

Universidad San Francisco de Quito USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación
de la bacteria *Bacillus subtilis***

Proyecto de investigación

Carlos Fernando Cobo Salcedo

Ingeniería en Agroempresa

Trabajo de titulación presentada como requisito para la obtención del título
de Ingeniero en Agroempresas

Quito, 15 de mayo del 2017

Universidad San Francisco de Quito USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Evaluación de medios líquidos para la multiplicación
de la bacteria *Bacillus subtilis*

Carlos Fernando Cobo Salcedo

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico Carlos Ruales, Ms.S,

Firma del profesor

Quito, 15 de mayo de 2017

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política. Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: -----

Nombre: Carlos Fernando Cobo Salcedo

Código: 00100117

Cedula de identidad: 1804221743

Lugar y fecha: Quito, 15 de mayo de 2016

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar un enorme agradecimiento a Dios por permitir que este proceso llegue a su culminación, a mi director de Tesis, Carlos Ruales, por la gran oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, a mis padres Fernando y Marilú por ser el pilar fundamental de mi formación, a mi hermano Álvaro, a mis colegas, amigos, compañeros y todos aquellos que durante este tiempo me han brindado su apoyo y solidaridad.

RESUMEN

En la actualidad el desarrollo de nuevas tecnologías para combatir plagas y enfermedades es importante en la evolución de la agricultura, y con esta misma corriente va la búsqueda de nuevas alternativas para la elaboración de nuevos productos que además de ser amigables con el medio ambiente sean accesibles para cualquier agricultor. Las características antagonistas del género *Bacillus* se han utilizado como medida para el control de plagas y enfermedades y así tratar de mitigar el uso indiscriminado de productos químicos. La bacteria gram positiva *B. subtilis* puede ser utilizada para estos fines por su característica de producir sustancias antibióticas y de adaptación a varios tipos de sustratos, en este sentido *B. subtilis* es utilizado como agente antagonista de hongos fitopatógenos como: *Sclerotinia*, *Collectotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, y *Penicilium*. Este estudio se basa en la búsqueda de medios de cultivo líquidos de bajo costo para la multiplicación de esta bacteria. Después de pruebas preliminares se establecieron cuatro sustratos principales, el primer sustrato a base de leche azucarada adicionada con un caldo base rico en minerales, otro a base del subproducto agroindustrial lactosuero, otro a base de bebida de soya fortificada y por último un medio a base de levadura activada; cada tratamiento con tres repeticiones dando un total de doce unidades experimentales todos estos tratamientos bajo un sistema de fermentación y agitación continua con diluciones seriadas consecutivas como método de conteo. Los resultados a los 12 días indicaron que el tratamiento a base de leche azucarada alcanzó un valor de 1.97×10^{10} UFC (Unidades formadoras de colonia)/ml de medio de cultivo líquido, el segundo tratamiento a base de lactosuero obtuvo un valor final de 2.23×10^{10} UFC/ml de medio de cultivo líquido, el tercer tratamiento a base de bebida fortificada de soya obtuvo un valor de 3.07×10^{12} UFC/ml de medio de cultivo líquido y por último el tratamiento a base de levadura activada siendo el menos efectivo alcanzando de 2.93×10^3 UFC/ml de medio de cultivo líquido, se encontró notorias diferencias estadísticas entre los tratamientos en las tres fases del crecimiento de la bacteria y por lo tanto el tratamiento a base de bebida fortificada de soya es el más eficiente y de bajo costo para la multiplicación de la bacteria comparado con productos comerciales.

Palabras Clave: biocontrolador, *B subtilis*, lactosuero, soya, hongos fitopatógenos

Abstract

At present, the development of new technologies to combat pests and diseases is important for the sustainability and evolution of agriculture, in addition to the search for new alternatives for the development of new products that are friendly with the environment and economically accessible to any farmer. The antagonistic characteristics of the genus *Bacillus* have been used as a measure for the control of pests and diseases and thus try to mitigate the indiscriminate use of chemicals. The gram positive bacteria *B. subtilis* can be used for these purposes because it's characteristic of producing antibiotic substances and can be adapted to several types of substrates for commercial scale production. In this sense *B. subtilis* is used as an antagonist agent of fungal phytopathogens such as: *Sclerotinia*, *Collectotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, and *Penicilium*. This study is based on the search of liquid culture media suitable for the multiplication of this bacterium. After a preliminary series of tests four main substrates were established, the first substrate based on sugared milk, another based on the agro-industrial sub product lactosuero, another based on fortified soy drink and finally a medium based on activated yeast; Each treatment with three replicates giving a total of 12 experimental units all these treatments under a continuous fermentation and agitation system with consecutive serial dilutions as a counting method for a period of 12 days, The results indicated that the treatment based on of sweetened milk present a final concentration of 1.97×10^{10} UFC/ml of liquid culture medium, the second treatment based on lactosuero obtained a final concentration of 2.23×10^{10} UFC/ml of liquid culture medium, the third treatment based on fortified beverage of soybean obtained a value of 3.07×10^{12} UFC/ml of liquid culture medium and finally the treatment based on activated yeast being the less effective reached a final value of 2.93×10^3 UFC/ml of liquid culture medium, therefore it was found notorious statistical differences between the treatments in the phases of the growth of the bacterium and consequently the treatment based on fortified soy drink is the most efficient and more economical for the multiplication of the bacterium compared to commercial products

Key words: biocontrol, *B. subtilis*, lactosuero, soy, fungal phytopathogens

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	10
1.1. Antecedentes.....	10
1.2. Justificación.....	11
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo General.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Hipótesis.....	17
4. Revisión de literatura.....	17
4.1. Hongos patógenos de plantas	17
4.1.1.1. Importancia y descripción.....	17
4.1.1.2. Ciclo biológico hongos patógenos.....	18
4.2. <i>Bacillus subtilis</i>	20
4.2.1.1. Caracterización General.....	20
4.2.1.2. Efecto antagonista.....	21
5. Materiales y Métodos.....	24
5.1. Localización del estudio.....	24
5.2. Material biológico.....	24
5.3. Reconocimiento de la bacteria.....	24
5.4. Diseño estadístico.....	24
5.5. Inóculo inicial.....	25
5.6. Preparación de medios.....	25
5.7. Incubación y condiciones de fermentación.....	27
5.8. Método de extracción y conteo bacteriano	27
6. Resultados.....	28
7. Discusión.....	33
8. Conclusiones.....	36
9. Recomendaciones.....	37
10. Bibliografía.....	39
11. Anexos.....	47

