C/N 4:1 (Farrera *et al.*, 1998), lo cual es coherente con el medio optimizado para ILBB139 aun siendo un atributo cepa específico.

1.3.2.4. Verificación experimental del óptimo, cálculo de error de predicción del modelo y comparación con medio de cultivo clásico

Para el medio MEBT se obtiene experimentalmente un título de esporas de 9,3 log ufc/mL y una eficiencia de esporulación del 82% para la cepa ILBB139; reportando un error de predicción del modelo de -2% y -7%. En el medio 2SG en semejantes condiciones de cultivo se obtiene un título de esporas de 7,6 log ufc/mL y una eficiencia de esporulación del 80% para la cepa ILBB139. Las esporas producidas una vez germinadas presentaron la capacidad de mineralizar el fitato de sodio en medio sólido.

1.3.3. Optimización de medio de cultivo para ILBB592

1.3.3.1. Prueba intermedia de selección de zona de optimización para EP2

El rango dinámico de optimización para EP2 y la cepa ILBB592 se presenta en la Figura 8.

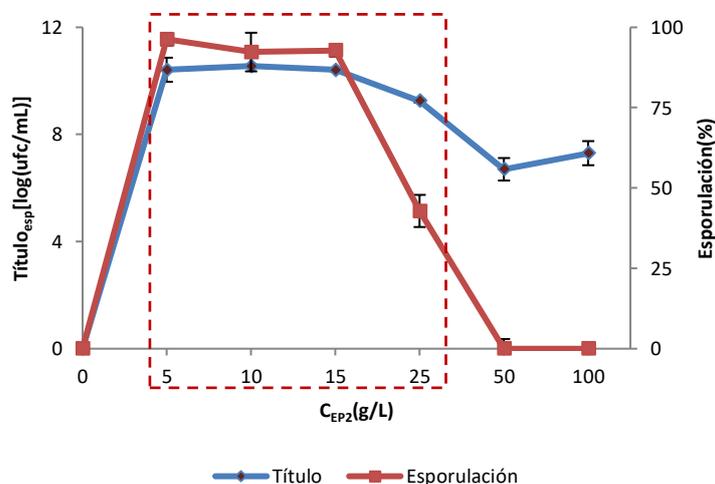


Figura 8. Gráfico de dispersión con línea de título de esporas (ufc/mL) y eficiencia de esporulación para los distintos niveles de EP3 ensayados. El cuadro rojo punteado indica la zona de optimización seleccionada. Cada punto representa el promedio de tres réplicas \pm la desviación estándar.

En base a la tendencia recabada se selecciona el rango dinámico de optimización 5-25 g/L para EP2.

1.3.3.2. Ajuste de modelo propuesto para el modelado del título de esporas y eficiencia de esporulación a partir de los factores de significancia

Los modelos polinómicos de segundo orden ajustados para cada variable respuesta de estudio se presentan en la Figura 9.

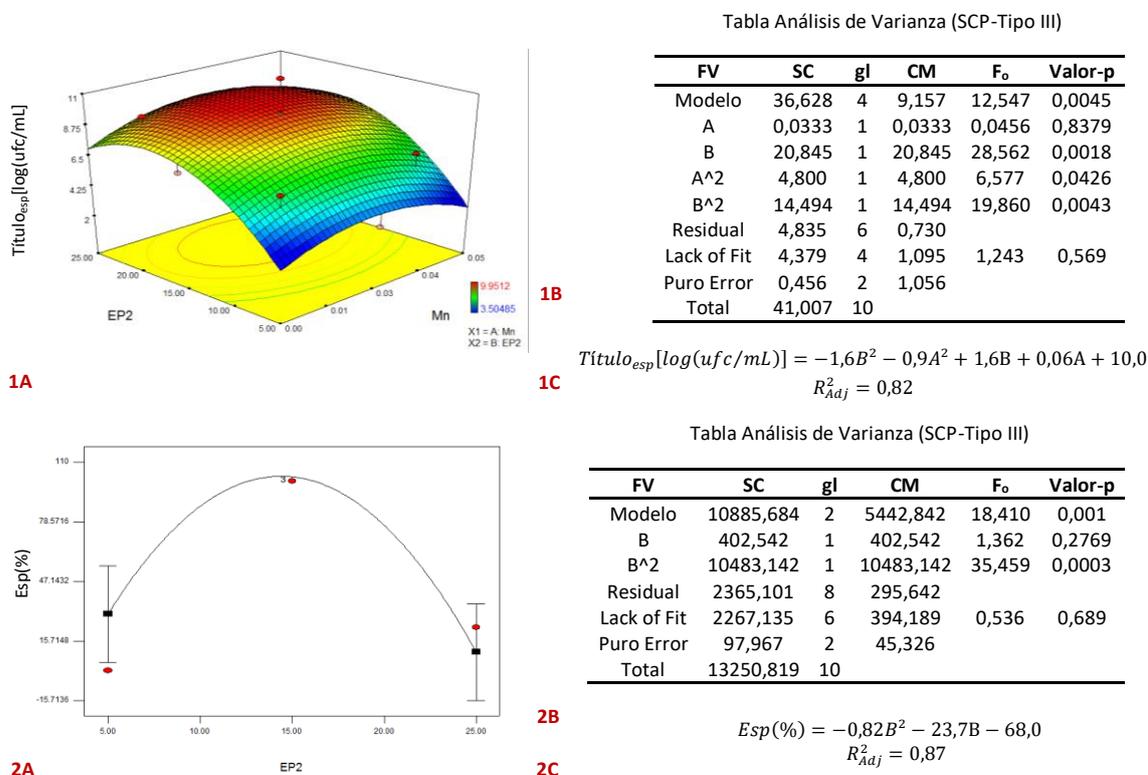


Figura 9. Modelo de regresión cuadrático reducido de la variable respuesta en función de sus factores de significancia (A), tabla de análisis de varianza y prueba de falta de ajuste (B) (FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales) y modelo de regresión de segundo orden de mejor ajuste y su R²_{aj} (C) para la cepa ILBB592, en las variables respuesta: título de esporas (1) y eficiencia de esporulación (2). Los factores A y B, son las concentraciones de MnSO₄ y EP2, respectivamente.

El análisis de varianza del diseño experimental de optimización CCD para la cepa ILBB592 indicó que EP2×EP2 (B²), MnSO₄× MnSO₄ (A²), y (B) generaron un efecto significativo (p-valor: 0,0043; 0,043; 0,0018; respectivamente; Figura 9, 1B) y el término MnSO₄ (A) se incluyó en el modelo por el principio de jerarquía. El p-valor del modelo y la prueba de falta de ajuste (0,0045; 0,569; Figura 9, 1B) indican que el modelo se ajusta adecuadamente con los datos experimentales. La ecuación del polinomio de segundo orden (Figura 9, 1A-1C) obtenido del análisis de varianza, presenta un R²_{aj} de 0,82 indicando que menos del 9,4% de la variabilidad total no es explicada por el modelo. La superficie de respuesta obtenida en este caso volvió a presentar una forma de loma, dando cuenta de la correcta selección del entorno experimental de trabajo al contener el punto estacionario centrado en el mismo.

Para la eficiencia de esporulación el término EP2×EP2 (B²) presentó un efecto significativo (p-valor: 0,0003; Figura 9, 2B) y el término EP2(B) se incluyó en el modelo por el principio de jerarquía. El p-valor del modelo y la prueba de falta de ajuste (0,001; 0,689; Figura 9, 2B) indican que el modelo se ajusta adecuadamente con los datos experimentales. La ecuación del polinomio de segundo orden (Figura 9, 2A-2C) obtenido del análisis de varianza, presenta un R²_{aj} de 0,87 indicando que menos del 9,2% de la variabilidad total no es explicada por el modelo.

1.3.3.3. Localización del óptimo

A partir de los modelos de segundo orden obtenidos para cada variable respuesta se construye su correspondiente función de deseabilidad parcial. A partir de las mismas se calculó la función de deseabilidad global y con el criterio de optimización preestablecido se obtiene el punto óptimo (Figura 10).

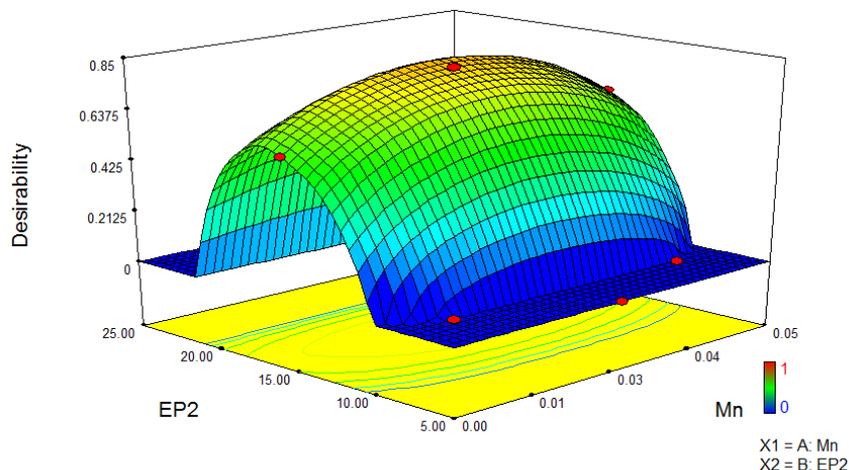


Figura 10. Función de deseabilidad global de las variables respuestas título de esporas y eficiencia de esporulación en función de los factores significativos en el diseño de optimización. Los factores A y B, son las concentraciones de MnSO_4 , y EP2, respectivamente.

La Figura 10. presenta una amplia zona con valores de deseabilidad global altos, siendo ser una zona de optimización robusta.

El punto óptimo se localizó a 0,03 g/L y 16,1 g/L de MnSO_4 y EP2, respectivamente con un valor de deseabilidad global de 0,84. En dicho punto las variables respuestas predichas toman valores de 10,2 log(ufc/mL) y 100% para el título de esporas y eficiencia de esporulación, respectivamente.

Se propone como medio óptimo para la esporulación del ILBB592 al medio MEBM (*Medio Esporulación Bacillus megaterium*) detallado en Apéndice 1.3.2.

La relación molar C:N del medio optimizado para ILBB592 es de 5:1. Se ha reportado una relación óptima significativamente superior para *Bacillus megaterium* (BA-019) para producción de PHB de 25:1 (Kulpreecha *et al.*, 2009). Esto es coherente dado que en la producción de PHB el exceso de carbono se toma como estrategia para que el cultivo no inicie el proceso de esporulación al acidificarse el medio (debido a los productos de fermentación) (Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1996). dado que el polímero es degradado una vez que el cultivo inicia la esporulación (Wang *et al.*, 2016). Para una relación C/N 5:1 Kanjanachumpol (2013) obtuvo para la misma cepa un máximo de producción de biomasa y un mínimo de PHB en condiciones de producción en fedbatch.

1.3.3.4. Verificación experimental del óptimo y cálculo de error de predicción del modelo e comparación con medio de cultivo clásico.

Para el medio MEBM se obtiene experimentalmente un título de esporas de 10,3 log ufc/mL y una eficiencia de esporulación del 100% para la cepa ILBB592; reportando un error de predicción del modelo de 1% y 0,003%. En el medio 2SG en semejantes condiciones de cultivo se obtiene un título de esporas de 8,2 log ufc/mL y una eficiencia de esporulación del 95% para la cepa ILBB592. Las esporas producidas una vez germinadas presentaron la capacidad de mineralizar el fitato de sodio en medio sólido.

2. Optimización de condiciones de producción para la cepa ILBB592

2.1. Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en matraz y en biorreactor en modo de operación discontinuo (batch)

En las Figuras 11 y 12 se representan los perfiles de condiciones de operación y variables de estado del proceso en función del tiempo, así como los parámetros descriptivos del mismo para la producción en matraz y en biorreactor (batch), respectivamente.

La duración de la fase *lag* difiere entre ambos procesos, siendo inferior para la producción en batch. Esto puede ser atribuible a que el medio de generación del inóculo en el batch fue el mismo medio (MEBM), mientras que para la producción en matraz se realizó en LB, por lo cual el cultivo pudo requerir un período de aclimatación previo al inicio del crecimiento. Una duración de fase *lag* de 4hs para un proceso en biorreactor es coherente con lo reportado para *B. megaterium* (Hollman *et al.*, 2004; Sabra *et al.*, 2008; Kanjanachumpol *et al.*, 2013).

En ambos sistemas de producción las curvas de crecimiento microbiano se ajustan a el modelo no estructurado, no segregado de *Monod* ($R^2=0,993$ y $R^2=0,991$, matraz y biorreactor respectivamente (Apéndice 10)), por lo que amerita el cálculo del parámetro $\mu_{m\acute{a}x}$, así como de otras propiedades del cultivo que representan el comportamiento promedio de la población de células (Tablas C de las Figuras 11 y 12). Los valores obtenidos de $\mu_{m\acute{a}x}$ para ambos sistemas de producción son coherente con lo reportado por otros autores (Hollman *et al.*, 2004; Sabra *et al.*, 2008; Kanjanachumpol *et al.*, 2013). El $\mu_{m\acute{a}x}$ para el sistema de producción en batch fue significativamente mayor que en matraz, esto puede ser atribuible a una mayor capacidad de transferencia de oxígeno para este sistema de producción, pese a que en ambos sistemas de producción el oxígeno fue limitante en algún período de la corrida, al constatarse la fermentación de partes de las fuentes de carbono disponibles ante una reducción del pH del medio. Se ha reportado un incremento en $\mu_{m\acute{a}x}$ concomitantemente con el porcentaje de oxígeno disuelto (OD) establecido para un sistema de producción en batch de *B. megaterium* DSMZ 90 (Sabra *et al.*, 2008).

La duración de la fase exponencial en la producción en matraz fue mayor que en batch, en coherencia con la tendencia de $\mu_{m\acute{a}x}$ anteriormente discutida para estos dos sistemas.

Durante la fase exponencial se constata la conversión total del azúcar del medio en ambos sistemas. Inclusive el perfil del pH durante la producción en ambos sistemas presenta una tendencia semejante (Rowe *et al.*, 2003). En esta fase se obtiene, una etapa de acidificación del medio (se alcanza un pH mínimo de 6 para ambos sistemas cuando resta convertir un 25% de la glucosa disponible inicialmente en el medio) y una etapa de incremento del pH inclusive por encima del pH inicial del medio.

Se ha reportado que ante un exceso de glucosa en aerobiosis la misma es respirada por los *Bacillus s.l.* a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) obteniendo como productos mayoritarios ácido acético y pirúvico (Mignone *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000). Una vez, que la glucosa se agota, los ácidos son oxidados por el ciclo de Krebs (Lüthy *et al.*, 1982) estando este evento asociado al inicio de la esporulación (Benoit *et al.*, 1990). Esto es consistente con lo obtenido en la etapa de acidificación del medio. A su vez, el incremento de pH puede atribuirse a la metabolización de los ácidos orgánicos generados y de fuentes proteicas del medio (una vez agotada la glucosa y los ácidos orgánicos) mediante la amonificación, proceso mediante el cual se da la liberación de amonio y otros sustratos alcalinos durante la lisis celular (Sarrafzadeh *et al.*, 2014). Cabe destacar que el haber tomado el pH como variable a monitorear fue informativo del estadio fisiológico del cultivo, y se reporta como la opción más favorable en la producción de biomasa de *Bacillus megaterium* BA-019 (Kulpreecha *et al.*, 2009).

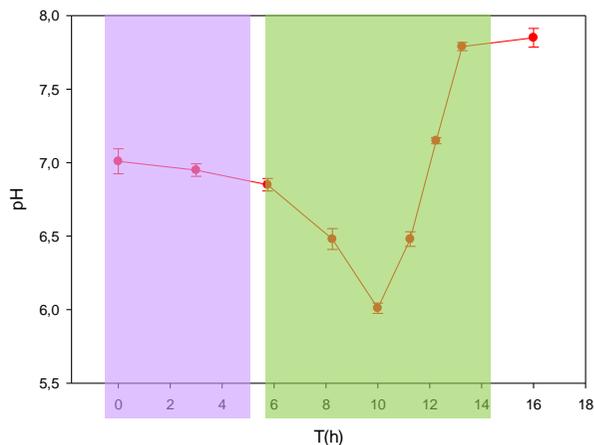
Para la fase exponencial del cultivo en batch, el nivel de oxígeno disuelto vario entre 4% y 20%, alcanzando el mínimo aun operando el equipo en condiciones de máxima transferencia de oxígeno. A su vez, el incremento y reducción de OD% constatado a las 9.4hs de fermentación fue reproducible en las tres corridas efectuadas estando asociado al punto de inflexión del perfil del pH, al restablecerse el pH inicial del medio. Esto podría atribuirse a inicio de catabolismo de las fuentes proteicas una vez culminada el de los ácidos orgánicos (Hollmann *et al.*, 2004).

El inicio de la esporulación del cultivo (criterio mayor a 10% de eficiencia de esporulación) se constata para ambos sistemas a la quinta hora de iniciada la fase exponencial. En ese momento el pH del medio se encuentra en la etapa ascendente (Benoit *et al.*, 1990) y el remanente de glucosa es menor al 25% de la concentración inicial ($\leq 1.0\text{g/L}$). Esto es coherente con la represión por glucosa en el proceso de esporulación (Schaeffer *et al.*, 1965). Para ambos sistemas de producción se obtiene a las 12hs de fermentación la esporulación total del cultivo (espora no libre).

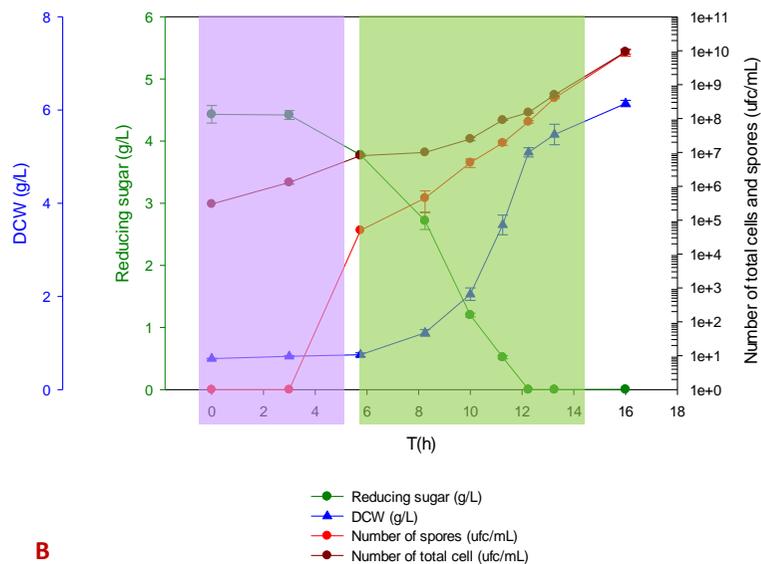
El mayor título de esporas obtenido en matraz puede atribuirse a la mayor duración de la fase exponencial con una velocidad de crecimiento específico menor respecto a la producción en batch, siendo los principales parámetros descriptivos que difieren significativamente para ambos sistemas (Tablas C de las Figuras 11 y 12).

De este modo, al crecer a una menor velocidad de crecimiento específico ante la misma disponibilidad de nutrientes puede que en el matraz una mayor fracción del total de la glucosa disponible en el medio haya sido respirada en lugar de fermentada, obteniendo así una mayor ganancia de energía metabólica a cambio y por ende un mayor título de esporas.

Esto sugiere que la operación del biorreactor en modo fedbatch tendría un desempeño superior al batch, ya que permitiría obtener un cultivo una con alta densidad celular, al implementar la estrategia de extender la fase de exponencial a una velocidad de crecimiento específica reducida. Esto se lograría limitado la disponibilidad de un sustrato, con el fin de levantar la limitante de oxígeno en el cultivo y la producción de ácido asociada (Hollman *et al.*, 2004; Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1996).



A ● pH



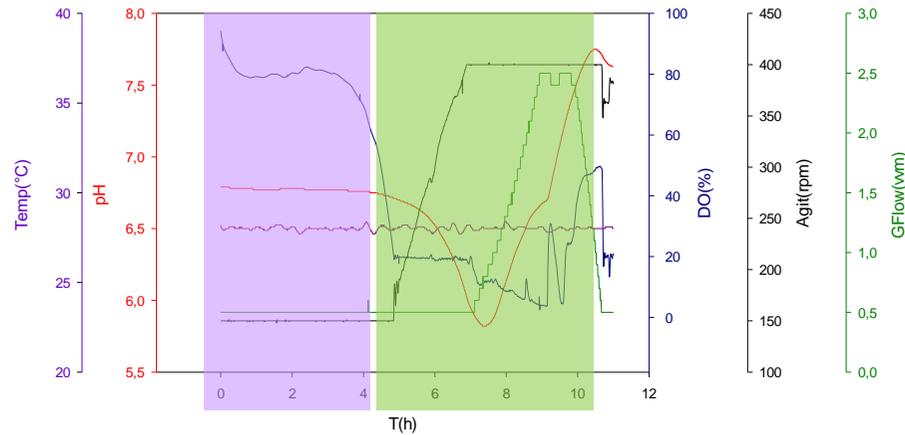
B

● Reducing sugar (g/L)
 ▲ DCW (g/L)
 ● Number of spores (ufc/mL)
 ● Number of total cell (ufc/mL)

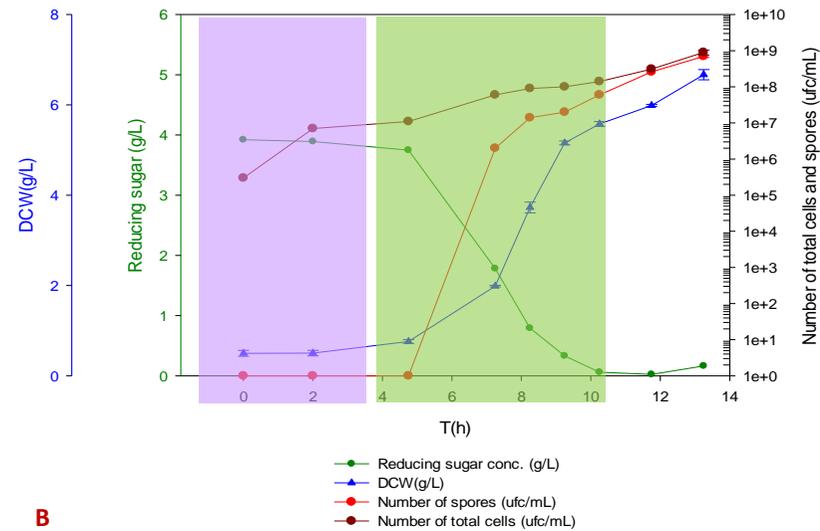
Parámetros	Batch
T_{lag} (h)	5
T_{exp} (h)	9
$X_{Producción}$ ($\frac{g}{L}$)	$6,2 \pm 0,2$
$X_S máx$ (%)	100 ± 2
$Y_{X/S}$ ($\frac{g}{g}$)	$0,9 \pm 0,1$
$Q_X máx$ ($\frac{g}{Lh}$)	$1,56 \pm 0,02$
$Q_S máx$ ($\frac{g}{Lh}$)	$1,1 \pm 0,1$
$\mu máx$ (h^{-1})	$0,362 \pm 0,004$
$q_S máx$ ($\frac{g}{gh}$)	$0,7 \pm 0,1$
Título esporas (ufc/mL)	$1,0 \times 10^{10}$
Eficiencia de esporulación (%)	100 ± 1

C

Figura 11. Perfiles de condiciones de operación (A) y variables de estado del proceso (B) en función del tiempo, así como los parámetros descriptivos del mismo (Tabla C) para la producción en matraz. En las figuras A y los datos registrados por el equipo en una corrida. En la figura B se representa el promedio y barra de error (\pm SD) de las réplicas analíticas recabadas en una corrida. En la Tabla C, se representa el promedio y la desviación estándar del duplicado de corrida para cada parámetro. Las determinaciones a las 24hs de incubación no presentaron diferencias significativas con las 16hs, por lo que no se representa en las figuras. El rectángulo violeta y verde representan la fase lag y exponencial, respectivamente.



A



B

Parámetros	Batch
T_{lag} (h)	4
T_{exp} (h)	6
$X_{Producción}$ ($\frac{g}{L}$)	$6,9 \pm 0,2$
$X_S máx$ (%)	100 ± 2
$Y_{X/S}$ ($\frac{g}{g}$)	$0,9 \pm 0,3$
$Q_{X máx}$ ($\frac{g}{Lh}$)	$1,83 \pm 0,01$
$Q_{S máx}$ ($\frac{g}{Lh}$)	$1,1 \pm 0,2$
$\mu máx$ (h^{-1})	$0,45 \pm 0,01$
$q_{S máx}$ ($\frac{g}{gh}$)	$0,7 \pm 0,1$
Título esporas (ufc/mL)	$5,0 \times 10^8$
Eficiencia de esporulación (%)	100 ± 2

C

Figura 12. Perfiles de condiciones de operación (A) y variables de estado del proceso (B) en función del tiempo, así como los parámetros descriptivos del mismo (Tabla C) para la producción en batch. En las figuras A y los datos registrados por el equipo en una corrida. En la figura B se representa el promedio y barra de error (\pm SD) de las réplicas analíticas recabadas en una corrida. En la Tabla C, se representa el promedio y la desviación estándar del duplicado de corrida para cada parámetro. Las determinaciones a las 24hs de incubación no presentaron diferencias significativas con las 13hs, por lo que no se representa en las figuras. El rectángulo violeta y verde representan la fase lag y exponencial, respectivamente.

2.2. Estudio de cinética microbiana de la cepa ILBB592 en biorreactor en modo de operación semicontinuo (fedbatch)

2.2.1. Determinación de tolerancia máxima a glucosa para la cepa ILBB592 en MEBM

Dado el interés de evaluar la producción de las esporas de ILBB592 en MEBM en el modo de operación en fedbatch se determinó la tolerancia máxima a la glucosa para la cepa ILBB592 en este medio, con el fin de modelar la sistemática de ejecución de las alimentaciones (Figura 13).

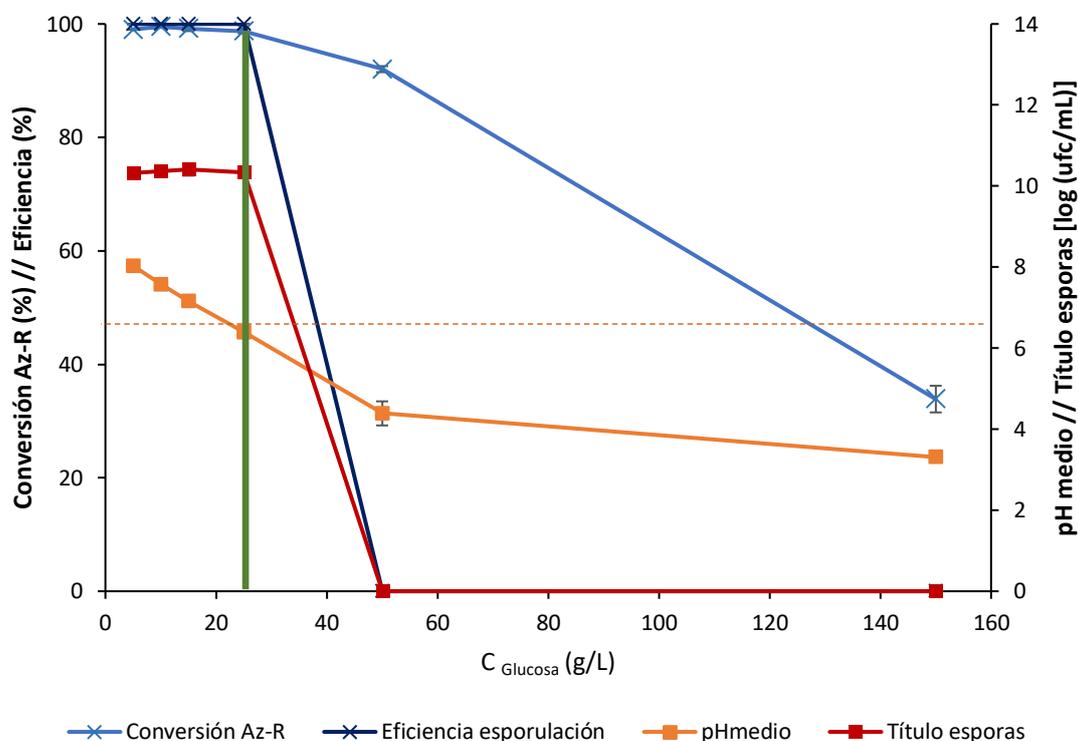


Figura 13. Gráfico de dispersión con línea de: porcentaje de conversión de Az-R, eficiencia de esporulación, pH medio, y título de esporas de ILBB592 para los distintos niveles de glucosa evaluados en MEBM. La línea continua verde vertical indica el nivel de 25g/L de glucosa. La línea punteada naranja horizontal indica el pH inicial de medio (6.5 luego de autoclavar).

En el rango de concentración de glucosa 5-25 g/L el título de esporas y la eficiencia de esporulación no presento diferencias significativas (análisis estadístico no representado en la Figura 13.), alcanzándose los valores máximos de optimización (1×10^{10} esporas/mL, 100% de eficiencia de esporulación). Cabe destacar que para la cepa ILBB139 se obtuvo un efecto negativo significativo en el rango de concentración de glucosa de 1-20 g/L en la etapa de selección de componentes de medio de cultivo a optimizar (inciso 1.2.2 de Resultados y Discusión). La cepa ILBB592 al presentar una mayor tolerancia a la glucosa respecto a la ILBB139 la vuelve más competente en la modalidad de operación fedbatch de reactor, siendo este otro atributo que destaca a ILBB592 en la etapa de bioproducción de esporas.

En el rango de concentración de glucosa de 5-25 g/L la conversión de azúcares reductores no presento diferencias significativas (análisis estadístico no representado en la Figura 13.) siendo del entorno al 99%. A su vez, para este rango de concentración de glucosa el pH del medio aumentó, siendo mayor para los menores niveles de glucosa inicial en el medio. Esto puede atribuirse al catabolismo de fuentes proteicas.

En el rango de concentración de glucosa de 25-150 g/L no hubo esporulación del cultivo. A 50 g/L de glucosa se obtiene un crecimiento que alcanza un título de 5×10^6 ufc/mL, en cambio al 150g/L se constata una inhibición del crecimiento.

En el rango de concentración de glucosa 25-150 g/L la conversión de azúcares reductores se reduce significativamente (análisis estadístico no representado en la Figura 13.), con una acidificación del medio de cultivo mayor para los niveles de glucosa superiores. Esto es consistente con la respiración de glucosa reportada para *Bacillus s.l.* a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ante un exceso de fuente de carbono. No obstante, la acidificación del medio también puede atribuirse a la fermentación de la fuente de carbono disponible, en caso de que la transferencia de oxígeno sea la limitante en el sistema de producción.

Pese a la estrategia metabólica de los *Bacillus s.l.*, de almacenar el exceso de fuente de carbono fácilmente asimilable como ácidos orgánicos para ser asimilados en la etapa de esporulación, se redujo el porcentaje de conversión del total de glucosa disponible aun constatando una reducción del pH. Esto podría atribuirse a la inhibición del crecimiento del cultivo dado el nivel de acidez que alcanza el medio. Al trabajar a 150g/L de glucosa, el cultivo alcanza un pH 3,3 y no presenta una carga bacteriana superior al límite de detección del recuento en placa por microgota (100ufc/mL) a las 48 horas de incubación.

Los resultados obtenidos proponen a la glucosa como el sustrato limitante estequiométrico de proceso, presentando una inhibición por sustrato a concentraciones mayores a 25g/L.

2.2.2. Selección de inicio y estrategia de alimentación de glucosa

Uno de los factores que definen y condicionan el éxito del modo de operación en fedbatch es la selección del inicio de la alimentación. Los momentos pueden ser: en la etapa intermedia de la fase exponencial cuando la velocidad de crecimiento específica es máxima y a un bajo nivel de biomasa; o a una instancia avanzada de la fase exponencial a una baja velocidad específica de crecimiento con alta biomasa de modo de evitar la acumulación del sustrato alimentado. Dado que la acumulación de glucosa reprime la esporulación del cultivo se optó por la segunda opción, iniciando la alimentación la cuarta hora de la fase exponencial momento al cual no se constata aún el inicio de la esporulación del cultivo (menor al 10% de eficiencia de esporulación) y el remanente de glucosa en el medio es inferior al 25% de la concentración inicial.

En la selección de la estrategia de alimentación se contempló que fuese potencialmente escalable, por lo que se decidió trabajar a un flujo de adición constante. Dado los resultados contradictorios que se reportan para esta modalidad de alimentación (inciso 2.2 de Introducción específica) se propone idear una estrategia de alimentación en la cual, el crecimiento microbiano se encuentre limitado por la disponibilidad del sustrato limitante (glucosa) y no por la capacidad de transferencia de oxígeno del equipo. El fin fue, con el fin de obtener un crecimiento microbiano orientado y reducir la formación de productos secundarios indeseados (ácidos orgánicos) asociados a una sección del crecimiento del cultivo (Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1996; Hollman *et al.*, 2004). Para ello se propone trabajar a una velocidad específica constante inferior a la velocidad máxima constatada a las condiciones máximas de transferencia de oxígeno del equipo. La estrategia de alimentación a flujo constante con una solución de alimentación en la cual la concentración del sustrato limitante varíe en forma asintótica en el tiempo, responde al modelo desarrollado en el Apéndice 7.

Otro aspecto para destacar como crítico y controversial en la bioproducción de esporas de *Bacillus s.l.* es la dependencia o no del oxígeno disponible en el inicio de la esporulación. Varios

trabajos proponen que tanto el inicio como el proceso de esporulación es más eficiente en condiciones aerobias (Mignone *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1993; Boniolo *et al.*, 2012), reportando que en condiciones anaerobias se alcanza la liberación de enzimas hidrolíticas (Etapa II) pero se detiene el proceso en alguna etapa subsiguiente sin culminar con la formación del esporangio (Espinosa *et al.*, 2005). Sin embargo, se reportan eficiencias de esporulación del 100% para una etapa batch sucesiva a la de fedbatch en la que la transferencia de oxígeno del sistema es nula y solo se mantiene un nivel basal de agitación (Sarrafzadeh *et al.*, 2014; Abbas *et al.*, 2014). A su vez, las esporas producidas en condiciones anaerobias se reportan con una mayor resistencia térmica y a condiciones extremas de acidez (Abbas *et al.*, 2014). Por lo que se propone una segunda etapa en modo de operación batch contigua a la de alimentación en que se transfiera oxígeno al sistema para dar lugar al inicio de la esporulación del cultivo. Y por último, se propone una etapa con un nivel basal de agitación con el fin de reducir el costo del proceso, el riesgo de que el cultivo se espume y mejorar la calidad de la spora producida.