Índice de tablas

Tabla No.3 Tabla de resultados Generales de la concentración de UFC/ml.....	29
Tabla No.2 Tabla de precios de cada tratamiento y proyección de costos.....	32

Índice de Gráficos

Gráfico No.1 Ciclo biológico hongos patógenos de plantas	18
Gráfico No.2 Estructura representativa de lipopéptidos	23
Gráfico No.3 Fotografías de UFC de <i>B. subtilis</i> en fase tres.....	28
Gráfico No.4 Curvas de crecimiento de los cuatro tratamientos de <i>B. subtilis</i>	30
Gráfico No.5 Valores de medias de fase tres y test de Tuchey (5%).....	31

1. Introducción

1.1. Antecedentes

El vertiginoso crecimiento de la población en los últimos 50 años, obliga a ser más responsables con los recursos naturales, exige la práctica de una agricultura no invasiva y sobre todo sustentable con el medio. Prácticas actuales como el uso excesivo de agroquímicos afectan no solo especies vegetales sino también a animales y seres humanos (Duffus, 1997). Es por esta razón que un manejo integrado de plagas conjuntamente con un correcto manejo de recursos pueden encaminar al objetivo de producir más y mejores alimentos (Altieri, y otros, 2004).

Últimamente se introduce el término “BIO-CONTROLADOR” que corresponde a agentes biológicos benéficos que ayudan a controlar plagas en diferentes cultivos (Altieri, 1995), y se catalogan como cualquier organismo que ayude a erradicar o mitigar una población específica de organismos que estén afectando al crecimiento y desarrollo de la planta, entre lo que más conocidos últimamente son: *Bacillus*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Paecilomyces* y otros (Donoso, 2006).

El género *Bacillus* pertenece a un grupo de bacterias bastante conocida, con diferentes tipos de especies muy utilizadas en la actualidad especialmente en la industria de la fermentación (Zukowski, 1992). La mayoría de las cepas de *Bacillus* son microorganismos mesófilos que crecen rápidamente, produciendo colonias de buen tamaño hasta en 24 horas a una temperatura específica.

B. subtilis se clasifica dentro del grupo dos de seis, el cual está formado por bacterias que comparten la característica de catabolizar un amplio rango de carbohidratos por las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis) y de pentosas fosfato (Priest, 1993). La mayoría de estas bacterias crecen en condiciones anaeróbicas por respiración de nitratos a excepción de *B. megaterium* y *B. pumilus*, mientras que algunas como *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis* fermentan azúcares en ausencia de un aceptor final de electrones (Shariati y otros, 1995).

B. subtilis, es un microorganismo que fue catalogado como aerobio estricto por mucho tiempo, hasta que Priest(1993) dio a conocer la habilidad de *B. subtilis* para crecer en condiciones anaeróbicas. En ciertos estudios se presenta la habilidad de *B. subtilis* para desarrollarse en ausencia de oxígeno bajo respiración de nitratos o también por la fermentación en medios ricos con proteína, glucosa y piruvato (Hoffmann, 1995; Nakano, 1997; Nakano y Zuber, 1998; Espinosa de los Monteros y otros., 2001).

1.2. Justificación

En la agricultura moderna, se ha sesgado la sostenibilidad de la producción agrícola. El elevado uso de agroquímicos sin lugar a duda ha permitido obtener incrementos importantes en la productividad, sin embargo sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura (Bashan, 1996). Causas como la práctica del monocultivo, la contaminación de suelo y agua por el elevado uso de pesticidas químicos han originado una notoria inestabilidad de los ecosistemas agrícolas, reduciendo la biodiversidad de estos. Lo que se manifiesta principalmente en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos (Fernández, 2001).

Los biopesticidas tienen algunas ventajas comparativas sobre sistemas de control fitosanitarios convencionales debido a que poseen multiplicidad de mecanismos de acción. Los biopesticidas compiten por nutrientes y espacio con el patógeno y presentan antagonismo directo e inducen inmunización de la planta (Narváez, 2015). También son biodegradables y no se acumulan. Narváez también compara la aceptación de estos productos biocontroladores con organismos genéticamente modificados, resultando los biopesticidas con mayor aceptación por parte de los consumidores. A pesar de ello, la venta de biopesticidas representó solamente un porcentaje del 2.5% en el mercado mundial de los pesticidas, pero el interés en estos productos ha aumentado con un crecimiento anual del 15% (Cawoy, 2011).

Contrario a los pesticidas químicos de uso convencional, los biopesticidas son relativamente fáciles de producir a una escala apropiada con tecnología que está al alcance de países en vías de desarrollo (Attathom, 2002). Un conocimiento avanzado en biotecnología y biología molecular facilita la producción de biopesticidas, volviéndolos más eficientes y económicamente asequibles para una agricultura moderna (Alvarez y del Valle, 2012). Según estudios realizados por Sachidanadham y otros (1997) las bacterias del género *Bacillus* tienen aptitud para ser tratadas industrialmente para la producción masiva y la aplicación en el campo como insecticida microbiológico (García, 2011). La capacidad de *Bacillus* de producir endoesporas hace que sea factible transformar los cultivos bacterianos después de la fermentación a productos de fácil utilización en el campo como formulaciones de polvo mojable, además la vida en percha de biopesticidas a base de bacterias esporulantes es más larga y requiere menos precauciones en el almacenaje (Narváez, 2014). Las bacterias de este género no requieren de suplementos nutricionales específicos por lo que son relativamente fáciles de producir industrialmente (Cawoy y otros, 2011). Aun así, es necesario hacer investigación para optimizar el medio de fermentación de estas bacterias (Özcan, 2008).

Por lo tanto, la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para la elaboración de biopesticidas es muy importante en la agricultura moderna, tecnologías que apunten a abaratar costos de producción y sustentabilidad en los procesos agroindustriales. En el caso de las bacterias, algunas pueden crecer en casi cualquier medio de cultivo (Tortora, 2007); otras requieren medios especiales y por eso se debe analizar los requerimientos básicos para la elaboración de los medios de cultivo.

El medio de cultivo que se define como la base para la multiplicación de cualquier microorganismo y debe constar de necesidades básicas como agua, carbono, nitrógeno y minerales (Yáñez, 2012). En ocasiones también factores de crecimiento y de ser necesario oxígeno para formar su biomasa y como fuente de energía para la síntesis y mantenimiento celular. Debido a que la mayoría de microorganismos tienen una composición elemental muy similar se puede diseñar un medio de cultivo idóneo adaptando a recursos existentes (Devine, 2000).