2.2.3. Estudio de cinética microbiana

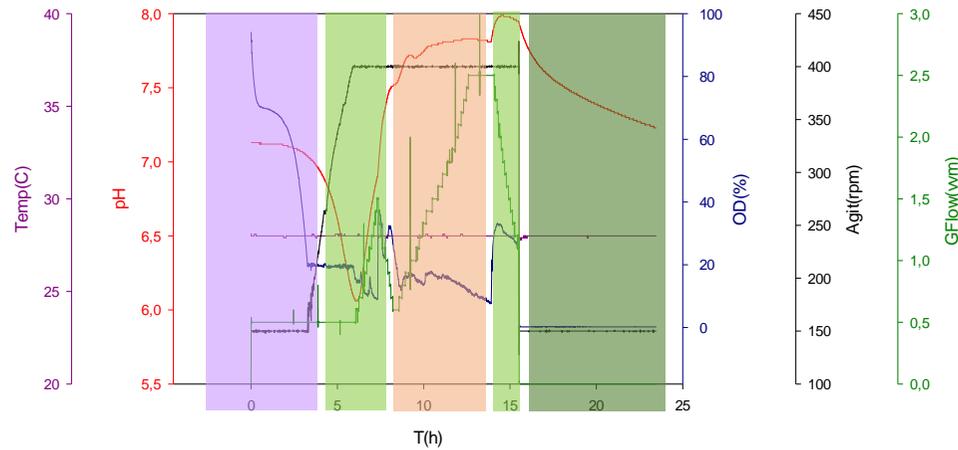
En la Figura 14 se representan los perfiles de condiciones de operación y variables de estado del proceso en función del tiempo, así como los parámetros descriptivos del mismo para la producción en el biorreactor en modo de operación fedbatch.

El cultivo se inició con en un modo de operación en batch en el cual se constata la fase *lag* y exponencial ya discutidas (Inciso 2.1 de Resultados y Discusión).

Al inicio de la etapa de alimentación (8 horas) se constata una reducción abrupta del OD (de 37% a 8%) asociado al inicio de la disponibilidad del sustrato limitante (Kunpeng *et al.*, 2015). Durante esta etapa de alimentación el OD se estabiliza a 16% durante las primeras 4 horas de alimentación, con una reducción paulatina del OD hasta 8% en las últimas 2 horas de esta etapa. Por esta razón se decide cesar la alimentación para que el crecimiento microbiano no ocurra en condiciones limitantes de oxígeno. Esto no ocurrió dado que el perfil de pH se mantuvo constante durante toda la etapa de alimentación (pH=7.8) sin haber una fermentación de un exceso de glucosa.

El nivel de glucosa en la etapa de alimentación inició a 0.5g/L e incrementó paulatinamente hasta 1g/L. El nivel basal de glucosa no inhibe el inicio de la esporulación en la segunda etapa batch con transferencia de oxígeno. En la tercera etapa batch sin transferencia de oxígeno el nivel de glucosa en el medio se mantiene constante pese a una reducción del pH ($pH_{Final}=7.3$), lo cual puede ser indicativo de la fermentación de parte de la fuente de carbono disponible. El sistema operado en batch y fedbatch consumieron 10g y 28.5g de glucosa para un mismo volumen final de 2L de cultivo.

Mediante esta estrategia de alimentación se obtuvo un crecimiento microbiano a una μ constante y menor que $\mu_{Máx}$ constatada en batch, en la cual no se constata una fermentación de fuente de carbono alimentada. De este modo se alcanza, un cultivo con un orden superior al logrado en el modo de operación en batch con una eficiencia de esporulación absoluta.

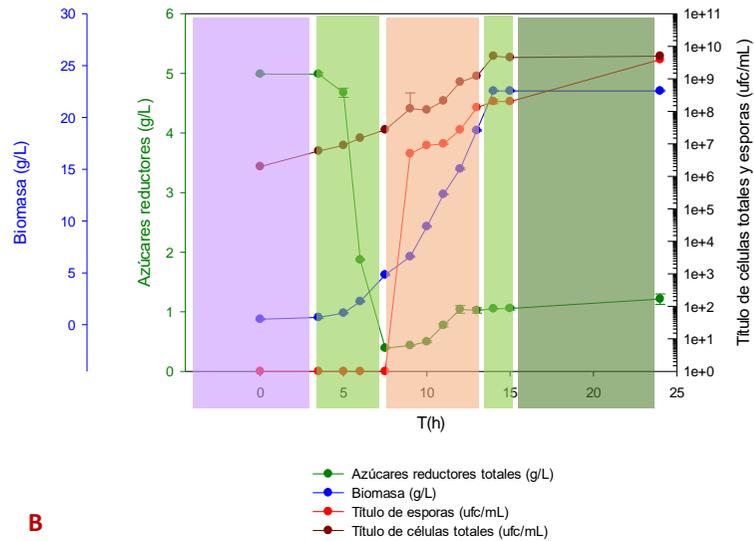


A

Parámetros	Batch
T_{lag} (h)	4
T_{exp} (h)	4; 6
$X_{Producción}$ ($\frac{g}{L}$)	$23,1 \pm 0,4$
$X_S máx$ (%)	96 ± 2
$\mu máx$ (h^{-1})	0,48; 0,33
Título esporas (ufc/mL)	$5,0 \times 10^9$
Eficiencia de esporulación (%)	100 ± 2

C

Figura 14. Perfiles de condiciones de operación (A) y variables de estado del proceso (B) en función del tiempo, así como los parámetros descriptivos del mismo (Tabla C) para la producción en fedbatch. En las figuras A y los datos registrados por el equipo en una corrida. En la figura B se representa el promedio y barra de error (\pm SD) de las réplicas analíticas recabadas en una corrida. En la Tabla C, se representa el promedio y la desviación estándar del duplicado de corrida para cada parámetro. El rectángulo violeta representa la fase *lag*; los rectángulos verdes claro y el oscuro las etapas en modo de operación batch con y sin transferencia de oxígeno, respectivamente; y el rectángulo naranja la etapa en modo de operación fedbatch.



B

● Azúcares reductores totales (g/L)
 ● Biomasa (g/L)
 ● Título de esporas (ufc/mL)
 ● Título de células totales (ufc/mL)

2.2.4. Ajuste de datos experimentales al modelo propuesto

Durante la etapa de alimentación la curva de crecimiento microbiano se ajusta a una cinética de *Monod* con una velocidad específica de crecimiento constante y menor a la constada en la etapa batch (Figura 15.). La relación de la biomasa producida en función del tiempo presentó un buen ajuste con los datos experimentales en las primeras 4 horas de alimentación. El modelo de crecimiento microbiano de *Monod* también se constata para este período. De acuerdo con lo ya discutido, el OD en las últimas dos horas de alimentación declina respecto del valor establecido, dando cuenta del final del estado estacionario alcanzado en la etapa de alimentación.

En la Figura 15. se representan las principales relaciones de regresión que definen la estrategia de alimentación ensayada así como el ajuste de los datos experimentales obtenidos.

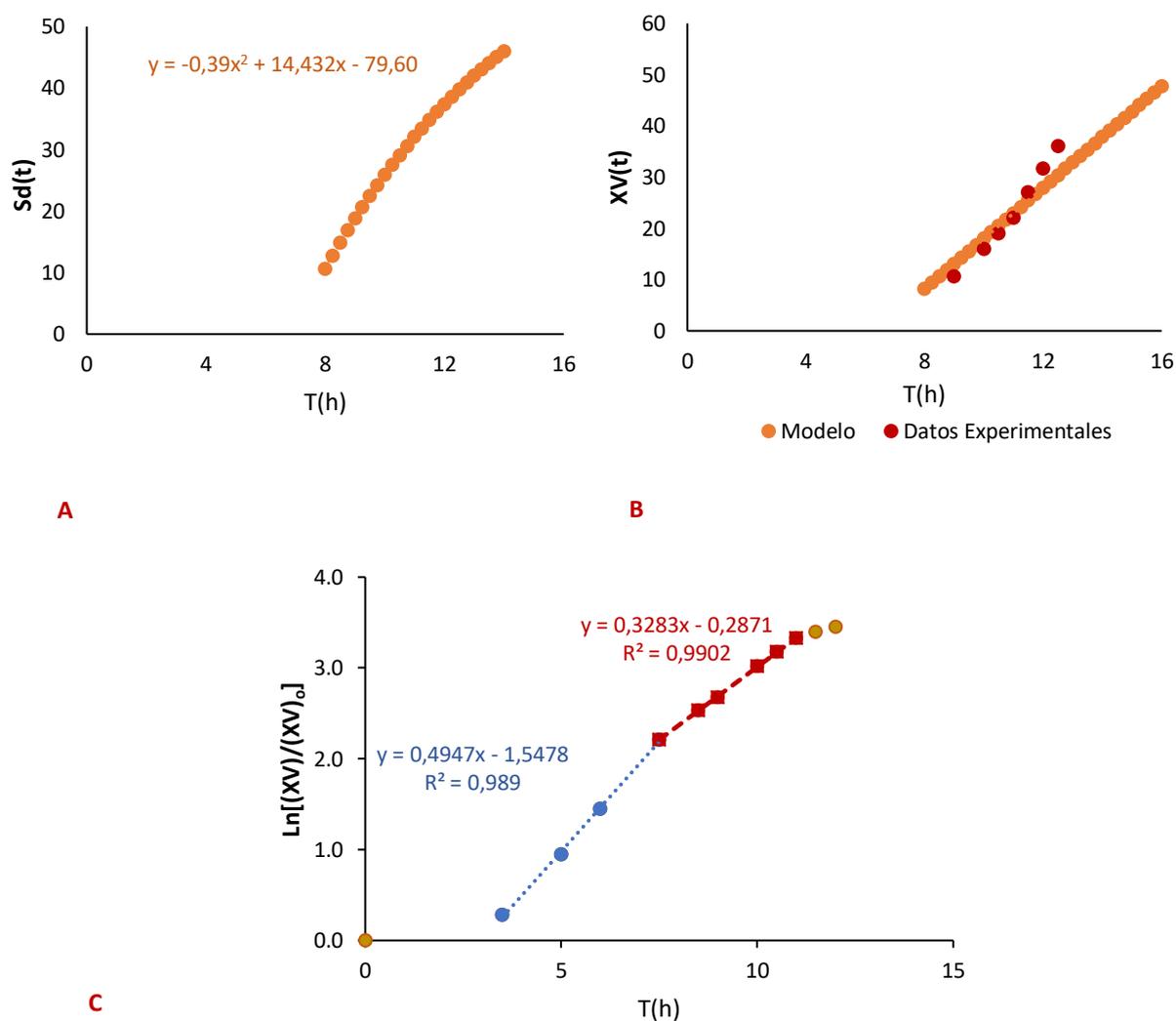


Figura 15. Variación de concentración de glucosa en reservorio de dilución en función del tiempo (A); Biomasa producida en función del tiempo predicha por el modelo y datos experimentales (B); relación logarítmica de biomasa producida en función del tiempo para etapa batch y fedbatch (C) con sus correspondientes modelos de regresión lineal.

2.2.5. Oportunidades de mejora del proceso en base al modelo obtenido

Mediante esta estrategia de alimentación se optimizó un proceso de producción de esporas para la cepa ILBB592, con potencial escalable ($k_{La} = 2158h^{-1}$) alcanzando un título de esporas que se encuentra en un orden satisfactorio para el desarrollo de un bioinsumo.

Cabe destacar que no existen reportes de bioproducción en reactor a escala de laboratorio de esporas de *Bacillus megaterium*.

3. Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas y líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592 producido en un biorreactor de escala de laboratorio

3.1. Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones líquidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592

La carga de esporas inicial en las ocho formulaciones líquidas ensayadas fue un orden inferior a lo esperado, dado la carga inicial del cultivo y el factor de dilución inherente al proceso de formulación (Tabla 6.). Esta pérdida podría ser atribuida a la manipulación del cultivo durante la formulación.

Las formulaciones líquidas T4, T5 y T6 redujeron un orden el título de esporas germinables a los dos meses de conservación. Esta también fue la tendencia que mantuvo el cultivo de esporas conservado a 22°C sin ningún agregado (T1). Para ese mismo período de conservación la formulación T8 redujo dos órdenes la carga de esporas germinables. En el caso de la formulación T3 también se constató una reducción de un orden pero a los cuatro meses de conservación. Las formulaciones con mejor desempeño fueron T2 y T7, las cuales conservaron la carga inicial de esporas durante los 4 meses de evaluación (Tabla 6.).

Solo las formulaciones T2 y T7 mantuvieron un título de en torno a la factibilidad de implementación del producto logrado (9.0×10^7 ufc/mL y 2.0×10^8 ufc/mL) (Tabla 6.). Al considerar que para inocular un kilogramo de semillas de soja (600000 unidades de semilla) a una carga de 10^5 ufc/semilla, se deben aplicar 400mL del formulado líquido. Este cálculo no contempla la eficiencia del proceso de inoculación de semillas, por lo que se considera que el título de esporas alcanzado en estos formulados se encuentra ajustado para su implementación en la práctica.

El control externo de esporas secas y lavadas para este lote de producción redujo un orden el título de esporas al mes de conservación (Tabla 6.), con una tendencia semejante a FS3 (inciso 3.2). La centrifugación y lavado de esporas presentó un marcado desempeño superior respecto a las formulaciones líquidas ensayadas.

Tabla 6. Carga de esporas de las ocho formulaciones líquidas y el control externo a los 0, 1, 2 y 4 meses de conservación a 22°C

T(meses)	CE	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	11,4 ^a	8,7 ^a	8,2 ^a	8,3 ^a	8,2 ^a	8,3 ^a	8,4 ^a	8,3 ^a	8,3 ^a
1	10,5 ^b	8,3 ^b	8,2 ^a	8,2 ^a	7,6 ^b	7,8 ^b	7,7 ^b	8,4 ^a	7,2 ^b
2	10,4 ^b	7,9 ^b	8,2 ^a	8,0 ^a	7,1 ^c	7,3 ^c	7,0 ^c	8,4 ^a	6,0 ^c
4	10,5 ^b	7,5 ^c	7,9 ^a	6,9 ^b	7,3 ^c	7,4 ^c	7,0 ^c	8,5 ^a	6,0 ^c

Los valores presentados son el promedio de dos réplicas biológicas. Para el control externo (CE, log (ufc/g)) y cada formulación líquida log(ufc/mL) se efectuó un ANOVA y prueba de comparación de medias LSD-Fisher entre la carga de esporas a los distintos tiempos de conservación. En una columna carga de esporas con misma letra no presentaron diferencia significativa para un $p \leq 0.05$.

La elección de estos tres factores de estudio (FL1, FL2 y FL3) tuvo como objetivo el reducir la actividad del agua libre del formulado y estabilizar el coloide mediante una acción surfactante de los compuestos.

A partir de la carga de esporas obtenida a los cuatro meses de conservación (tiempo al cual se constató una mayor diferenciación de los formulados) se efectúa un ANOVA en el cual los tratamientos son definidos por la combinación de FL1, FL2 y FL3 a los dos niveles de trabajo ensayados. A partir del cuadro de análisis de varianza (Apéndice 4.13.2) se corrobora una significancia de los efectos principales de FL1 (Polivinilpirrolidona (PVP)) y FL2 (Glicerina). Mediante un estudio de interacción de los factores FL1 y FL2 se obtuvo una interacción positiva y negativa, respectivamente con la variable respuesta en estudio. Las interacciones de segundo orden también fueron significativas, aunque explican menos del 10% del error total del modelo (Apéndice 4.13.2).

El PVP con un efecto positivo en la conservación de esporas en medio líquido se le reporta las capacidades de: reducir la actividad de agua libre, presentar acción surfactante y reducir la actividad de compuestos tóxicos que pueden generarse durante la fermentación (Sridhar *et al.*, 2003; Velineni *et al.*, 2011; Ramyabharathi *et al.*, 2016). Esto, es relevante al no efectuar una remoción de metabolitos que quedan en el cultivo y podrían generar un efecto inhibitorio en la germinación de la semilla y/o crecimiento de la planta (Burges *et al.*, 1998).

En el caso del glicerol (constituyente de la glicerina) se encontraron referencias contradictorias de su posible efecto en la conservación de esporas en medio líquido. Por una parte, se referencia ser un componente con capacidad surfactante y de protección osmótica ante una alta reducción de la actividad de agua y es un constituyente reportado para formulaciones líquidas de esporas de *Bacillus* spp. (Sridhar *et al.*, 2003; Ramyabharathi *et al.*, 2016). A su vez, la glicerina es uno de los principales productos secundarios en la producción del biodiesel y su disponibilidad en el mercado es alta, a un costo accesible. Porras *et al.*, 2017 reportan para una cepa de *Bacillus megaterium* la capacidad de crecer con glicerol como única fuente de carbono y energía. Por ello, la disponibilidad de una fuente de carbono podría explicar una inducción de la germinación de esporas y la reducción de su estabilidad en el tiempo, tal como fue constatado en el ensayo.

3.2. Estudio de estabilidad en el tiempo de formulaciones sólidas del cultivo de esporas de la cepa ILBB592

La carga inicial de esporas para las formulaciones FS1 y FS2 fue un orden inferior a lo esperado, dado la carga del cultivo a formular y el factor de dilución inherente a la formulación. No obstante, FS3 presentó una carga inicial coherente con lo esperado (Figura 16).

Los formulados FS3 y FS1 redujeron un orden al mes y dos meses de conservación, respectivamente. Esta reducción del título de esporas germinables se mantuvo constante en la totalidad del tiempo de ensayo. La carga de esporas del FS2 no presentó diferencias significativas entre los distintos tiempos de estudio (Figura 16).