La elaboración de nuevos medios de cultivo debe regirse estrictamente al requerimiento del microorganismo. Fuentes minerales como el carbono, que es uno de los requerimientos nutricionales más importantes para el crecimiento microbiano y es porque este constituye la estructura básica de la materia viva y es necesario para la formación de los compuestos orgánicos (Waites, 2001). Se ha demostrado que el 50% del peso seco de una célula bacteriana típica es carbono, como elemento mayoritario de sus macromoléculas, y en el caso de *B. subtilis* diversas fuentes de carbono simples o complejas como glucosa o sacarosa influyen en el crecimiento celular y la biosíntesis de antibióticos. Otra fuente importante para el diseño de un medio de cultivo idóneo es el nitrógeno, necesario para la síntesis del material celular principalmente proteínas. Por lo que el nitrógeno es el segundo elemento más abundante en la célula bacteriana llegando a constituir cerca del 14% de su peso seco. La mayoría de bacterias utilizadas en procesos industriales pueden asimilar fuentes orgánicas e inorgánicas. El nitrógeno orgánico puede ser suministrado por medio de aminoácidos, subproductos o destilados de carnes y levaduras (Stambury 1995). En *B. subtilis* diversas fuentes de nitrógeno como la peptona tienen un significativo efecto de sustancias anti fúngicas (Jacques y otros 1999). Las bacterias también necesitan de elementos minerales como hierro, cobre, molibdeno, magnesio y zinc denominados oligoelementos son muy importantes en actividades enzimáticas (Waites, 2001). En *B. subtilis* estos oligoelementos han sido referidos han sido relacionados como factores determinantes en el crecimiento y la producción de metabolitos (Cooper, 1981). Varios autores han descrito que los cationes de Mn, Fe, Mg, y Zn provenientes de sales inorgánicas disueltas en el medio de cultivo a concentraciones mili molares pueden incrementar la producción de células y metabolitos en diferentes cepas de *B. subtilis* (Abdel-Mawgoud, 2008, Tabbene 2009).

En general, se pueden distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos o continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Hernández, 2003). En función de la composición y concentración de nutrientes de los medios de cultivo pueden ser medios químicamente definidos o medios

complejos (Zhang y Greasham, 1999). Mientras los medios de cultivo químicamente definidos tienen como principal ventaja su estandarización y estabilidad en el tiempo debido a que se conoce con exactitud su composición química, usualmente este tipo de medios se utilizan a nivel laboratorio, ya que la producción con ellos no suele ser elevada. Los medios complejos que a su vez generan una alta productividad de microorganismos contienen ingredientes de origen natural cuya composición no es completamente conocida, Generalmente los sustratos utilizados son fuentes de nitrógeno orgánico como extracto de levaduras, carnes, plantas o digeridos de proteínas de estas u otras fuentes (Tortora, 2007). Estos sustratos satisfacen los requerimientos de energía, carbono, nitrógeno y azufre de los microorganismos y proporcionan aminoácidos, oligoelementos, vitaminas y factores de crecimiento orgánicos para una producción (Crueger y Crueger, 1993). Sin embargo estos sustratos tienen un elevado costo para ser utilizados en la producción a nivel industrial por esta razón se recurre al uso de subproductos provenientes de industrias alimenticias y agrícolas que pueden brindar un balance nutricional adecuado (Waites, 2001).

Los subproductos usados en el medio de cultivo deben satisfacer los requisitos básicos antes descritos para la producción de biomasa y metabolitos, proporcionando un suministro adecuado de nutrientes y energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular (Stanbury, 1995). Además de ser un medio económicamente sustentable debe proporcionar una base sólida para el escalado de producción a nivel industrial.

Sin dudas una de las mayores ventajas para el uso de subproductos es el bajo costo, la alta disponibilidad, y el beneficio medioambiental al ser productos reciclados que se incorporan nuevamente en la cadena industrial, contrapuestamente los inconvenientes más importantes son la composición química variable y la posible presencia de productos tóxicos o metabolitos que pueden afectar al crecimiento del microorganismo (Stambury, 1995 Zhang, 1996 y otros).

Los subproductos de bajo costo comúnmente utilizados para la producción de bacterias incluyendo una amplia variedad de aislados de *B. subtilis* son:

Concentrados proteicos de origen animal que provienen de la desecación y molturación de desechos de pescado y carne. Son fuentes proteicas de gran valor biológico y alto contenido de aminoácidos esenciales (Yáñez, 2012).

Productos o subproductos de soya son considerados como excelentes sustratos para la producción industrial de bacterias benéficas y sus metabolitos, esto debido a que contienen elevados porcentajes de proteínas alrededor de 40% y un 35% de carbohidratos. Subproductos de soya como diferentes tipos de harina desengrasada, leche, licor, y molturas de soya son muy utilizados para la producción industrial de bacterias benéficas y sus metabolitos incluyendo a *B. subtilis* (Reis, 2004; Yu, 2008; Ewe, 2010).

Las melazas como subproducto proveniente de la elaboración del azúcar a partir de la caña de azúcar y menor grado de la remolacha azucarera, debido a su bajo costo y a su composición rica en azúcares fermentables (principalmente de sacarosa en un 50%), sustancias nitrogenadas, vitaminas del grupo B y abundantes minerales como hierro, fósforo, potasio, zinc, sodio, cobre y magnesio constituye una de las fuentes de carbono más utilizadas para la producción industrial de microorganismos (Costa 2001). Los medios constituidos por melaza en combinación con otras fuentes de nitrógeno proveen nutrientes y energía para un rápido incremento y mantenimiento celular.

Otro de los subproductos agroindustriales más utilizados en la multiplicación de bacterias es el suero proveniente de elaboración de quesos conocido más comúnmente como lactosuero, utilizado actualmente como fuente de alimento para ganado porcino es todavía inutilizable en un país por costumbre ganadero. En general, en todos los tipos de suero, la lactosa constituye el 75% de los sólidos, sin embargo, el resto de los sólidos representan una excelente fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, cuya importancia ha sido reconocida en los últimos años (Yáñez, 2012). Entre las principales fracciones proteicas de la leche liberadas en el suero, se encuentran en mayor cantidad las proteínas globulares solubles β -lactoglobulina (β -LG) y β -lactalbúmina (α -LA) en una relación 3:1 y como constituyentes menores: seroalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina, proteosaspeptonas y transferrina; en total ellas representan el 98% de la proteína soluble. Esto es equivalente a 6 g por cada

kilogramo de leche completa, empleada en la fabricación de los quesos. Todas estas proteínas están presentes en los tipos de lactosuero mencionados. Adicionalmente a estas proteínas, en el suero derivado de quesos obtenidos por la acción de la quimosina, se encuentra la porción hidrosoluble de la k-caseína conocida como glicomacropéptido (GMP). La quimosina rompe, preferentemente, el enlace Phe-Met de la k-caseína de la leche, obteniéndose dos fracciones: GMP, porción hidrofílica de carácter ácido, constituida por 64 aminoácidos, y una porción hidrofóbica, de carácter básico, compuesta por 105 aminoácidos, llamada paracaseína-k, la cual forma parte integral de la cuajada a partir de la cual se obtienen los distintos tipos de quesos (Almécija, 2007). El GMP representa entre un 20% y 25% de la proteína total presente en el suero (Scott, 1991).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar el crecimiento en diferentes medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis*

2.2. Objetivos específicos

- Determinar curvas de crecimiento sobre la bacteria *B. subtilis* en cuatro diferentes medios de cultivo.
- Valorar cada medio de cultivo en la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionario de la bacteria.
- Analizar los costos de cada medio de cultivo para una producción comercial de la bacteria.

3. Hipótesis

La composición y origen del medio de cultivo líquido influyen de manera directa en la concentración final de UFC en *B. subtilis*.

4. Revisión de Literatura

4.1. Hongos patógenos de las plantas

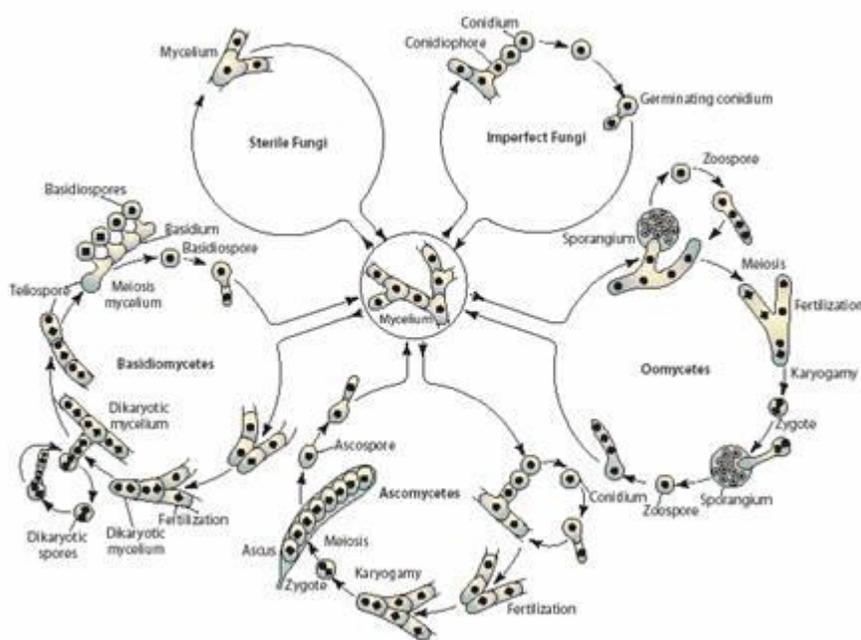
4.1.1.1. Importancia y descripción

Los hongos son organismos eucariontes uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células pluricelulares se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio. Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes (Urbina, 2011). La mayoría de las 100.000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Se considera que más de 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biotrofos. Otros requieren de una planta hospedante durante una

cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose tanto en materia orgánica muerta como en plantas vivas (Agrios 2005).

2.1.1.1. Ciclo biológico de hongos patógenos

Gráfico No.1 Ciclo biológico, Hongos fitopatógenos



(Agrios, 2005)

Según Agrios (2005), los hongos se reproducen principalmente mediante esporas, las esporas son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la producción, por el micelio del hongo, de células individuales especializadas las esporas sin intervención de cariogamia o meiosis) o ser el resultado de un proceso sexual. En los hongos inferiores, las esporas asexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y

se diseminan en el momento en que se rompe esta estructura o a través de una abertura que posee. Algunas de esas esporas se mueven mediante flagelos y se les denomina zoosporas. Otros hongos producen esporas asexuales denominadas conidios, que se desprenden de las células terminales o laterales de hifas especializadas denominadas conidióforos. En algunos hongos, las células intercalares o terminales de una hifa se alargan, están rodeadas por una pared densa y se separan para formar clamidosporas. En otros grupos de hongos, las esporas asexuales (conidios) se forman en el interior de estructuras de pared gruesa denominadas picnidios. La reproducción sexual, o los procesos que se asemejan a ella, se presentan en la mayoría de los grupos de hongos. En algunos de ellos, un par de células (gametos) de tamaño y forma semejante se fusionan y producen un cigoto, denominado zigospora. En otros grupos, los gametos son de tamaño distinto y al cigoto que forman se le denomina oospora. En algunos hongos, no se forman gametos definidos, y en lugar de ello un micelio se fusiona con otro micelio compatible (Agrios, 2005). La fusión de los núcleos sexuales del cigoto produce un núcleo diploide ($2n$). Por lo común, las primeras divisiones de este núcleo son meióticas, de ahí que el hongo contenga núcleos haploides ($1n$) durante todo su ciclo de vida, excepto en el momento en que se han fusionado los núcleos gaméticos. Sin embargo, en algunos grupos de hongos, en particular en los basidiomicetos y en menor grado en los ascomicetos, las células de todo el micelio o de ciertas partes de él contienen un par de núcleos haploides, los cuales se mantienen separados en el interior de la célula. A dicho micelio se le denomina dicariótico, pero se comporta de manera bastante semejante a como lo hace un micelio diploide (en el que ambos núcleos se mantienen fusionados) (Agrios, 2005). En la mayoría de los hongos, los gametos masculino y femenino se forman en un mismo micelio (como es el caso de los hongos hermafroditas). Cuando los gametos masculinos fecundan a los femeninos del mismo micelio, el hongo se le denomina homotálico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los gametos masculinos fecundan únicamente a los gametos femeninos de otro micelio sexualmente compatible, por lo que se dice que el hongo es heterotálico (Rivera, 2007).