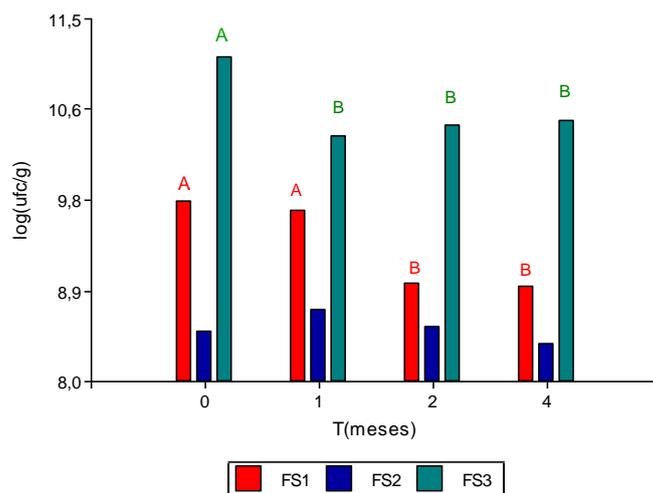


Figura 16. Carga de esporas ($\log(\text{ufc/g})$) de las tres formulaciones sólidas a los 0, 1, 2 y 4 meses de conservación a 22°C. Para cada formulación sólida se efectuó un ANOVA y prueba de comparación de medias LSD-Fisher entre la carga de esporas a los distintos tiempos de conservación. Para cada formulado cargas de esporas con misma letra no presentaron diferencia significativa para un $p \leq 0.05$. El formulado FS2 no se obtuvo diferencias significativas para ninguno de los tiempos de conservación ensayados.

Contemplando la carga de esporas máxima alcanzada a los cuatro meses de conservación para las tres formulaciones ensayadas, solo FS3 alcanzó un título de en torno a la aplicabilidad ($2.3 \times 10^{10} \text{ufc/g}$). Para inocular un kilogramo de semillas de soja (600000 semillas), a una carga de 10^6ufc/semilla se deben aplicar 26g del formulado sólido. No obstante, es de destacarse que para esta formulación no se obtuvo una estabilidad durante los cuatro meses de estudio y su potencial escalabilidad a nivel industrial implica una considerable inversión en equipamiento de centrifugación.

La formulación FS2 si bien no alcanza un título en torno a la aplicabilidad ($1.7 \times 10^8 \text{ufc/g}$), presentó estabilidad en la carga de esporas en los cuatro meses analizados. Sin embargo, es de destacar el consumo de un recurso finito no renovable (turba) y el costo de acceder a este soporte sólido estéril. Hay un reporte de formulación de esporas de *Bacillus subtilis* por impregnación de turba estéril, con una reducción de dos órdenes en la carga de esporas para igual tiempo y condiciones de preservación (El-Hassan *et al.*, 2006).

La formulación FS1 no alcanzó a los cuatro meses de preservación un título adecuado para la implementación de este producto ($8.3 \times 10^8 \text{ufc/g}$), implicando impregnar 725g del formulado sólido por kilogramo de semilla. Este formulado fue ideado con el fin de adsorber la espora a un soporte sólido inerte de disponibilidad nacional, como el caolín, para obtener un producto final con baja actividad de agua, en base reportes de factibilidad para esporas de *Bacillus* spp. (Omer *et al.*, 2010).

Las interacciones que permiten que esta adsorción tenga lugar son:

-Interacciones electroestáticas: importantes en el proceso de adhesión de la espora (Chung *et al.*, 2010) y carga negativa asignable a la corteza de la espora dada la alta proporción de grupos carboxilos que presenta en esta cubierta proteica (Nishihara *et al.*, 1981). La carga de la arcilla también es negativa dada la presencia de oxígenos sin valencia completa; por lo que adición de un agente coagulante de carga positiva (cationes metálicos constituyentes del medio de cultivo) desestabiliza el coloide y permite que la coagulación tenga lugar.

-Interacciones hidrofóbicas: es bien conocido el carácter hidrofóbico de la cubierta de la espora (Doyle *et al.*, 1984). Por ello se incorpora un adsorbente de alta superficie activa (50-2500 m²/g) como el carbono activo que presenta un tamaño de poro de amplio rango (2-1000 nm). El diámetro de la espora de *Bacillus* spp. es 0.85µm (Xu-Zou *et al.*, 2017).

Por último, la incorporación de PVP se efectúa ya que es un polímero que favorece la agregación y lubricación de formulados sólidos, capturando agua libre (Borges, 1998).

3.3. Conclusiones y perspectivas en la formulación de esporas

En este primer ensayo preliminar de formulación de esporas se constató un mejor desempeño de la formulación sólida respecto a la líquida, obteniendo para ambos casos formulaciones con una carga de esporas en torno a la factibilidad de implementación del producto final.

Para las formulaciones sólidas se obtuvo un mayor título de esporas mediante la estrategia de centrifugación del medio de cultivo. La formulación en base a caolín nacional si bien no se tuvo un alto desempeño, sería un interesante objeto de estudio en un ensayo posterior con el fin de optimizar la adhesión de la espora. Numerosos factores influyen en este proceso tales como: relación cultivo/caolín, nivel de acidez, concentración de agente coagulante, entre otros.

En el caso de las formulaciones líquidas se obtuvo un mayor título de esporas y estabilidad para las formulaciones T2 y T7 que tienen agregado de PVP y glutamato de sodio (Apéndice 4.13.1). La evaluación de formulaciones líquidas no acuosas y formulaciones acuosas en atmósfera de nitrógeno serían dos factores por ensayar para mejorar el desempeño de este medio de formulación de esporas.

D. CONCLUSIONES

Se optimizó el medio de cultivo de esporulación para las cepas ILBB592 y ILBB139 a partir de materias primas disponibles en el mercado, alcanzando título de esporas de 9,3 y 10,3 log(ufc/mL), respectivamente.

Se optimizó las condiciones de producción de ILBB592 mediante el modo de operación en fedbatch con una estrategia de alimentación escalable y se alcanzó un título de esporas que se encuentra en un orden satisfactorio para el desarrollo de un bioinsumo ($5,0 \times 10^9$ ufc/mL).

Se obtuvieron formulaciones sólidas y líquidas con una carga de esporas en torno a la factibilidad de implementación del formulado logrado. Como primer ensayo preliminar de estudio de formulación de esporas se definieron nuevas directrices para incrementar el desempeño y factibilidad de escalado de este proceso.

E. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbas, A.A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P. (2014). A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. *J Microbiol Methods*, 105:54-58.

Almeida, M., Erthal, R., Padua, E., Silveira, L., Amélia, L. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76(5):965-977.

Amin, G., Alotaibi, S., Youssef, N.A. (2008) Optimization of a fermentation process for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2465.

Bailey J., Ollis, D. *Biochemical engineering fundamentals*. Ed. McGraw-Hill. 2da Edición, 1992.

Ben Khedher, S., Kamoun, A., Jaoua, S., Zouari, N. (2011). Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. *New Biotechnology*, 28 (6), pp. 705-712.

Benoit, T.G., Wilson, G.R., Baugh, C.L. (1990). Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Applied Microbiology*, 10(1): 15-18.

Berbert-Molina, M.A., Prata, A.M.R., Pessanha, L.G., Silveira, M.M. (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1397-1404.

Biedendieck R. (2016) A *Bacillus megaterium* System for the Production of Recombinant Proteins and Protein Complexes. *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 896, 97-113.

Boniolo, F.S., Rodrigues, R.C., Prata, A.M.R., López, M.L., Jacinto, T., Da Silveira, M.M., Berbert-Molina, M.A. (2012) Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: Bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94 (3), pp. 625-636.

Brill, E., Hannemann, F., Zapp, J. (2014). A new cytochrome P450 system from *Bacillus megaterium* DSM319 for the hydroxylation of 11-keto- β -boswellic acid (KBA). *Appl Microbiol Biotechnol* 98 (4), pp 1703–1717.

Bryant, J.E. (1994). Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 49:31-35.

Burges, H.D. (1998). *Formulation of Microbial Biopesticides*. Springer Science-Business Media, B.V.

Chen, ZM., Li, Q., Liu, HM. (2010) Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1353.

Cho, J.H., Kim, Y.B., Kim, E.K. (2009). Optimization of culture media for *Bacillus* species by statistical experimental design methods. *Korean J Chem Eng* 26:754–759.

Chung, E., Yiacoumi, S., Lee, I., Tastsouris, C. (2010). The Role of the Electrostatic Force in Spore Adhesion. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 6209–6214.

- David, F., Steinwand, M., Hust, M., Bohle, K., Ross, A., Dübel, S., Franco-Lara, E. (2011). Antibody production in *Bacillus megaterium*: Strategies and physiological implications of scaling from microtiter plates to industrial bioreactors. *Biotechnology Journal*, 6 (12), pp. 1516-1531.
- Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12:4, 214-219.
- Doyle, R. J., Nedjat-Haiem, F., and Singh, J. S. (1984). Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr. Microbiol.*, 10, 329–332.
- Dulmage, H.T., Yousten, A.A., Singer, S., Lacey, L.A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, p 42.
- El-Hassan, S. A. Gowen, S. R. (2006). Formulation and Delivery of the Bacterial Antagonist *Bacillus subtilis* for Management of Lentil Vascular Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. *Journal of Phytopathology*, 15(3): 148-155.
- Elsayed, E.A., Othman, N.Z., Malek, R., Awad, H.M., Wu, K., Aziz, R., Wadaan, M.A., Hesham A. (2014) Bioprocess development for enhanced spore production in shake flask and pilot scale bioreactors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in submerged culture. *J. Pure & Appl. Microbiol* 4(8): 2773-2783.
- Espinosa-de-los Monteros, J. Martinez, A. Valle, F. (2001). Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 379-384.
- Farrera, R., Pérez-Guevara, F. & de la Torre, M. (1998). Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol* 49 (6):758–765.
- Fravel, D. R., Connick, W. J. Jr. and Lewis, J. A. (1998). Formulation of microorganisms to control plant diseases, 187–202 pp. In: Burges, H. D. (Ed.). *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Grage, K., McDermott, P. & Rehm, B.H.A. (2017). Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials. *Microb Cell Fact.* 16: 211.
- Grossman AD (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Ann. Rev. Genetics* 29:477-508.
- Guérin, A., Dargaignaratz, C., Broussolle, V., Clavel, T., Nguyen-The, C. (2016). Combined effect of anaerobiosis, low pH and cold temperatures on the growth capacities of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Food Microbiol*, 59:119-23.
- Hageman, J., Shankweiler, G., Wal, I.P., Franich, K., McCowan, G., Cauble, S., Grajeda, J., Quinones, G. (1984). Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation and extracellular protease production. *J Bacteriol* 160:438–441.
- Hollmann, R., Wolf-Dieter Deckwer, W. D. (2004). Pyruvate formation and suppression in recombinant *Bacillus megaterium* cultivation. *Journal of Biotechnology*, 11(1): 1, 9-96.

- Huang, J., Li, J., Wang, G. (2016). Production of a microcapsule agent of chromate-reducing *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 and its application in remediation of chromate-spiked soil. *SpringerPlus*, 5 (1), art. no. 561
- Ireton, K, J Shengfang, D Grossman, AL Sonensheim (1995). Krebs Cycle function is required for activation of the SpoOA transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2845-2849.
- Jin S, AL Sonenstein (1994). Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J. Bact.* 176: 4669-4679.
- Jin S, PA Levin, K Matsuno, AD Grossman, AL Sonenshein (1997). Deletion of the *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. *J. Bacteriol.* 179:4725-4732.
- Kang, B.C., Lee, S.Y. & Chang, H.N. (1992) Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture *Biotechnol Lett* 14(8):721–726.
- Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019 *Bioprocess Biosyst Eng* 36 (10):1463–1474.
- Kraemer-Schafhalter, A., Moser, A. (1996) Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 14 (3):139-144.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (3):240-245.
- Leighton, T. J., Doi, R. H. (1971). The Stability of Messenger Ribonucleic Acid during Sporulation in *Bacillus subtilis* *J. Biol. Chem.* 246:3189-3195.
- Liu, J., Zhao L., Ma D., Sun X., Liu X. (2018) Optimization of Solid Fermentation Process of *Bacillus megaterium* and Its Application in Crop Growth. *Advances in Applied Biotechnology*. 444:329-338.
- Liu, B.-L., Tzeng, Y.-M. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, 18 (6):413-418.
- López, J.A., Naranjo, J.M., Higuera, J.C. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnol Bioproc E.* 17 (2):250–258.
- López-y-López, V. E., De la Torre, M. (2005). Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:254–260.
- Lumsden, R.D., J.A. Lewis and D.R. Fravel (1995). Formulation and Delivery of Biocontrol Agents for Use against Soilborne Plant Pathogens. In: *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*, Hall, F.R. and J.W. Barry (Eds.). American Chemical Society, Washington, 125-139.
- Lüthy, P., Cordier, J.L., Fisher, H.M. (1982). *Microbial and viral pesticides*. pp. 35-74. Marcel Dekker, NY, USA.

- Marx, M., Ulrich, K. (2017). Spore inactivation in differently composed whey concentrates. *International Dairy Journal*, 76:1-9.
- Mignone, C.F., Avignone-Rossa, C. (1996). Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 78-84.
- Mignone, C.F., Avignone-Rossa, C. (1993). A simple method for designing fed-batch cultures with linear gradient feed of nutrients. *Process Biochemistry*, 28(6):405-410.
- Morizet, S., Mingeau, M. (1976). Influence des facteurs du milieu sur l'absorption hydrique (étude effectuée sur Tomate décapitée en exudation). I. Facteurs nutritionnels, *Ann. Agron.* 27:183-205.
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi Rouhani, S. M., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4(3), 179–183.
- Nishihara, T., Yoshimoto, I., Kondo, M. (1981). Studies on the bacterial spore coat. IX. The role of surface charge in germination of *Bacillus megaterium* spores. *Microbiol Immunol*, 25(8):763-71.
- Omer, A.M. (2010). Bioformulations of *Bacillus* Spores for using as Biofertilizer. *Life Science Journal*, 7(4):124-131.
- Porras, M.A., Vitale, C., Villar, M.A., Cubitto, M.A. (2017). Bioconversion of glycerol to poly(HB-co-HV) copolymer in an inexpensive medium by a *Bacillus megaterium* strain isolated from marine sediments. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 1-9.
- Posada-Urbe, L.F., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess Biosyst Eng*, 38(10):1879-1888.
- Ramyabharathi, S.A., Rajendran, L., Karthikeyan, G. (2016). Liquid formulation of endophytic *Bacillus* and its standardization for the management of *Fusarium* wilt in tomato. *Bangladesh Journal of Botany*, 45(2), 283-290.
- Rowe, G.E., Margaritis, A., Wei, N. (2003). Specific Oxygen Uptake Rate Variations during Batch Fermentation of *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* HD-1. *Biotechnology Progress*, 19 (5), pp. 1439-1443.
- Sabra, W., Abou-Zeid, D.M. (2008). Improving Feeding Strategies for Maximizing Polyhydroxybutyrate Yield by *Bacillus megaterium*. *Research Journal of Microbiology*. 3 (5): 308-318.
- Sarrafzadeh, M.H., Schorr-Galindo, S., La, H.J., Oh, H.M. (2014). Aeration effects on metabolic events during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *J Microbiol*, 52(7), 597-603.
- Schaeffer P, J Millet, J Aubert 1965. Catabolite repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54:704-711.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., and Jackson, M.A. (2004), Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases', *Phytopathology*, 94, 1267-1271.
- Schleifer KH (2001) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmicutes [sic] Gibbons and Murray 1978,5). In: Garrity GM (ed) *Bergeys*. Springer, Berlin.

- Silva, F. C. (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes (191 – 233). EMBRAPA: 2.
- Sindhu, I., Chhibber, S., Capalash, N. (2006) Production of Cellulase-Free Xylanase from *Bacillus megaterium* by Solid State Fermentation for Biobleaching of Pulp 53 (2), 167–172.
- Sorokulova, I.B., Krumnow, A.A., Pathirana, S., Mandell, A.J., Vodyanoy, V. (2008). Novel Methods for Storage Stability and Release of *Bacillus* Spores. *Biotechnol Prog*, 24(5):1147-1153.
- Sreekumar, G., Krishnan, S. (2010). Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 9 (47), pp. 8078-8084.
- Sridhar, V., Brahmaprakash, G.P., Hegde, S.V. (2004). Development of a Liquid Inoculant Using Osmoprotectants for Phosphate Solubilizing Bacterium (*Bacillus megaterium*). *Karnataka J. Agri. Sci.*, 17(2), 251-257.
- Sundaram, A. (1995). Physical properties and evaporation characteristics of nonaqueous insecticide formulations, spray diluents and adjuvant/co-solvent mixtures. *Journal of Environmental Science and Health*, 20(1):113-138.
- Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C. (2006). Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29, pp. 338-350.
- Tobisch S, D Zuhlke, J Bernhardt, J Stulke, M Hecker (1999). Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:6996-7004.
- Vallejo, F., González, A., Posada, A., Restrepo, A., Orduz, S. (1999). Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin by batch and fed-batch culture. *Biotechnology Techniques*, 13 (4), pp. 279-281.
- Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T. (2007) *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76 (5), 957–967.
- Velineni, S., Brahmaprakash, G.P. (2011). Survival and Phosphate Solubilizing Ability of *Bacillus megaterium* in Liquid Inoculants under High Temperature and Desiccation Stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(5), 795-802.
- Vu, K.D., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. (2010). Batch and fed-batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* using starch industry wastewater as fermentation substrate. *Bioprocess Biosyst Eng* 33 (6), pp 691–700.
- Wang, X., Li, Z., Li, X., Qian, H., Cai, X., Li, X., & He, J. (2016). Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism Is Unrelated to the Sporulation and Parasporal Crystal Protein. Formation in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 836.
- Wright, A.F., Bailey, J.S. (2001). Organic carbon, total carbon, and total nitrogen determinations in soils of variable calcium carbonate contents using a Leco CN-2000 dry combustion analyzer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32:3243-3258.
- Xu-Zhou, K., Wisnivesky, F., Wilson, D.I., Christie, G. (2017). Effects of culture conditions on the size, morphology and wet density of spores of *Bacillus cereus* 569 and *Bacillus megaterium* QM B1551. *Lett Appl Microbiol*, 65(1):50-56.

Yang, X.M., Wang, S.S. (2000). Phase-specific optimization of multiple endotoxin protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 71-76.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El cultivo de soja se ubica entre los principales productos de exportación del país desde hace unos años correspondiendo al 13% de la totalidad de bienes exportados para el 2017 (ADAU, 2017). Dada la necesidad de suplir los requerimientos nutricionales de este cultivo, se constata en forma concomitante una tendencia estable a ascendente de la importación de fertilizantes fosfatados al país (1,4% de las compras externas, sin considerar el petróleo y derivados (ADAU, 2017)). Como efecto colateral del incremento de la soja y la agricultura en general, se ha observado el avanzado estado trófico en numerosos sistemas acuáticos del país, que han incrementado la frecuencia de la floración de cianobacterias, como consecuencia de la erosión del fósforo inmovilizado en el suelo.

Para el cultivo de soja se destaca desde la década del 70 la inoculación de semillas con bradyrizobios para suplir la limitante de nitrógeno de este cultivo y leguminosas en general. La alta adopción de esta tecnología sugiere recurrir a la co-inoculación con microorganismos que sean capaces de regular la fitodisponibilidad de P en el suelo como estrategia alternativa a la fertilización fosfatada.

Varios son los géneros bacterianos asociados al ciclado del P inorgánico y orgánico del suelo. Entre los más estudiados se destacan: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia* (Behera *et al.*, 2014). Cabe destacar, que la mayoría de los esfuerzos de investigación a nivel nacional y mundial se han dirigido a estudiar la movilización de las fracciones inorgánicas, desestimando el reservorio de P en la fracción orgánica, pese a representar el 50% del contenido total de fósforo en el suelo ((Tisdale *et al.*, 1993). Miembros de *Bacillus s.l.* presentan un alto potencial para ser empleados en el desarrollo de un biofertilizante dada su capacidad de formar estructuras de resistencia, lo cual le confiere una ventaja competitiva ante otros géneros bacterianos, tanto en la sobrevivencia en condiciones ambientales adversas como en largos períodos de acopio del formulado de esporas.

La estrategia seguida en este trabajo permitió identificar 15 especies pertenecientes al grupo *Bacillus s.l.*, de las cuales 11 fueron capaces de mineralizar P orgánico y/o solubilizar P inorgánico. Los grupos más representados fueron la especie *Bacillus thuringiensis* y el taxa *Bacillus megaterium/aryabhattai*, asignando a éstas la capacidad de producir ácidos orgánicos y fitasas extracelulares como estrategias para la movilización del fósforo *in vitro*.

En el presente trabajo se constató una mayor abundancia de aislamientos con la capacidad funcional de interés a partir de raíces de plantas de soja y suelo rizosférico, en comparación con los recabados a partir de suelo no rizoférico de sitios sin historia previa en este cultivo. Una eventual presión de selección ejercida por la planta y/o condiciones de cultivo sobre los microorganismos de la rizósfera pudo haber seleccionado cepas cultivables pertenecientes al grupo *Bacillus s.l.* con la capacidad de mineralizar P orgánico y/o solubilizar P inorgánico.

Sin embargo, la estrategia selección del presente estudio permitió mantener relativamente representada las especies recabadas en la colección inicial en los sucesivos niveles de *screening*. La importancia de esto radica en incrementar las posibilidades de expresión de otras capacidades funcionales de interés que incrementen la probabilidad de éxito de la estrategia biotecnológica. Entre ellas se destaca la capacidad de: colonizar la raíz, producir fitohormonas, formar biofilm, actuar como agente de control biológico, entre otras. Si bien en el presente trabajo no se efectuó el estudio de estos atributos, ni el efecto directo de su inoculación sobre la nutrición de la planta, los mismos fueron efectuados en paralelo en el marco del proyecto. El desempeño diferencial obtenido de las cepas ILBB592 y ILBB139 (*Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*) en estudios de absorción de fósforo en planta de soja co-inoculadas con

bradyrizobios llevo a su selección para la etapa de bioproducción. Las cepas ILBB592 y ILBB139, si bien mostraban la funcionalidad de interés no habían sido las de mejor desempeño durante la movilización de *P in vitro*.

En la etapa de optimización de bioproducción y formulado de esporas, se optimizó el medio de cultivo de esporulación de las dos cepas seleccionadas. La cepa ILBB592 presentó un mayor título de esporas y tolerancia a la glucosa respecto a la ILBB139. Esto vuelve a la cepa ILBB592 más competente en la modalidad de operación fedbatch de reactor, siendo este el modo de operación del reactor requerido para sobrellevar la demanda de oxígeno del cultivo aun operando el equipo en su máxima capacidad de transferencia de oxígeno.

Finalmente, para la cepa ILBB592 se obtuvieron formulaciones sólidas y líquidas con una carga de esporas en torno a la factibilidad de implementación del formulado logrado. El mayor desempeño de las formulaciones sólidas se logró con la centrifugación, lavado y secado de esporas, mientras que en las formulaciones líquidas se logró el mayor desempeño con el agregado de PVP y glutamato de sodio a 20g/L. Cabe destacar que la capacidad funcional de interés fue corroborada en el cultivo de esporas obtenido de cada etapa del proceso de bioproducción, así como en los formulados finales.

Como continuación del trabajo se plantea: evaluar el desempeño agronómico de la cepa ILBB592 co-inculada con rizobio en la movilización de fósforo, continuar la optimización del proceso de formación de esporas, efectuar el escalado del proceso de producción y formulación de esporas de ILBB592 (con el correspondiente análisis económico y financiero del proceso) y realizar el procedimiento de registro del nuevo inoculante nacional en base a las directrices marcadas por la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, en la División Control de Insumos, Departamento de Agentes Biológico.

REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS

(ADAU, 2017). Informe anual de comercio exterior 2017.

Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (3):97–110.

Tisdale, S.L., Nelson, W. L., Beaton, J.D., Havlin, J.L. (1993). *Soil Fertility and Fertilizers*. Fifth Edition. Macmillan Publishing Company. New York. pp.176-229.

X. APÉNCIDE

1. MEDIOS

1.1 Medio de cultivo para bacterias

1.1.1. Glucosa, extracto de levadura, sal (GYS)

Componente	g/L
Glucosa	1
Extracto de levadura	2
NH ₄ (SO ₄) ₂	2
MnSO ₄	0,06
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4
CaCl ₂	0,08
K ₂ HPO ₄	5

1.1.2. Luria Bertani (LB)

Componente	g/L
Extracto de levadura	5
Triptona	10
NaCl	10
Agar (si corresponde)	15

1.1.3. 2SG

Componente	g/L
Caldo nutritivo	16
KCl	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Agar (si corresponde)	15

1.2 Medio de cultivo para evaluar cepas movilizadoras de fósforo

Componente	POrg	PT	PCa	PAI	PFe
Glucosa (g/L)	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9
KNO ₃ (g/L)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
CaSO ₄ .2H ₂ O (g/L)	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Fitato-Na (g/L)	3,96	3,96	3,96	3,96	3,96
FePO ₄ (g/L)	-	2,41	-	-	5,25
AlPO ₄ (g/L)	-	1,01	-	2,87	-
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (g/L)	-	0,69	3,65	-	-
Solución A	500uL	500uL	500uL	500uL	500uL
Solución B	500uL	500uL	500uL	500uL	500uL
Solución C	200uL	200uL	200uL	200uL	200uL
Agar (si corresponde)	15	15	15	15	15

Solución A	g/L
Tiamina-HCl	0,1
Solución B	g/L
Citrato-Fe	10
Solución C (Morizet,1976)	g/L
H ₃ BO ₃	2,82
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,098
MnSO ₄ .H ₂ O	3,08
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,29
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,41

Los medios (POrg, PT, PCa, PAI, PFe) se prepararon en agua mQ y se ajustó el pH de los mismos a 7 con solución de NaOH 1M, y HCl 1M. Las soluciones A, B, C fueron autoclavadas y conservadas a 4°C. Para el medio POrg se preparó en agua mQ una solución de fitato-Na (Sigma, ref P0109), se ajustó su pH a 7 y se incorporó cantidad suficiente a medio estéril (a menos de 45°C) en forma aséptica tras la esterilización por filtración (0.22µm) de la solución.

1.3 Medio de esporulación optimizados

1.3.1. Medio Esporulación *Bacillus thuringiensis* (MEBT) para ILBB139

Componentes	g/L	Proveedor
MgCl ₂	0,6	Droguería Mtveo
NH ₄ SO ₄	1,5	Llalemand
KH ₂ PO ₄	2,5	Llalemand
EP3	15	Bionis (Cod. 1000641)
FeSO ₄	0,02	Droguería Mtveo
ZnSO ₄	0,16	Droguería Mtveo
CaCl ₂	0,33	Droguería Mtveo

Se ajustó a pH 7 con solución de NaOH 1M, y HCl 1M.

1.3.2. Medio Esporulación *Bacillus megaterium medium* (MEBM) para ILBB592

Componetes	g/L	Proveedor
MgCl ₂	0,6	Droguería Mtveo
NH ₄ SO ₄	1,5	Llalemand
KH ₂ PO ₄	3,0	Llalemand
EP2	16	Llalemand (Cod. FNI103)
Glucosa	5,0	Drog. Ind. Uru
MnSO ₄	0,03	Droguería Mtveo
FeSO ₄	0,02	Droguería Mtveo
ZnSO ₄	0,16	Droguería Mtveo
CaCl ₂	0,33	Droguería Mtveo

Se ajustó a pH 7 con solución de NaOH 1M, y HCl 1M.

2. BUFFERS Y SOLUCIONES

2.1. Tris-Acético-EDTA (TAE)

Componente	mM
Tris-Acético (pH=8.4)	40
EDTA	1

2.2. Buffer de trabajo

Componente	mM
Tris-HCl (pH=7)	100
CaCl ₂ .2H ₂ O	1

2.3. Solución stock de sales

Componente	g/L
FeSO ₄	0,17
ZnSO ₄	1,60
CaCl ₂	3,33

3. TÉCNICAS

3.1. Cuantificación de ion ortofosfato en solución por espectrofotometría Vis (medio de cultivo)

3.1.1. Resumen del método

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato en solución para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo de molibdeno de color azul intenso. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de fósforo en solución, que se mide en un espectrofotómetro a 880 nm. La concentración se determina a partir de una curva de calibración.

3.1.2. Reactivos

S1-Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄), 5N: diluir 2 mL de H₂SO₄ conc. en 172mL de agua destilada.

S2-Solución de tartrato de antimonio y potasio (K(SbO)C₄H₄O₆.3H₂O): disolver 1.47 g de K(SbO)C₄H₄O₆.3H₂O en 500mL de agua destilada en un matraz de 500mL y llevar al aforo. Solución estable por 6 meses.

S3-Solución de molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O): disolver 8 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O en 200mL de agua destilada. Almacenar en botellas de vidrio. Solución estable por 6 meses.

S4-Solución de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) 0.1M: disolver 1.76 g de C₆H₈O₆ en 100mL de agua destilada. La solución es estable por una semana a 4°C, almacenar en recipiente de vidrio color ámbar.

S5- Reactivo Combinado: Preparar inmediatamente antes del desarrollo de color, mezclando en el orden dado los siguientes reactivos (estable por 4 horas): S1 (50%), S2 (5%), S3 (15%), S4 (30%).

S6- Solución stock de P disponible (50mg-P/L): 109.5mg KH₂PO₄ (anhídrido) y llevar a 500mL. Esta solución es estable por 6 meses.

3.1.2. Calibración del método

A partir de la solución S6, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados se toman por pesada con precisión 0.001g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1g/mL. Se determina una curva de calibración para cada día de análisis.

Std toma (mg-P/L)	Toma (uL)	H2O(uL)	Std (mg-P/L)	Std (mmol-P/L)
0	0	10000	0	0
10	50	9950	0,05	2
10	250	9750	0,25	8
50	100	9900	0,5	16
50	200	9800	1	32
50	300	9700	1,5	48
50	400	9600	2	65
50	600	9400	3	97
50	800	9200	4	129
50	1000	9000	5	161
50	1600	8400	8	258
50	2000	8000	10	323

3.1.3. Análisis de muestra

Tomar una alícuota del medio de cultivo de 1.5mL. Centrifugar este a 10.000rpm, 3min. Diluir los sobrenadantes de los medios POrg, en una relación 1/20 en H₂O mQ y para los medios PT, PCa, PAI, PFe en una relación 1/10 en H₂O mQ. Agregar a 1mL de sobrenadante diluido, 163uL de S5. Agitar vigorosamente. Medir la absorbancia a 880 nm, entre 10 y 30 minutos luego del agregado S5.

3.1.4. Análisis de datos

La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}_{\text{std}} = \mathbf{a} \text{ Std (mmol-P/L)} + \mathbf{b}$$

siendo **a** y **b** la pendiente y la ordenada en el origen de la recta, respectivamente, para los rangos dinámicos (0-2) mg-P/L y (2-10) mg-P/L, según corresponda.

La concentración de ion ortofosfato liberado al medio (x), expresado como mmol de P por litro se calcula según:

$$x \text{ (mmol-P/L)} = \text{FD} \times [(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco medio}} - \mathbf{b})] / \mathbf{a}$$

FD (factor de dilución de la muestra)

Abs_{blanco medio}, es la absorbancia del cada medio sin inocular, incubado (0, 24, 48 horas y una semana, según corresponda) y con el agregado del S5.

3.2. Cuantificación de ion ortofosfato en solución por espectrofotometría Vis (actividad fitasa)

3.2.1. Resumen del método

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, en medio ácido, reaccionan con el ortofosfato en solución para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a un complejo de molibdeno de color azul intenso. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de fósforo en solución, que se mide en un espectrofotómetro a 880 nm. La concentración se determina a partir de una curva de calibración.

3.2.2. Reactivos

S1-Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 5N: diluir 2 mL de H_2SO_4 conc. en 172mL de agua destilada.

S2-Solución de tartrato de antimonio y potasio ($K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 3H_2O$): disolver 1.47 g de $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 3H_2O$ en 500mL de agua destilada en un matraz de 500mL y llevar al aforo. Solución estable por 6 meses.

S3-Solución de molibdato de amonio (de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$): disolver 8 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ en 200mL de agua destilada. Almacenar en botellas de vidrio. Solución estable por 6 meses.

S4-Solución de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) 0.1M: disolver 1.76 g de $C_6H_8O_6$ en 100mL de agua destilada. La solución es estable por una semana a 4°C, almacenar en recipiente de vidrio color ámbar.

S5- Reactivo Combinado: Preparar inmediatamente antes del desarrollo de color, mezclando en el orden dado los siguientes reactivos (estable por 4 horas): S1 (15,6%), S2 (1,6%), S3 (4,7%), S4 (9,4%, y H_2O mQ (68,8%).

S6- Solución stock de P disponible (50mg-P/L): disolver 109.5mg KH_2PO_4 (anhídrido) en 500mL de agua MiliQ. Registrar pesada y volumen final de solución con una precisión 0.001g. Esta solución es estable por 6 meses.

3.2.3. Calibración del método

A partir de la solución S6, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados se toman por pesada con precisión 0.001g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1g/mL. Se determina una curva de calibración para cada día de análisis.

Std toma (mg-P/L)	Toma (uL)	H2O(uL)	Std (mg-P/L)	Std(μmol-P/mL) *
0	0	10000	0	0,000
10	50	9950	0,05	0,002
10	250	9750	0,25	0,003
50	100	9900	0,5	0,006
50	200	9800	1	0,010
50	300	9700	1,5	0,013
50	400	9600	2	0,019
50	600	9400	3	0,026
50	800	9200	4	0,032
50	1000	9000	5	0,052
50	1600	8400	8	0,065
50	2000	8000	10	0,000

* cantidad de ion ortofosfato del estándar expresado como μmol de P por mililitro del volumen final de reacción de actividad fitasa (1,5mL).

3.2.4. Análisis de muestra, blanco reactivo y estándar

Tiempo Incubación	Secuencia de agregado de reactivos	Muestra	Blanco reactivo	Estándar *
10min	Fitato-Na 10mM	50	50	-
	buffer de trabajo	150	150	-
0, 24 y 48hs	Extracto (×30)	100	-	300
0, 24 y 48hs	S5	1200	1200	1200
	Extracto (×30)	-	100	-

*Los estándares únicos que no se incuban.

3.2.5. Análisis de datos

La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$Abs_{std} = a \text{ Std } (\mu\text{mol-P/mL}) + b$$

siendo a y b la pendiente y la ordenada en el origen de la recta, respectivamente, en el rango dinámico (0,05-10) mg-P/L.

La concentración de ion ortofosfato liberado expresado como μmol de P por mililitro de extracto proteico concentrado se calcula según:

$$x (\mu\text{mol-P/mL}) = [1,5/0,1] \times [(Abs_{muestra} - Abs_{blanco\ reactivo} - b)]/a$$

3.3. Cuantificación de azúcares reductores en solución en medio optimizado para la esporulación de ILBB592 (MEBM) por espectrofotometría Vis

3.3.1. Reactivos

S1- Reactivo DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico): Pesar 0,5 g de DNS, 15 g de tartrato de disodio ($C_4H_4O_6Na_2$) y 0,8 g de hidróxido de sodio (NaOH). Disolver el NaOH en 20 ml de agua y se añade en agitación el $C_4H_4O_6Na_2$ lentamente. Completar con agua hasta 40 ml y se comienza a añadir lentamente el DNS. Dejar en agitación toda la noche, en frío, enrasar a 50 ml y filtrar. Almacenar la solución a 4°C, en frasco ámbar en vidrio.