4.2. *Bacillus subtilis*

4.2.1.1. Caracterización general

El género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, una de las familias bacterianas con mayor actividad bioquímica referenciada en la literatura científica que abarca tanto su utilización dentro de las actuales políticas de control biológico como el uso de los productos de su metabolismo para la industria (Slepecky, 1992). Son bacilos aerobios y anaerobios facultativos gram positivos, producen endosporas con morfología oval o cilíndrica que le permite resistir condiciones desfavorables en el ambiente, son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 - 8.5. La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda (Snay y otros, 1989). Las células en crecimiento no se propagan fácilmente en medios líquidos. Estos microorganismos por lo general crecen bien en agar sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares (Stephenson y otros, 1999).

Dentro de las especies más representativas de este género con propiedades de antagonismo celular contra patógenos de plantas encontramos a *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis*. El metabolismo de *B. subtilis* es predominantemente respiratorio, siendo el oxígeno el aceptor terminal de electrones, por tanto en presencia de oxígeno resulta abundante crecimiento con la formación de 2,3-butanodiol, acetoina y CO₂ como productos principales. En ambientes con reducción de oxígeno se puede evidenciar crecimiento y fermentación débil en medios que contengan glucosa (Wang, 1992), por otra parte el comportamiento bioquímico de *B. brevis* no relacionado con su poder biocontrolador está caracterizado por ser amilasa negativo, caseína negativo, gelatinasa positiva, indol negativo y la mayoría utilizadores de citrato (Marino, 2001).

B. subtilis se encuentra ampliamente distribuido en suelos agrícolas, raíces de las plantas y en el tracto gastrointestinal de los animales así también como en agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida. Igualmente *B. subtilis* se

ha aislado en alimentos, incluidas las especias, cacao, legumbres, semillas, y pan (Slepecky, 1992).

En diferentes aislamientos se ha evidenciado la presencia de cepas antagonista sobre patógenos de plantas (Castellanos, 2005), además poseen un alto poder de adaptación a diversos ambientes mediante la formación de endosporas; estructuras resistentes frente a la falta de nutrientes y situaciones adversas.

4.2.1.1. Efecto antagonista

La acción biocontroladora de *B. subtilis* está estrechamente relacionada con la producción de metabolitos antibióticos capaces de actuar sobre microorganismos de diversa etiología; la antibiosis. Los péptidos que produce y que tienen esta acción son variados y representan un grupo no muy heterogéneo entre sí de metabolitos activos que afectan directamente a algunos patógenos de plantas, el mecanismo de acción de *B. subtilis* se da mediante la secreción de diversas sustancias que se producen cuando la bacteria recibe los nutrientes presentes en la superficie de las raíces de las plantas que induce la elaboración de metabolitos secundarios con capacidad de suprimir el crecimiento de hongos, oomicetos y bacterias fitopatógenas (Torres,2001). En general la actividad biocontroladora la ejerce mediante la producción de lipopéptidos cíclicos antibióticos (CLPS) entre los cuales se destacan el surfactin y el Iturin A ;sustancias que han demostrado amplio espectro de acción sobre patógenos de plantas, en los que se encuentran especies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* y *Verticillium* (Raghavendra,2005).

La característica biocontroladora, es efecto de diversos mecanismos, entre ellos la antibiosis que ejerce *B.subtilis* con la producción de péptidos, lipopéptidos y fosfolípidos que se utilizan como agentes terapéuticos contra bacterias patógenas y hongos (Compant, 2005). Estos compuestos tienen origen peptídico y pueden ser sintetizados o no en el ribosoma. Entre las sustancias que no son sintetizados en el ribosoma se destacan los lipopéptidos como

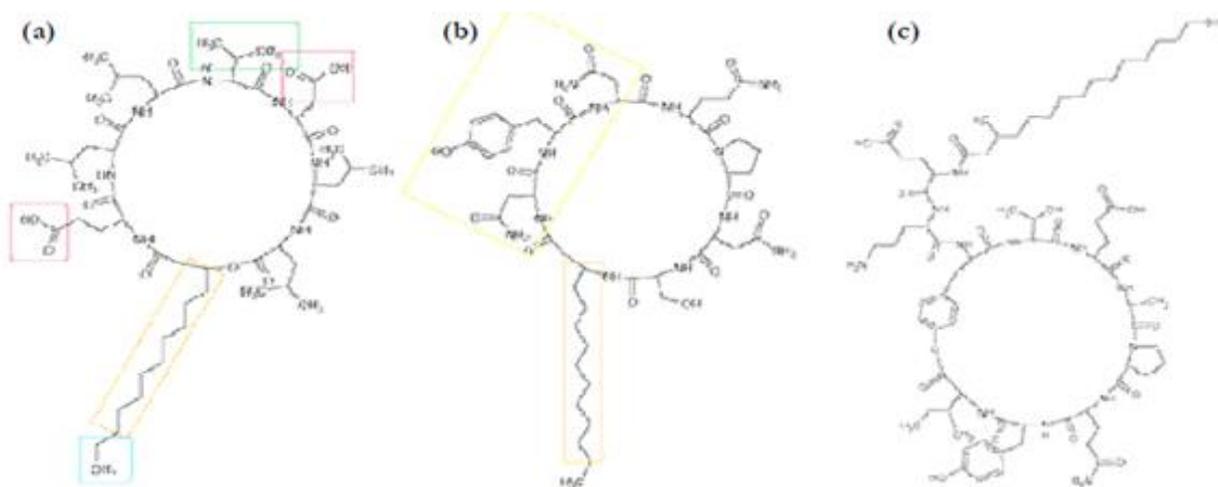
el surfactina, Iturina, y fengycina. El ribosoma realiza la síntesis durante el crecimiento activo de las bacterias, a diferencia de los que no son sintetizados por el ribosoma que se producen después del crecimiento bacteriano (Compant, 2005). Sin embargo, este microorganismo posee otro tipo de características que probablemente determinan su eficacia relacionada con el amplio espectro de acción y la resistencia a la hidrólisis por peptidasas y proteasas, de igual forma presenta resistencia a altas temperaturas y a una amplia gama de pH (Chavez,2007). Todos los genes involucrados en la síntesis de antibióticos de *B. subtilis* ascienden a 350 kb. Es importante resaltar que un promedio entre 4-5% del genoma de este microorganismo se encarga de la producción de antibióticos.

La actividad antimicrobiana de los lipopéptidos se da por la interacción con la membrana de las células diana, en la cual se modifica la permeabilidad y la composición de los lípidos de la membrana con la formación de pequeñas vesículas y la agregación de partículas intra membranosas, de esta forma inhiben el crecimiento del micelio y el desarrollo de los hongos (Romero, 2007). Las variaciones en la longitud y ramificación de las cadenas de ácidos grasos, así como las sustituciones de aminoácidos permiten la diferenciación de los lipopéptidos identificados hasta ahora en el género *Bacillus* los cuales se dividen en tres grupos surfactina, iturina y fengycina.

La familia de surfactina son heptapeptidos que tienen un ácido graso β -hidroxilo con una cadena de átomos de carbono de 13 a 16. Son poderosos surfactantes con excepcionales propiedades emulsificantes y espumantes usados en bioremedación y biotecnología (Jacques, 2011) no son fungitoxinas por ellas mismas pero muestran actividad anti fúngica en sinergismo con iturina A (Maget-Dana1992). La familia de las Iturinas principalmente iturina A y C, bacillomidina D, F, L Y LC y micosubtilina que al igual que las surfactinas son heptapeptidos con un ácido graso β -amino de 14 a 17 carbonos de largo que poseen actividad anti fúngica e inhibitoria de crecimiento de un amplio rango de patógenos de plantas (Romero 2007) y la familia de las fengicidas principalmente fengycina A y B son decapeptidos con un anillo interno de lactosa en la fracción peptídica y un ácido graso β -hidroxilo de 14 a 18 carbonos de largo que pueden ser saturados o insaturados. Las

fengecidas son menos conocidas que las iturinas y las surfactinas, pero mantienen una actividad fungitoxica muy fuerte especialmente contra los hongos filamentosos (Vanittanakom, 1986; Romero, 2007).

Gráfico No.2 Estructura representativa de lipopéptidos de las familias (a) surfactina (b) iturina y (c) fengicina



(Peypoux *et al.* 1999; Bonmatin *et al.* 2003; Dufour *et al.* 2005).

5. Materiales y métodos

5.1. Localización del estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos de la Universidad San Francisco de Quito ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Quito, bajo condiciones controladas propias del laboratorio.

5.2. Material biológico: cepa de *B. subtilis*

El material genético que se utilizó, consiste en la cepa (BS001) de la bacteria *B. subtilis* que se obtuvo del banco de cepas del laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito.

5.3. Reconocimiento de la bacteria

Mediante un proceso conocido como Tinción de Gram (Brock, 1996), que bajo la presencia de cristal violeta y lugol, colorantes que penetran en las paredes de las células bacterianas tiñéndolas de un color azul-violeta si corresponden a organismos Gram positivos, se pudo identificar la bacteria *B. subtilis*.

5.4. Diseño estadístico

La evaluación de los medios de cultivo líquidos sobre la concentración final de UFC (unidades formadoras de colonia) se evaluó mediante un diseño estadístico completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones dando un total de 12 unidades experimentales.

La variable de respuesta fue el número de UFC/ml de medio de cultivo líquido, observadas por el método de diluciones consecutivas estandarizadas, los resultados fueron analizados estadísticamente a través de ANOVA y como existió una $p < 0.05$ se procedió con un análisis de datos utilizando una prueba de diferencia significativa de Tuckey para observar si existe una diferencia estadística entre los tratamientos.

5.5. Inóculo inicial

Posterior al reconocimiento de la bacteria, se programó una multiplicación seriada de la bacteria, esto con el objetivo de contar con el material biológico suficiente para el inóculo a los tratamientos por lo que se procedió a la adición de 10 μ L de bacteria en estado puro en 6 tubos con 5 ml con medio T3 líquido (Anexo 1), los mismos que pasaron por fermentación a 37 grados centígrados y a 121 rpm por un periodo de 48 horas con revisiones periódicas entre 24 y 48 horas, en esta fase se pudo apreciar la formación de estructuras estriadas color blanquecinas correspondiente a las colonias de la bacteria. Posteriormente se extrajo de estos tubos 10 μ L y se adiciono en 9 tubos con 5 ml de medio T3 líquido, estos a su vez pasaron a fermentación por 48 horas a 37 grados centígrados y 121 rpm. Hasta que se pudo visualizar la misma estructura blanquecina anteriormente detallada.

5.6. Preparación de Medios

5.6.1. Medio de cultivo a base de Leche azucarada

Este medio consta de 350 mL (70%) de leche azucarada, (anexo 1), y 150 mL (30%) de caldo base (anexo 1), luego de combinarlos en recipientes de 100 mL de capacidad se coloca en autoclave a 121 grados centígrados y 1 atm, durante 60 minutos, y posteriormente se deja enfriar dentro de la cámara de seguridad durante 30 minutos.

5.6.2. Medio de cultivo a base del subproducto agroindustrial LACTOSUERO

Este medio consta de 350 mL (70%) de lacto suero, subproducto agroindustrial proveniente de la elaboración de quesos, y 150 mL (30%) de caldo base (anexo 1), luego de combinarlos en recipientes de 100 mL de capacidad se coloca en autoclave a 121 grados centígrados, 1 atm, durante 60 minutos, y posteriormente se deja enfriar dentro de la cámara de seguridad durante 30 minutos.

5.6.3. Medio de cultivo a base de bebida de soya fortificada

Este medio consta de 500 mL (100%) de bebida de soya fortificada (anexo 1), dosificado en recipientes de 100 mL de capacidad posteriormente se coloca en autoclave a 121 grados centígrados, 1 atm, durante 60 minutos y posteriormente se deja enfriar dentro de la cámara de seguridad durante 30 minutos.

5.6.4. Medio de cultivo líquido a base de levadura activada

Este medio consta de 175 g de levadura comercial previamente activada con 40 g de azúcar en 300 mL (60%) de agua tibia (30 °C a 35 °C) durante 20 minutos, posteriormente esté preparado se combina con 150 mL (30%) de caldo base (anexo 1), y se le añade 50 mL (10%) de miel de caña, se traslada al autoclave a 121 grados centígrados, 1 atm, durante 60 minutos, y posterior se deja enfriar en la cámara de seguridad durante 30 minutos.

5.7. Incubación y condiciones de fermentación

Después de que los medios de cultivo líquidos se hayan enfriado a temperatura ambiente en la cámara de seguridad se añadió de 10 μ L proveniente de los tubos con el inóculo inicial de *B. subtilis* a cada uno de los medios líquidos de forma aleatoria. Posteriormente las 12 unidades experimentales pasan a proceso de fermentación de 12 días bajo una máquina fermentadora-agitadora (Marca: Labline de Orbit). Temperatura de 37 grados centígrados y 121 revoluciones por minuto para asegurar movimiento del medio de cultivo y presencia de oxígeno.