S2- Medio optimizado para la esporulación de ILBB592 sin glucosa (SBMM s/Glu): Preparar SBMM según el inciso 1.3.2, sin el agregado de glucosa.

S3- Medio optimizado para la esporulación de ILBB592 analítico (SBMM-An): disolver 450mg glucosa (anhídrido) en 100mL de S2. Registrar pesada y volumen final de solución con una precisión 0.001g.

3.3.2. Calibración del método

A partir de S2 y S3, preparar la curva de calibración con las concentraciones sugeridas en la tabla adjunta. Los volúmenes indicados se toman por pesada con precisión 0.001g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del medio 1g/mL. Autoclavar (121°C, 15min, 0.1Pa) los estándares previamente a su cuantificación. Se determina una curva de calibración para cada día de análisis.

SBMM-An (uL)	SBMM s/Glu (uL)	Std(g-glucosa/L)
50	4950	0,05
250	4750	0,23
750	4250	0,68
1250	3750	1,13
2500	2500	2,25
3500	1500	3,15

3.3.3. Análisis de muestra

Tomar una alícuota del medio de cultivo de 1.5mL. Centrifugar este a 10.000rpm, 3min. Diluir sobrenadante si corresponde. Agregar a 150uL de sobrenadante y 150uL de S1. Agitar vigorosamente. Incubar a 100°C en baño seco durante 5 minutos. Agregar a 1500uL de H₂O a la mezcla incubada, y enfriar en baño de agua durante 20 minutos. Medir la absorbancia a 540 nm.

3.3.4. Análisis de datos

La curva de calibración es una recta representada por la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}_{\text{std}} = \mathbf{a} \text{ Std (g-glucosa/L) } + \mathbf{b}$$

siendo **a** y **b** la pendiente y la ordenada en el origen de la recta, respectivamente, para el rango dinámico (0,05-3,15) mg-P/L

La concentración de glucosa en el medio (x), expresado como g de glucosa por litro se calcula según:

$$x \text{ (mmol-P/L) } = \text{FD} \times [(\text{Abs}_{\text{muestra}} - \mathbf{b})] / \mathbf{a}$$

FD (factor de dilución de la muestra)

4. RESULTADOS DE APOYO

4.1. Descripción de morfotipo de colonia de aislamiento de *Bacillus s.l.*

Morfotipo	Descripción colonia	Microscopia de contraste
1	Borde rugoso, cremosa, opaca, blanquecina, granulosa	Bastones/medianos/móviles/de 1 ó 2
2	Borde uniforme, cremosa, brillante, blanquecina-rosada	Bastones/pequeños/Muy móviles/de 1
3	Borde uniforme, cremosa, brillante, amarillenta-verdosa (casi igual 2)	Bastones/pequeños/Poco móviles/de 1 ó 2
4	Borde uniforme, cremosa-rugosa, brillante, blanquecina rosada	Bastones/medianos/Poco móviles/4 ó 5
5	Borde rugoso, cremosa, brillante, blanca	Bastones/medianos/Poco móviles/de 1 ó 2
6	Borde uniforme, cremosa, brillante, blanca amarillenta (casi igual 2)	Bastones/largos/Poco móviles/de más de 2
7	Borde irregular, seca, brillante-chata, blanca (como envejecida arriba)	Bastones/pequeños/Muy móviles/de 1
8	Borde uniforme, cremosa, brillante, blanca, chica-chica	Bastones/medianos/Poco móviles/de 4 ó 5
9	Simil 7 (blanca-blanca)	Bastones/pequeños/Muy móviles/de 1
10	Crecimiento refractario, blanquecina rosada	Bastones/medianos/poco móviles/más 8
11	Borde uniforme, cremosa, brillante-chata, marrón	Bastones/pequeños/Muy móviles/de 1 ó 2
12	Borde rugoso, cremosa, opaca, blanquecina-marrón	Bastones/medianos/poco móviles/más 8
13	Simil 2, pero crece mucho menos, colonia chica, blanca-blanca	Bastones/ovaloides/Medianos/Poco móviles/ 1 ó 2
14	Simil 1, pero crecimiento no sigue tanto la estría	Bastones/rectos/Medianos/Móviles/4 ó 5
15	Simil 1, pero rugosa, brillante	Bastones/mediano/Móviles/1 ó 2
16	Simil 1 pero brillante, lisa, cremosa	Bastones/chicos/muy móviles/4 ó 5
17	Borde irregular, brillante-cremosa, blanca (como envejecida arriba)	Bastones/medianos/poco móviles/4 ó 5
18	Amarilla, chata, brillante, borde uniforme	Bastones/chicos/muy móvil/1 ó 2
19	Borde uniforme, marrón blanquecina	Bastones/medianos/poco móviles/4 ó 5
20	Borde uniforme, blanca, brillante, pegajosa	Bastones/medianos/Poco móviles/de 1 ó 2
21	Simil 7, pero translúcida	Bastones/medianos/Poco móviles/de 1 ó 2
22	Borde uniforme, blanca, chica, crecimiento dentro del agar	Bastones/ovaloides/Medianos/Poco móviles/ 1 ó 2
23	Borde rugoso, brillante, amarillo intenso	Bastones/rectos/Medianos/Móviles/4 ó 5
24	Simil 7, pero translúcida	Bastones/mediano/Muy móviles/1 ó 2
25	Simil 8 y pigmento amarillo en toda la placa	Bastones/medianos/Poco móviles/de 1 ó 2

4.2. Resultados de análisis estadísticos

4.2.1. Script de ACC y salida de resultados

```
install.packages("vegan")
library(vegan)
spelog <- decostand(spe[,2:13], "log")
ccamodel <- cca(spe[,X:Y],env[,W:Z])
mod1 <- cca(env[,W:Z] ~ .,env[,W:Z])
# "Both"
ccaModel1<- ordistep(mod1, scope = formula(mod2), perm.max = 200)
# "backward" default
ccaModel2<- ordistep(mod1, perm.max = 200)
# "forward" default
ccaModel3<- ordistep(mod1, scope = formula(mod1), direction="forward", perm.max
= 200)
finalmodel<- vif.cca(ccamodel)
finalmodel
ccamodel
ccaModel1
ccaModel2
ccaModel3
anova.cca(ccamodel)
plot<- plot(ccamodel, xlim=c(-3,3), ylim=c(-3,3), display=c("sp","cn","wa"))
```

Y el resultado que arroja el programa fue el siguiente:

```
No residual component

Model: cca(X = exp[, 2:7], Y = amb[, 2:6])
      Df ChiSquare F Pr(>F)
Model   5   0.26152 <0.001
Residual 0   0.00000

>>>

Call: cca(X = exp[, 2:7], Y = amb[, 2:6])

      Inertia Proportion Rank
Total      0.2615      1.0000
Constrained 0.2615      1.0000      5
Unconstrained 0.0000      0.0000      0
Inertia is mean squared contingency coefficient

Eigenvalues for constrained axes:
      CCA1 (47,2%)   CCA2 (30,3%)   CCA3   CCA4   CCA5
0.12531 0.07928 0.05154 0.00539 0.00000

VIF

      A.Tit Ca.meq.100g Mg.meq.100g K.meq.100g Na.meq.100g
      1.582990      8.888888      2.554938      6.271910      2.069503
```

4.2.2. Cuadro de análisis de varianza (SC Tipo III), estabilidad de formulaciones líquidas a los cuatro meses de conservación a 22°C.

FV	SC	gl	CM	F	p
Modelo.	10,5	7	1,5	57,04	<0,0001
FL1	1,24	1	1,24	47,05	0,0001
FL2	5,39	1	5,39	204,98	<0,0001
FL3	0,06	1	0,06	2,19	0,1772
FL1*FL2	0,88	1	0,88	33,48	0,0004
FL1*FL3	0,14	1	0,14	5,48	0,0474
FL2*FL3	0,99	1	0,99	37,49	0,0003
FL1*FL2*FL3	1,8	1	1,8	68,62	<0,0001
Error	0,21	8	0,03		
Total	10,71	15			

Factores: Polivinilpirrolidona (FL1), Glicerina (FL2), Glutamato monosódico (FL3). FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales).

4.3. Curva de crecimiento del grupo de cepas de interés en POrg

Previo a la ejecución de los extractos proteicos concentrados, se estudia la curva de crecimiento del grupo de cepas de interés en POrg, realizando los cultivos por duplicado biológico tal como se describe en el inciso 4.1.3 de Materiales y Métodos, determinando la absorbancia a 600nm, durante 64 horas (Figura 17).

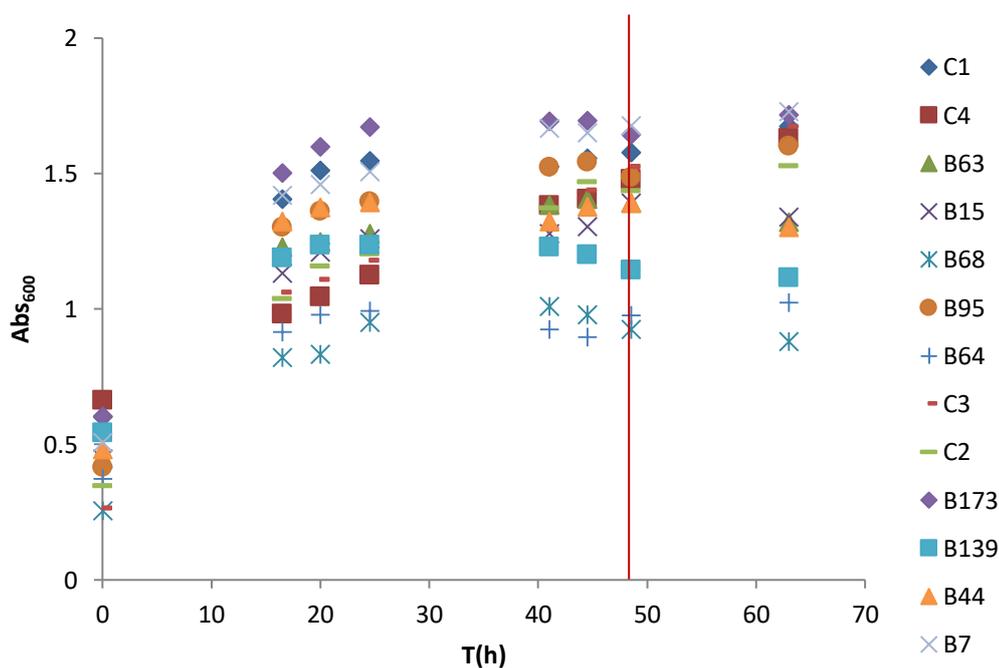
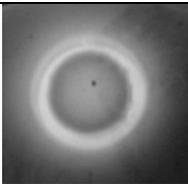
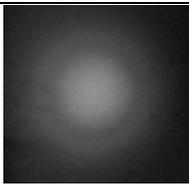
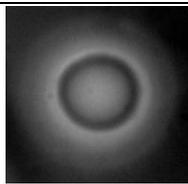


Figura 17. Curva de crecimiento del grupo de cepas de interés en POrg. La línea roja vertical indica las 48 horas de incubación.

4.4. Patrón de crecimiento asociado a actividad hemolíticas en Blood Agar

Actividad hemolítica	Continua fuerte	Continua débil	Discontinua	
Patrón de crecimiento				

4.5. Calibración de sistema cromatográfico para la cuantificación de ácidos orgánicos en sobrenadante de medio de cultivo por HPLC-UV en fase reversa

La calibración del sistema cromatográfico se efectuó para cada batch de análisis, a partir de un estándar mixto de los siete ácidos orgánicos en estudio analizado a cinco niveles de concentración. En la Tabla 1. se informa el modelo de regresión lineal simple obtenido para cada analito (enlistados según el orden de elución en el sistema cromatográfico) en una de las corridas analíticas, con su correspondiente rango dinámico y coeficiente R^2 . Las curvas de calibración fueron reproducibles en los sucesivos batch de análisis.

Tabla 1. Curva de calibración y rango dinámico de análisis

Analito	t_R (min)	Modelo de regresión	R^2	Rango dinámico (mM)
Ác. glucónico	2.3	$y=107107x+3691292$	0,998	(2-80)
Ác. succínico	2.8	$y=127290x-246333$	0,999	(0,5-50)
Ác. pirúvico	3.2	$y=1958008x+1259682$	0,999	(0,5-50)
Ác. láctico	4.1	$y=1192701x-593012$	0,999	(0,5-50)
Ác. acético	4.4	$y=1069694x+417319$	0,999	(0,5-50)
Ác. cítrico	5.3	$y=262690x+722403$	0,999	(0,5-50)
Ác. fumárico	6.2	$y=49053996x+2833053$	0,999	(0,05-5)

4.6. Tabla de similitud de secuencia parcial de nucleótidos del gen *ARNr 16S* para cada asilamiento e identificación de grupo filogenéticos

Grupo	Aislamiento	Especie 1	Hit 1	Similitud (%)	Número acceso 1	Especie 2	Hit 2	Similitud (%)	Número acceso
1	ILBB19	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	100	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
	ILBB38	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	100	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
	ILBB55	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	99	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
	ILBB71	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	100	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
	ILBB139	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	100	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
	ILBB147	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	100	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
	ILBB166	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	100	ACNF01000156	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877
2	ILBB58	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB95	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB172	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB173	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB130	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB58	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB40	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB172	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
	ILBB11	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313
ILBB69	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581 ^T	100	JMH01000057	<i>Bacillus aryabhatai</i>	B8W22 ^T	100	EF114313	
3	ILBB20	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	99	LGYA01000001
	ILBB21	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	99	LGYA01000001
	ILBB181	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	99	LGYA01000001
	ILBB13	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	99	LGYA01000001
	ILBB46	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	99	LGYA01000001
	ILBB67	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	99	LGYA01000001
4	ILBB63	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	DSM 23493 ^T	99	LFXJ01000007	<i>Lysinibacillus marcooides</i>	DSM 54 ^T	99	LGCI01000008
	ILBB64	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	DSM 23493 ^T	99	LFXJ01000007	<i>Lysinibacillus marcooides</i>	DSM 54 ^T	99	LGCI01000008
	ILBB65	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	DSM 23493 ^T	99	LFXJ01000007	<i>Lysinibacillus marcooides</i>	DSM 54 ^T	99	LGCI01000008
	ILBB149	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	DSM 23493 ^T	99	LFXJ01000007	<i>Lysinibacillus marcooides</i>	DSM 54 ^T	99	LGCI01000008
5	ILBB152	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	BAM-582 ^T	100	AB300598	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	DSM 23493 ^T	98	LFXJ01000007

	ILBB154	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	BAM-582 ^T	100	AB300598	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	DSM 23493 ^T	98	LFXJ01000007
6	ILBB7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NBRC 15717 ^T	100	NR112569.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	KCTC 3346 ^T	100	AUOZ01000024
7	ILBB180	<i>Lysinibacillus varians</i>	GY32 ^T	98	JN860068.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	KCTC 3346 ^T	98	AUOZ01000024
	ILBB133	<i>Paenibacillus silvae</i>	DB13031 ^T	100	KC835077	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	BP-23 ^T	97	AJ716019
8	ILBB138	<i>Paenibacillus silvae</i>	DB13031 ^T	100	KC835077	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	BP-23 ^T	96	AJ716019
	ILBB134	<i>Paenibacillus silvae</i>	DB13031 ^T	100	KC835077	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	BP-23 ^T	96	AJ716019
9	ILBB68	<i>Paenibacillus durus</i>	ATCC35681 ^T	99	CP011114.1	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	NRRL NRS-290 ^T	97	D85396
10	ILBB44	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061 ^T	99	AY876289.1	<i>Bacillus safensis</i>	FO-36b ^T	96	ASJD01000027
11	ILBB162	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	DSM 12442 ^T	98	AM747226.1	<i>Bacillus toyonensis</i>	BCT-7112 ^T	97	CP006863
12	ILBB154	<i>Bacillus butanolivorans</i>	DSM 18926 ^T	100	LGYA01000001	<i>Bacillus simplex</i>	NBRC 15720 ^T	99	BCVO01000086
13	ILBB81	<i>Bacillus marisflavi</i>	TF-11 ^T	98	NR118437.1	<i>Bacillus oryzaecorticis</i>	R1 ^T	97	KF548480
14	ILBB70	<i>Viridibacillus arenosi</i>	LMG 22166 ^T	99	AJ627212.1	<i>Viridibacillus arvi</i>	DSM 16317 ^T	97	LILB01000018
15	ILBB123	<i>Bacillus anthracis</i>	Ames ^T	100	AE016879	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	100	AE016877

4.7. Selección de tiempo de incubación a 80°C para la cuantificación de esporas de ILBB592 y ILBB139 en medio líquido (2SG)

Las cepas ILBB592 y ILBB139 fueron crecidas en 15mL LB (Falcon de 50mL, 180rpm, 24 horas, 28°C). El inóculo fue lavado con agua mili-Q 0.85% NaCl y un volumen de 1mL de cada cepa fue sembrado, alcanzando una carga bacteriana inicial en el matraz de 1×10^4 ufc/mL. Se trabajó en condiciones de incubación aerobias (10mL de medio en matraces de 125mL, 180rpm) a 28°C durante 24 horas. Una alícuota del cultivo obtenido se incubó a 5, 10 y 20 minutos a 80°C en baño seco. Se determinó la carga bacteriana por la técnica de recuento en placa por microgota. En la Tabla 2. se informa los resultados obtenidos. El ensayo se efectúa por duplicado. En base a estos se selecciona el menor tiempo de incubación en el que se constata una reducción de la carga bacteriana. Por ello se selecciona 10 minutos a 80°C como tratamiento de shock térmico para ambas cepas.

Tabla 2. Recuentos (ufc/mL) obtenidos tras la aplicación de distintos shocks térmicos

Cepas	Sin shock térmico	Tiempo incubación a 80°C (min)		
		5	10	20
ILBB592	$5,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$
ILBB139	$7,2 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$

4.8. Contenido de proteína total en extracto proteico (C), actividad fitasa volumétrica y específica de las nueve cepas seleccionadas y los cuatro controles biológicos en estudio.

Cepa	C(ug/mL)	UE/mL	UE/ μ g
ILBB139	457	0,06	0,14
ILBB15	450	0,11	0,25
ILBB173	393	0,16	0,41
ILBB44	422	0,19	0,45
ILBB63	469	0,22	0,48
ILBB64	165	0,10	0,61
ILBB68	325	0,02	0,06
ILBB7	133	0,08	0,63
ILBB95	210	0,03	0,13
C1	363	0,03	0,08
C2	417	0,05	0,13
C3	431	ND	ND
C4	415	ND	ND

Los valores presentados son el promedio de dos réplicas biológicas. (ND) No detectable en las condiciones de trabajo.

4.9. Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados según la fuente de fósforo utilizado.

4.9.1. Tabla de identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con fitato de sodio

Cepa	C(mM)						
	Ác. glucónico	Ác. succínico	Ác. pirúvico	Ác. láctico	Ác. acético	Ác. cítrico	Ác. fumárico
C1	ND	ND	1,7	ND	ND	ND	ND
C2	ND	ND	1,7	ND	ND	ND	ND
C3	ND	ND	ND	ND	0,2	0,1	ND
C4	ND	ND	1,5	ND	ND	0,7	ND
ILBB15	ND	2,4	1,4	ND	ND	0,5	ND
ILBB139	43	ND	2,1	0,3	0,2	ND	ND
ILBB173	ND	ND	1,6	0,1	ND	ND	ND
ILBB44	ND	6,7	3,9	ND	ND	ND	ND
ILBB63	50	ND	0,0	0,2	0,2	ND	ND
ILBB64	13	ND	1,5	ND	ND	ND	ND
ILBB68	44	ND	1,6	ND	ND	ND	ND
ILBB7	ND	3,2	1,5	ND	ND	0,2	ND
ILBB95	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	ND

Los valores presentados son el promedio de dos réplicas biológicas. (ND) No detectable en las condiciones de trabajo.

4.9.2. Tabla de identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con FePO₄

Cepa	C(mM)						
	Ác. glucónico	Ác. succínico	Ác. pirúvico	Ác. láctico	Ác. acético	Ác. cítrico	Ác. fumárico
C4	4,1	ND	1,7	0,3	0,2	0,3	ND
ILBB15	ND	2,4	1,8	0,2	0,2	1,6	ND
ILBB139	ND	ND	1,4	ND	0,2	1,3	ND
ILBB44	3,5	ND	1,7	0,0	1,4	0,1	ND
ILBB63	ND	ND	ND	0,3	0,2	1,1	ND
ILBB95	ND	ND	1,4	0,1	0,2	1,1	ND

Los valores presentados son el promedio de dos réplicas biológicas de aquellas cepas en que se constató la actividad solubilizadora del FePO₄ en medio líquido. (ND) No detectable en las condiciones de trabajo.

4.9.3. Tabla de identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con AlPO_4

Cepa	C(mM)						
	Ác. glucónico	Ác. succínico	Ác. pirúvico	Ác. láctico	Ác. acético	Ác. cítrico	Ác. fumárico
C1	ND	2,7	1,4	ND	0,1	0,1	ND
C2	ND	2,0	1,6	ND	ND	0,4	ND
C3	0,0	2,1	ND	0,1	0,3	ND	ND
C4	ND	2,7	ND	0,1	ND	0,1	ND
ILBB15	ND	2,3	ND	0,1	ND	0,3	ND
ILBB139	ND	5,6	ND	0,0	ND	0,5	ND
ILBB173	ND	2,7	ND	0,3	0,3	ND	ND
ILBB44	ND	2,1	1,5	ND	ND	0,3	ND
ILBB63	ND	ND	ND	0,2	0,1	ND	ND
ILBB64	ND	6,3	ND	0,1	ND	0,3	ND
ILBB68	ND	5,7	1,9	0,1	ND	0,5	ND
ILBB7	ND	ND	1,5	0,2	ND	0,4	ND
ILBB95	ND	ND	1,4	0,1	ND	ND	ND

Los valores presentados son el promedio de dos réplicas biológicas. (ND) No detectable en las condiciones de trabajo.

4.9.4. Tabla de identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos mayoritarios secretados en incubación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Cepa	C(mM)						
	Ác. glucónico	Ác. succínico	Ác. pirúvico	Ác. láctico	Ác. acético	Ác. cítrico	Ác. fumárico
C1	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	3,1
C2	ND	ND	ND	ND	ND	0,4	1,9
C3	ND	ND	1,5	ND	ND	1,2	ND
C4	ND	ND	ND	ND	ND	0,4	1,9
ILBB15	ND	ND	1,4	ND	ND	0,3	1,9
ILBB139	ND	ND	ND	ND	ND	0,3	1,9
ILBB173	ND	ND	1,4	ND	ND	0,5	1,9
ILBB44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,9
ILBB63	ND	ND	1,4	ND	ND	0,6	1,9
ILBB64	ND	ND	ND	0,7	ND	0,9	4,1
ILBB68	ND	ND	ND	ND	ND	0,5	1,9
ILBB7	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	1,9
ILBB95	ND	ND	ND	ND	ND	0,5	2,1

Los valores presentados son el promedio de dos réplicas biológicas. (ND) No detectable en las condiciones de trabajo.

4.10. Resultados de apoyo en selección de componentes del medio de cultivo de significancia sobre título de esporas y eficiencia de esporulación en ILBB139 y ILBB592

4.10.1. Matriz de diseño factorial fraccionado 2⁹⁻³ (IV) codificada

Nº Experimento	Factores								
	F1: Glu	F2: EP1	F3: EP2	F4: EP3	F5: EP4	F6: Mg	F7: Mn	F8: N	F9: P
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
8	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
11	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1
15	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1
17	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
18	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
19	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
20	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
21	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1
22	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
23	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
24	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
25	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1
26	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
27	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
29	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1
30	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1
31	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
32	1	1	1	1	1	-1	1	1	-1
33	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
34	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
35	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
36	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1
37	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
38	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1

39	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1
40	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1
41	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
42	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
43	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1
44	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
45	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1
46	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1
47	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	1
48	1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1
49	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
50	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
51	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
52	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
53	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
54	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1
55	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1
56	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
57	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
58	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
59	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1
60	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1
61	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1
62	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
63	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1
64	1	1	1	1	1	1	1	1	1

4.10.2. Tabla de niveles de factores para el diseño factorial fraccionado 2^{9-3} (IV)

Factores	Niveles (g/L)	
	-1	1
F1: Glu	1	20*
F2: EP1	0	5
F3: EP2	0	5
F4: EP3	0	5
F5: EP4	0	5
F6: Mg	0,2	1
F7: Mn	0,05	0,5
F8: N	0	3
F9: P	1	5

(*) Para el diseño de ILBB592 el nivel máximo en que se trabaja es 9g/L

4.10.3. Matriz de confusión de efectos para el diseño factorial fraccionado 2^{9-3} (IV)***[Termino estimado] = Termino de confusión/Aliase**

[Intercept] = Intercept

[Block 1] = Block 1 - ABJ

[Block 2] = Block 2 + ABJ

[A] = A

[B] = B

[C] = C

[D] = D + EGH

[E] = E + DGH

[F] = F

[G] = G + DEH

[H] = H + DEG

[J] = J

[AB] = AB + CDG + CEH

[AC] = AC + BDG + BEH

[AD] = AD + BCG + EFJ

[AE] = AE + BCH + DFJ

[AF] = AF + DEJ + GHJ

[AG] = AG + BCD + FHJ

[AH] = AH + BCE + FGJ

[AJ] = AJ + DEF + FGH

[BC] = BC + ADG + AEH

[BD] = BD + ACG

[BE] = BE + ACH

[BF] = BF

[BG] = BG + ACD

[BH] = BH + ACE

[BJ] = BJ

[CD] = CD + ABG

[CE] = CE + ABH

[CF] = CF

[CG] = CG + ABD

[CH] = CH + ABE

[CJ] = CJ

[DE] = DE + GH + AFJ

[DF] = DF + AEJ

[DG] = DG + EH + ABC

[DH] = DH + EG

[DJ] = DJ + AEF

[EF] = EF + ADJ

[EJ] = EJ + ADF

[FG] = FG + AHJ

[FH] = FH + AGJ

[FJ] = FJ + ADE + AGH

[GJ] = GJ + AFH

$$\begin{aligned}
 [HJ] &= HJ + AFG \\
 [ABF] &= ABF \\
 [ACF] &= ACF \\
 [ACJ] &= ACJ \\
 [ADH] &= ADH + AEG \\
 [BCF] &= BCF + DHJ + EGJ \\
 [BCJ] &= BCJ + DFH + EFG \\
 [BDE] &= BDE + BGH \\
 [BDF] &= BDF + CHJ \\
 [BDH] &= BDH + BEG + CFJ \\
 [BDJ] &= BDJ + CFH \\
 [BEF] &= BEF + CGJ \\
 [BEJ] &= BEJ + CFG \\
 [BFG] &= BFG + CEJ \\
 [BFH] &= BFH + CDJ \\
 [BFJ] &= BFJ + CDH + CEG \\
 [BGJ] &= BGJ + CEF \\
 [BHJ] &= BHJ + CDF \\
 [CDE] &= CDE + CGH \\
 [DFG] &= DFG + EFH \\
 [DGJ] &= DGJ + EHJ
 \end{aligned}$$

Factor Generador

$$G = ABCD$$

$$H = ABCE$$

$$J = ADEF$$

(*) El factor F1 es nombrado por el software como A, y así sucesivamente con los nueve factores de estudio

4.10.4. Tablas Análisis de la Varianza (SCP-Tipo III) para ILBB139 para los factores extractos proteicos

	FV	SC	gl	CM	F _o	Valor-p		FV	SC	gl	CM	F _o	Valor-p
A	B	78,056	1	78,056	6,19	0.0157	B	B	39,765	1	39,765	5,7	0.0200
	C	110,214	1	110,214	8,74	0.0045		C	41,452	1	41,452	6,0	0.0176
	D	303,435	1	303,435	24,08	< 0.0001		D	158,179	1	158,179	22,8	< 0.0001
	E	52,962	1	52,962	4,20	0.0449		E	63,812	1	63,812	9,2	0.0036
	Bloque	13,283	1	13,283				Bloque	0,639	1	0,639		
	Error	730,987	58	12,603				Error	402,766	58	6,944		
Total	1288,936	63				Total	706,613	63					

Tabla de análisis de varianza (FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales), en las variables respuesta: título de esporas **(A)** y eficiencia de esporulación **(B)**. El factor B, C, D, E es la concentración de EP1, EP2, EP3 y EP4, respectivamente.

4.10.5. Tablas Análisis de la Varianza (SCP-Tipo III) para ILBB592 para los factores extractos proteicos

FV	SC	gl	CM	F _o	Valor-p
B	34,817	1	34,817	3,688	0.0597
C	86,333	1	86,333	9,144	0.0037
D	92,264	1	92,264	9,772	0.0028
E	51,204	1	51,204	5,423	0.0234
Bloque	4,259	1	4,259		
Error	547,621	58	9,442		
Total	816,498	63			

A

FV	SC	gl	CM	F _o	Valor-p
B	45,548	1	45,548	3,445	0.0685
C	82,457	1	82,457	6,236	0.0154
D	9,642	1	9,642	0,729	0.3967
E	53,852	1	53,852	4,073	0.0482
Bloque	15,194	1	15,194		
Error	766,913	58	13,223		
Total	973,608	63			

B

Tabla de análisis de varianza (FV, Fuente de Variación; SC, Suma de Cuadrados; gl, grados de libertad; SCP, Suma de cuadrados parciales), en las variables respuesta: título de esporas (**A**) y eficiencia de esporulación (**B**). El factor B, C, D, E es la concentración de EP1, EP2, EP3 y EP4, respectivamente.

4.11. Matriz de diseño y tabla de niveles de factores para ensayo de optimización título de esporas y eficiencia de esporulación en ILBB139

4.11.1. Matriz de diseño central compuesto (CCD, 2^{3+star}) y tres puntos centrales

N° Experimento	Factores		
	F1: Glu (g/L)	F2: Mn (g/L)	F3: EP3 (g/L)
1	0,2	0,01	9
2	0,8	0,01	9
3	0,2	0,04	9
4	0,8	0,04	9
5	0,2	0,01	21
6	0,8	0,01	21
7	0,2	0,04	21
8	0,8	0,04	21
9	0,0	0,03	15
10	1,0	0,03	15
11	0,5	0,00	15
12	0,5	0,05	15
13	0,5	0,03	5
14	0,5	0,03	25
15	0,5	0,03	15
16	0,5	0,03	15
17	0,5	0,03	15

4.11.2. Tabla de niveles para el diseño central compuesto (CCD, 2^{3+star}) y tres puntos centrales

Factores	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
F1: Glu (g/L)	0	0,2	0,5	0,8	1
F2: Mn (g/L)	0	0,01	0,025	0,04	0,05
F3: EP3 (g/L)	5	9	15	21	25

4.12. Matriz de diseño y tabla de niveles de factores para ensayo de optimización título de esporas y eficiencia de esporulación en ILBB592

4.12.1. Matriz de diseño central compuesto (CCD, 2^{2+star}) y tres puntos centrales

N° Experimento	Factores	
	F2: Mn (g/L)	F3: EP2 (g/L)
1	0,01	8
2	0,04	8
3	0,01	22
4	0,04	22
5	0,00	15
6	0,05	15
7	0,03	5
8	0,03	25
9	0,03	15
10	0,03	15
11	0,03	15

4.12.2. Tabla de niveles de factores para el diseño central compuesto (CCD, 2^{3+star}) y tres puntos centrales

Factores	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
F1: Mn (g/L)	0	0,01	0,03	0,04	0,05
F2: EP2 (g/L)	5	8	15	22	25

4.13. Matriz de diseño y tabla de niveles de factores para ensayo de formulación líquida de esporas bioproducidas

4.13.1. Matriz de diseño factorial completo 2^3 codificada

Tratamiento	F1: PVP (g/L)	F2: Glicerol (v/v %)	F3: Glutamato monosódico (g/L)
T1	0	0	0
T2	20	0	0
T3	0	1	0
T4	0	0	20
T5	20	1	0
T6	0	1	20
T7	20	0	20
T8	20	1	20

4.13.2. Tabla de niveles de factores para el diseño factorial completo 2^3

Factores	Niveles	
	0	1
F1: PVP (g/L)	0	20
F2: Glicerol (v/v %)	0	1
F3: Glutamato monosódico (g/L)	0	20

4.14. Modelos de regresión de concentración de biomasa, células totales y esporas con absorbancia a 600nm para los distintos estadios fisiológicos de un cultivo líquido de ILBB592 en SBMM.

El estudio de la relación matemática de la concentración de biomasa, células totales y esporas con la absorbancia a 600nm de un cultivo líquido de ILBB592 en SBMM, se efectuó según las condiciones de cultivo en matraz descrito inciso 1.2.1, en el medio SBMM (Apéndice 1.3.2). Se aplicó la técnica de cancelación de matraz. Las variables respuestas determinadas por duplicado biológico a distintos tiempos de incubación fueron: lectura de absorbancia a 600nm, título de esporas y eficiencia de esporulación (inciso 1.2.3), y biomasa.

Para la determinación de biomasa se centrifugó 2mL de cultivo en un eppendorf de 2mL (previamente secado a 45°C, termostatizado a temperatura ambiente en desecador y pesado), se descartó el sobrenadante y se reiteró el paso anterior sobre el mismo eppendorf. Luego este se secó a 45°C, se termostatizó a temperatura ambiente en desecador, hasta obtener un peso constante. La biomasa se expresa en gramos por litro.

En la Figura 1. se representa la relación de regresión exponencial de la biomasa (g/L) y la lectura de absorbancia a 600nm de un cultivo líquido de ILBB592 en SBMM para una lectura de absorbancia comprendida entre (0,8 – 2,7) Y (2,7-3,4).

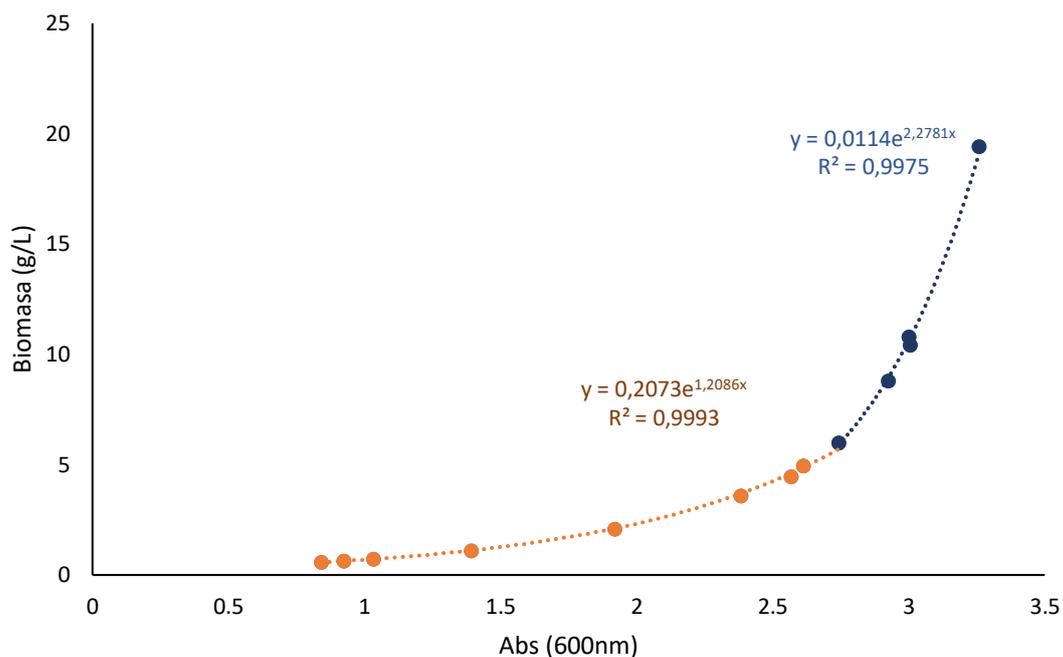


Figura 1. Modelos de regresión de biomasa y lectura de absorbancia del cultivo de ILBB592 en SBMM

En la Figura 2. se representa: la relación de regresión simple no lineal de la concentración de células totales (ufc/mL), esporas (ufc/mL) y la lectura de absorbancia a 600nm; la tendencia de la eficiencia de esporulación con la lectura de absorbancia a 600nm, de un cultivo líquido de ILBB592 en SBMM para una lectura de absorbancia comprendida entre 0,5 y 3,0 para cultivo en matraz.