5.8. Método de extracción y conteo bacteriano

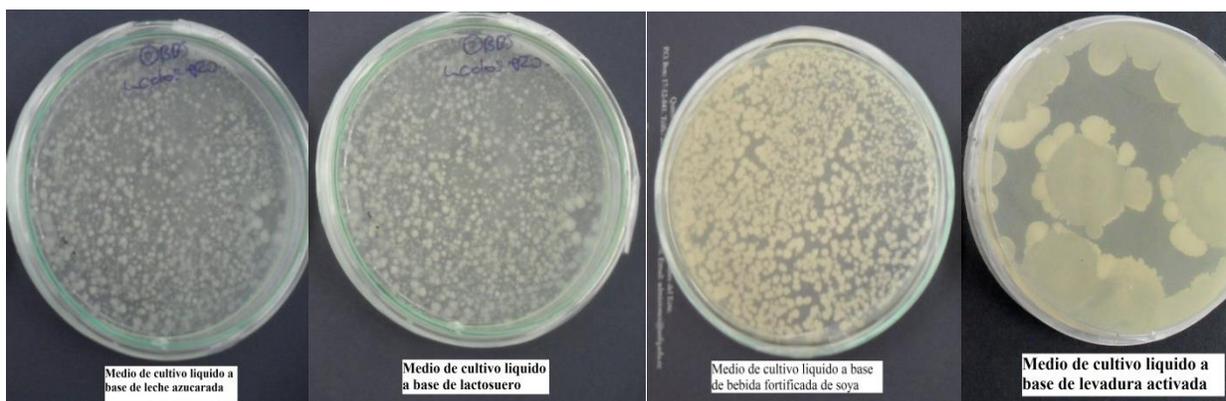
El método de conteo es permitir el crecimiento de una sola célula en la superficie de un medio de cultivo sólido apropiado, se postula que cada colonia proviene de una sola célula y teniendo en cuenta el volumen del inóculo empleado y la suspensión- dilución sembrada se calcula en número de UFC (Froni, 2011).

Para lo cual se tomó 1 mL de cada medio de cultivo y se trasladó a un tubo de ensayo previamente preparado con 9 mL de agua esterilizada, este a su vez pasa por una centrifuga durante 10 segundos para homogenizar la mezcla. Después procedemos a tomar 1 mL de este tubo y pasarlo a otro que contenga 9 mL de agua esterilizada y volvemos a repetir este proceso hasta 12 veces consecutivas, finalmente se procede a la siembra de 0.1 mL de los tubos correspondientes a la diluciones en una en cajas Petri con medio sólido T3 (anexo 1) para que posteriormente estos contenedores pasen por un proceso de incubación durante 48 horas a 37 grados centígrados para posterior conteo de colonias seleccionando cajas que presenten entre 30 y 300 UFC según lo estipula la norma INEN 1205:2013

6. Resultados

La obtención de datos se dividió en tres fases, la fase uno se encuentran los datos de los medios de cultivo desde el momento del inóculo hasta el día tres (primeras 72 horas), la fase dos consta a su vez de los datos del día 8 (192 horas), y por último la fase tres que recoge datos desde el día 8 hasta el día 12 (288 horas). La concentración final de UFC/ml de medio de cultivo líquido de cada fase fue la variable analizada en este experimento.

Gráfico No.3 Fotografías de concentración final (fase tres) de UFC/ml de cada uno de los tratamientos.



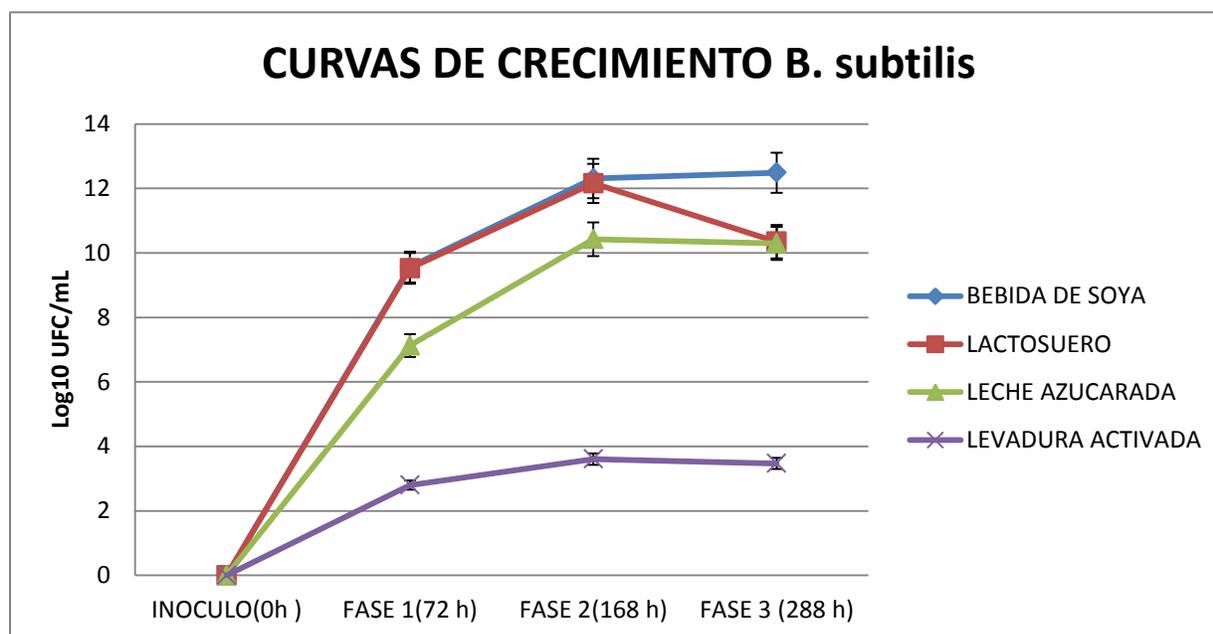
En el (gráfico 3), se puede apreciar las fotografías de UFC de *B. subtilis* en un medio de cultivo sólido, en donde se pueden comparar cada tratamiento. Se puede evidenciar visualmente que existe una gran variación entre tratamientos, todas las fotografías corresponden a la fase tres del experimento.