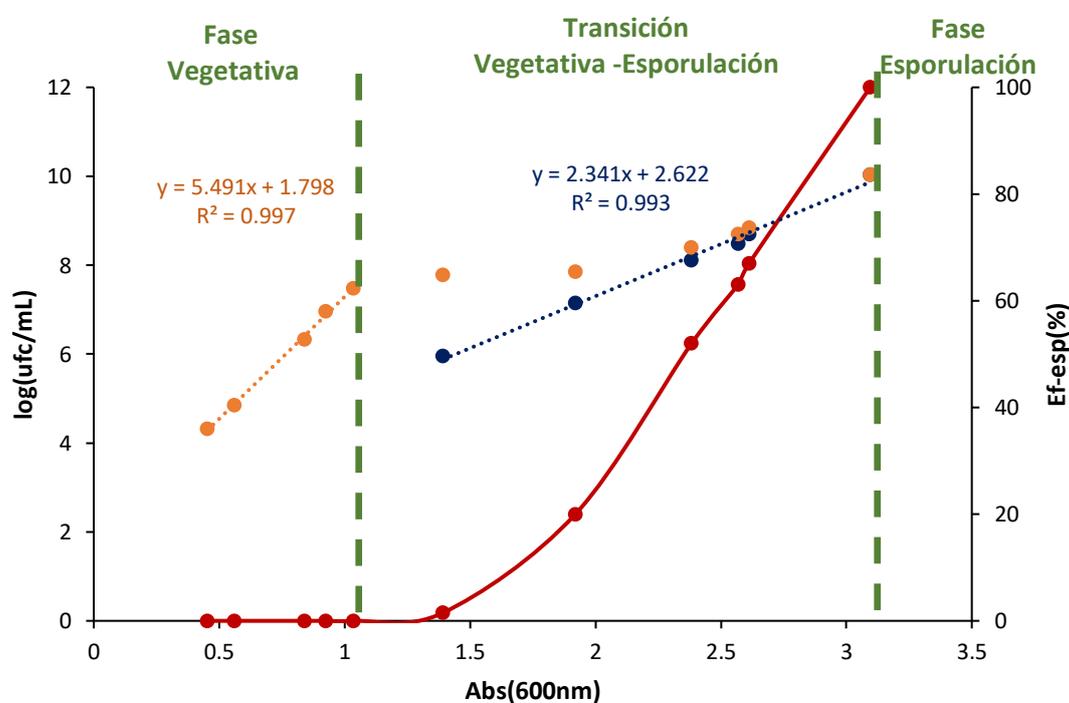
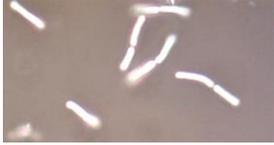
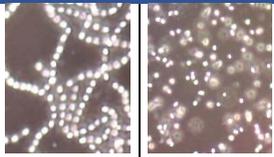


Figura 2. Modelos de regresión de biomasa y lectura de absorbancia del cultivo de ILBB592 en SBMM

Tabla 3. Los coeficientes de regresión lineal simple de la fase vegetativa y la fase de transición para las lecturas de absorbancia comprendida en los rangos (0,0 - 1,0) y (1,0-3,0), para cultivo en matraz.

Fase Vegetativa	0,0<Abs<1,0	100% Células vegetativas
	X	Abs (600nm)
	Y	log(células totales(ufc/mL))
	Pendiente	5,491
	Ordenada origen	1,798
Fase Transición	1,0<Abs<3,0	(0-100) % Esporas
	X	Abs (600nm)
	Y	log(esporas(ufc/mL))
	Pendiente	2,341
	Ordenada origen	2,622
Fase Esporulación	Abs>3,0	100% Esporas
	X	No corresponde
	Y	No corresponde
	Pendiente	No corresponde
	Ordenada origen	No corresponde

5. CÁLCULO DE ERROR DE PREDICCIÓN DEL MODELO

El error de predicción del modelo se calcula:

$$E_{Pred}(\%) = \frac{(\overline{VR_{Exp}} - \overline{VR_{Pred}})}{\overline{VR_{Pred}}} \times 100$$

donde VR_{Exp} y VR_{Pred} son el promedio de la variable respuesta experimental y predicho en el punto óptimo.

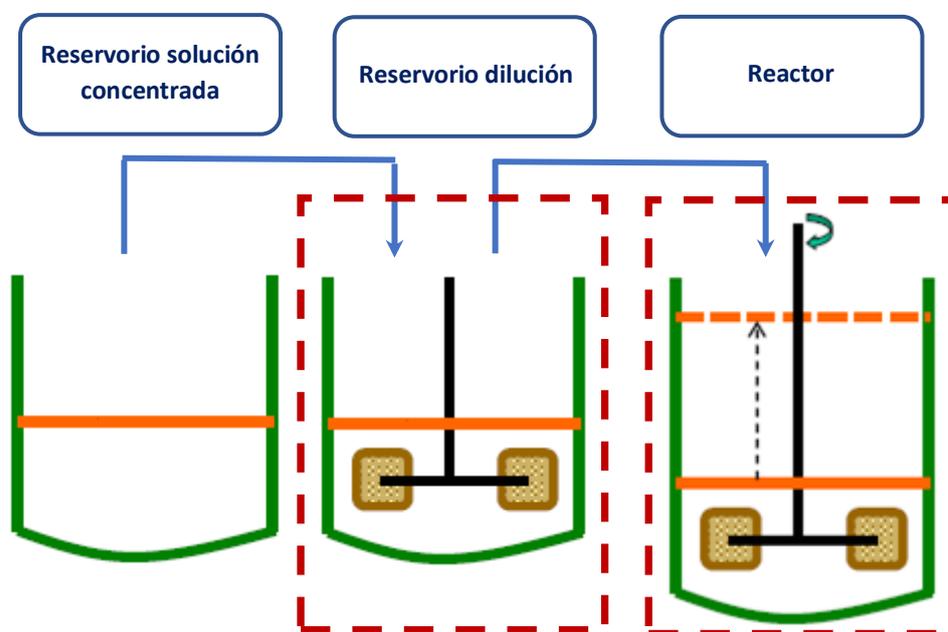
6. CÁLCULO DE PARÁMETROS DESCRIPTIVOS, CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS DEL PROCESO

- *Conversión de azúcares máxima alcanzada* $[X_{S\text{ máx}} (\%)] = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100$
- *Coefficiente de rendimiento de biomasa* $[Y_{X/S} \left(\frac{g}{g}\right)] = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$
- *Productividad volumétrica máxima de biomasa* $[Q_{X\text{ máx}} \left(\frac{g}{Lh}\right)] = \frac{X_i - X_z}{(t_i - t_z)} \quad (z < i)$
- *Velocidad máxima de consumo de azúcares* $[Q_{S\text{ máx}} \left(\frac{g}{Lh}\right)] = \frac{S_z - S_i}{(t_i - t_z)} \quad (z < i)$
- *Velocidad específica máxima de crecimiento* $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t$, en fase exponencial μ es constante y máxima, bajo el supuesto que siguen una cinética de Monod.
- *Velocidad específica máxima de consumo de azúcares* $[q_{S\text{ máx}} \left(\frac{g}{gh}\right)] = \frac{S_z - S_i}{(t_i - t_z)(X_i + X_z)/2} \quad (z < i)$

7. ALIMENTACIÓN ASINTÓTICA DE GLUCOSA EN MODO DE OPERACIÓN FEDBATCH

7.1. Desarrollo del modelo de alimentación asintótica propuesto

Esquema del sistema de trabajo



Nomenclatura

F, Flujo o caudal de líquido (g/L)

μ , Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

$Y_{x/s}$ Coeficiente de rendimiento de biomasa basado en el consumo total de sustrato (g/g)

V Volumen de medio en el reactor (L)

V_d Volumen en reservorio de dilución (L)

S_c Concentración de sustrato en reservorio de solución concentrada (g/L)

S_d Concentración de sustrato en reservorio dilución (g/L)

S_r Concentración de sustrato en el reactor (g/L)

X_d Concentración de biomasa en reservorio dilución (g/L)

X Concentración de biomasa en reactor (g/L)

Balance de masa reactor en modo de operación Fedbatch

$$\frac{d(VX)}{dt} = F_{Entrada}X_{do} - F_{Salida}X + V\mu X - Vk_d X$$

Supuestos: $F_{Salida} = 0$, $k_d = 0$, $X_{do} = 0$ (Alimentación estéril)

$$\frac{d(VX)}{dt} = V\mu X \quad (\text{Ec1})$$

Balance de sustrato reactor en modo de operación Fedbatch

$$\frac{d(VS_r)}{dt} = F_{Entrada}S_d - F_{Salida}S + 0 - Vq_sX$$

$$\text{Supuesto: } F_{Salida} = 0$$

$$\frac{d(VS_r)}{dt} = F_{Entrada}S_d - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec2})$$

$$\frac{d(S_r)}{dt}V + \frac{d(V)}{dt}S_r = F_{Entrada}S_d - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}}$$

Para evitar acumulación de sustrato el inicio de la alimentación se efectúa cuando la concentración de sustrato se hace cero y constante en estado pseudo-estacionario.

$$\text{Supuestos a } t_0=0: S_{r0} = 0, \frac{d(S_r)}{dt} = 0$$

A t_0 se cumple:

$$\frac{d(S_r)}{dt}V + \frac{d(V)}{dt}S_r = F_{Entrada}S_d - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}}$$

$$F_{Entrada}S_{do} = \frac{\mu_0 X_0 V_0}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec3})$$

Balance de sustrato en reservorio de dilución del sistema de alimentación Fedbatch asintótico

$$\frac{d(VS_d)}{dt} = F_{Entrada}S_C - F_{Salida}S_d$$

$$\frac{d(S_d)}{dt}V_d + \frac{d(V_d)}{dt}S_d = FS_C - FS_d$$

$$\text{Supuestos: } F_{Salida} = F_{Entrada} = F \rightarrow V_d = cte, S_C = cte$$

$$\frac{d(S_d)}{dt} = \frac{F}{V_d}(S_C - S_d)$$

$$\int_{S_{do}}^{S_d} \frac{d(S_d)}{S_C - S_d} = \int_0^t \frac{F}{V_d} dt$$

$$-Ln|S_C - S_d| \Big|_{S_{do}}^{S_d} = \frac{F}{V_d} t \Big|_0^t \rightarrow -Ln \left| \frac{S_C - S_d}{S_C - S_{do}} \right| = \frac{F}{V_d} t \rightarrow S_d = S_C - (S_C - S_{do})e^{-\frac{F}{V_d}t} \quad (\text{Ec4})$$

Estrategia de alimentación en Fedbatch

Para que no haya acumulación de sustrato a $t \geq t_0$ el gradiente de alimentación tiene que ser en este periodo igual o menor a la máxima variación de consumo de sustrato.

Supuesto: $X = X_0 e^{\mu_0 t}$ (Cinética de Monod), estado pseudo-estacionario, $\mu_0 \leq \mu_{0Máx}$, a partir de Ec2:

$$\frac{d(FS_d)}{dt} = \frac{d \left[\frac{\mu_o X_o V_o e^{\mu_o t}}{Y_{X/S}} \right]}{dt} \quad (\text{Ec5})$$

Sustituyendo Ec4 en Ec5 se obtiene:

$$\frac{d(FS_d)}{dt} = \frac{d \left[\frac{\mu_o X_o V_o e^{\mu_o t}}{Y_{X/S}} \right]}{dt} \rightarrow F \frac{d(S_d)}{dt} = \frac{d \left[\frac{\mu_o X_o V_o e^{\mu_o t}}{Y_{X/S}} \right]}{dt} \rightarrow$$

$$\frac{F^2}{V_d} (S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} = \frac{\mu_o^2 X_o V_o e^{\mu_o t}}{Y_{X/S}} \quad (\text{Ec6})$$

Modelo de (XV)=f(t) durante alimentación asintótica

Sustituyendo la Ec4 en la Ec2

$$\frac{d(VS_d)}{dt} = FS_d - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}} = FS_C - F(S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}}$$

En estado pseudo-estacionario:

$$\int_0^t \left[FS_C - F(S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} - \frac{V\mu X}{Y_{X/S}} \right] dt = 0 \rightarrow FS_C t - \frac{F^2}{V_d} (S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} - \int_0^t \frac{V\mu X}{Y_{X/S}} dt = 0 \rightarrow$$

Por Ec1:

$$FS_C t - \frac{F^2}{V_d} (S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} - \int_0^t \frac{V\mu X}{Y_{X/S}} dt = 0 \rightarrow$$

$$Y_{X/S} FS_C t - \frac{F^2}{V_d} Y_{X/S} (S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} = XV - X_o V_o$$

$$XV = X_o V_o + Y_{X/S} FS_C t - \frac{F^2}{V_d} Y_{X/S} (S_C - S_{do}) e^{-\frac{F}{V_d} t} \quad (\text{Ec7})$$

7.2. Parámetros fijados para el cálculo de Sd y Sc

Tabla 4. 1. Velocidad específica de crecimiento en etapa de alimentación, 2. Coeficiente de rendimiento de biomasa de ILBB592 en batch, 3. Concentración de biomasa en inicio de alimentación, 4. Volumen de solución del reservorio B transferido al biorreactor, 5. Duración de la etapa de alimentación, 6. Flujo volumétrico de alimentación.

Parámetro		
1	μ_o (h ⁻¹)	0,11
2	$Y_{X/S}$ (g/g)	0,97
3	X_o (g/L)	4,8
4	V_o (L)	1,4
5	V_d (L)	0,6
6	T (h)	8
7	F (L/h)	0,072

8. CASCADA DE EVENTOS DE CONTROL DEL PORCENTAJE DE OXÍGENO DISUELTO (DD)

Variables operaciones	Mínimo	%Out put	Máximo	%Out put
Agitación (rpm)	150	-100	400	-90
Aireación (vvm)	0,5	-90	2,5	100

9. PROVEEDORES DE COMPONENTES DE FORMULACION DE ESPORAS

Componente	Proveedor
PVP	Drog. Ind. Uru
Glicerina	Drog. Ind. Uru
Glutamato monosódico	Drog. Mtveo
Caolín nacional	Drog. Ind. Uru
CMC	Drog. Ind. Uru
carbón activado	Drog. Ind. Uru

10. VELOCIDAD ESPECIFICA MÁXIMA CULTIVO EN MATRAZ Y EN BIORREACTOR (BATCH)

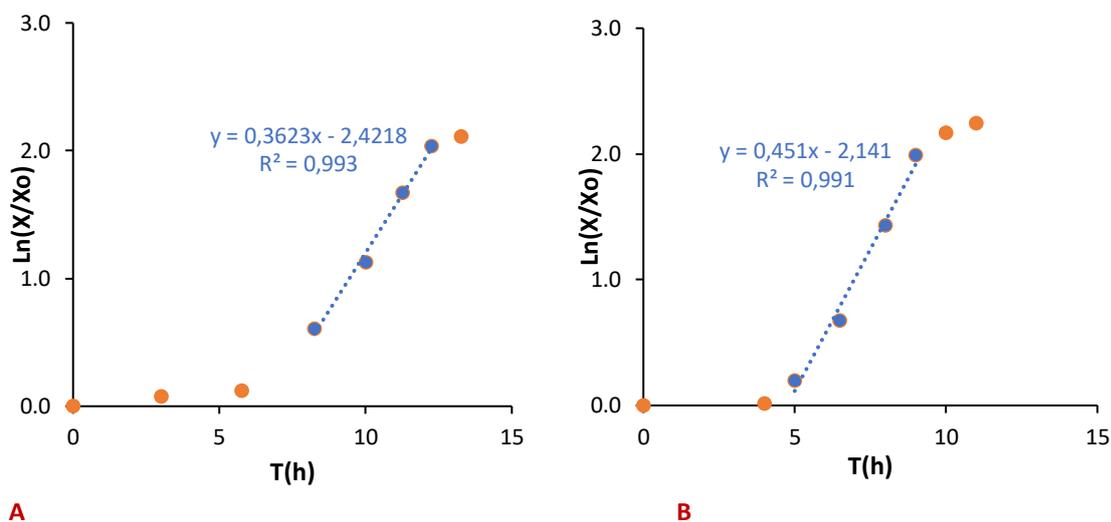


Figura 3. Relación logarítmica de biomasa producida en función del tiempo para el cultivo en matraz y en biorreactor (batch), en las figuras A y B, respectivamente con sus correspondientes modelos de regresión lineal.