Tabla No.1 Tabla de resultados generales de las concentraciones de UFC en cada fase del crecimiento microbiano, cada tratamiento con tres repeticiones, la media de las repeticiones y lo valor de log 10 presente en el gráfico 4.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	FASE 1	FASE 2	FASE 3
Leche azucarada	1era	1.20×10^{07}	2.70×10^{10}	1.90×10^{10}
	2da	1.50×10^{07}	2.30×10^{10}	2.40×10^{10}
	3era	1.30×10^{07}	3.00×10^{10}	1.60×10^{10}
	Media	1.33×10^{07}	2.67×10^{10}	1.97×10^{10}
	Log10 media	7.1249	10.4259	10.2937
Lactosuero	1era	2.70×10^{09}	1.00×10^{12}	2.10×10^{10}
	2da	3.40×10^{09}	1.90×10^{12}	2.40×10^{10}
	3era	3.90×10^{09}	1.40×10^{12}	2.20×10^{10}
	Media	3.33×10^{09}	1.43×10^{12}	2.23×10^{10}
	Log10 media	9.5228	12.1563	10.3489
Bebida fortificada de soya	1era	3.50×10^{09}	2.20×10^{12}	3.04×10^{12}
	2da	3.40×10^{09}	2.00×10^{12}	2.08×10^{12}
	3era	4.10×10^{09}	1.90×10^{12}	3.00×10^{12}
	Media	3.67×10^{09}	2.03×10^{12}	3.07×10^{12}
	Log10 media	9.5642	12.3082	12.4866
Levadura activada	1era	6.90×10^{02}	3.40×10^{03}	0.00×10^{00}
	2da	5.90×10^{02}	4.80×10^{03}	4.40×10^{03}
	3era	3.10×10^{02}	3.90×10^{03}	4.40×10^{03}
	Media	6.30×10^{02}	4.03×10^{03}	2.93×10^{03}
	Log10 media	2.7993	3.6056	3.4673

En la (tabla 1) se puede visualizar las tendencias de crecimiento de la bacteria *B. subtilis* en los diversos tratamientos, se puede también distinguir que el tratamiento a base de lactosuero y leche azucarada presentan valores finales de concentración de UFC/ml de medio de cultivo líquido muy semejantes, mientras que en el tratamiento a base de levadura activada si bien es cierto sigue la misma tendencia de los otros tratamientos en concentraciones mucho más bajas.

Gráfico No.4 Grafico de curvas de crecimiento de *B. subtilis* en cuatro medios de cultivo líquidos frente a la fase del crecimiento microbiano

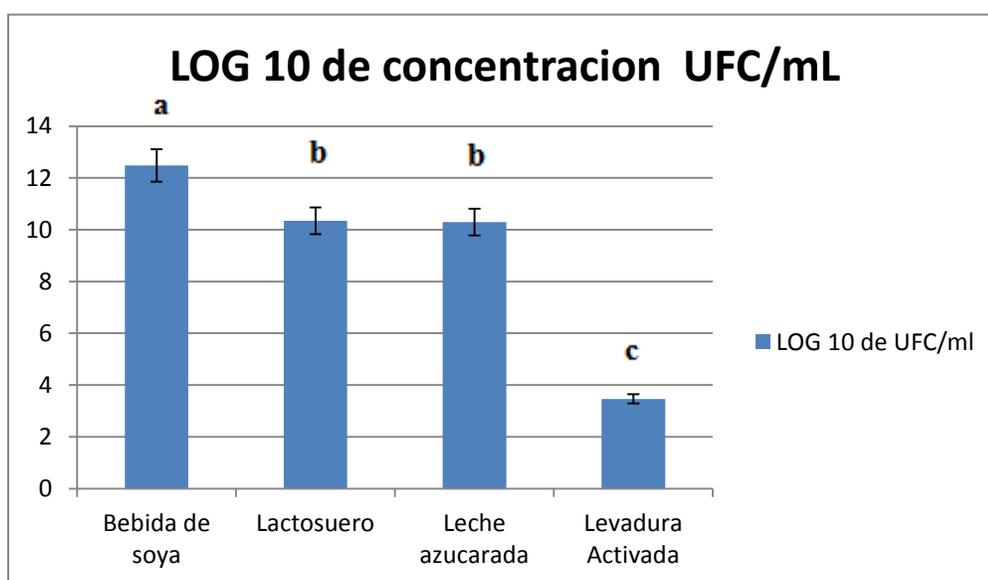


En la (gráfico 4) se puede observar las curvas de crecimiento de la bacteria *B. subtilis* entre las tres fases anteriormente detalladas y el valor del logaritmo en base de 10 de las concentraciones de UFC/ml de medio de cultivo líquido en cada uno de los medios de cultivo líquidos.

Como se muestra en la gráfica anterior los cuatro tratamientos presentaron una tendencia muy similar en el crecimiento. Pasaron por un crecimiento acelerado en los primeros días, para posteriormente tener un crecimiento más controlado y esta etapa alcanzar su máxima concentración de UFC durante el periodo de estudio. Por último en la fase tres se puede evidenciar como el medio líquido de cultivo a base de lactosuero cae estrepitosamente

en la concentración, mientras que los tres medios líquidos de cultivo restantes tienden a estabilizarse.

Gráfico No.5 Gráfico de análisis de LOG10 de medias de la variable en fase tres y test de Tuckey para alfa de 0.05% concentración final UFC/mL de medio de cultivo líquido.



En el (gráfico 5) se puede identificar el valor de Log10 de las medias de concentración final de cada tratamiento y el análisis de separación de medias de Tuckey (anexo 3) en la fase tres. Y se observa una diferencia muy notoria respecto a la media del tratamiento a base de bebida de soya fortificada, los tratamientos a base de lactosuero y de leche azucarada tienen similitudes en concentración final, mientras que el tratamiento a base de levadura activada presenta los valores muy por debajo de los otros tratamientos.

Tabla No.2 Tabla de precios en dólares americanos de cada tratamiento en fase 3 y proyección del costo de los tratamientos a una concentración de 1×10^9 (concentración comercial)

	PRECIO MEDIO	PRECIO CALDO BASE	CONCENTRACION FINAL	PRECIO TRATAMIENTO	PROYECCION DE PRECIO A 1×10^9
Tratamiento	Precio/litro	Precio/litro	UFC/ml	Precio/litro	Precio / litro
Leche azucarada	2.19	0.12	2.67×10^{10}	1.57	\$0.16
Lactosuero	0.07	0.12	2.20×10^{10}	0.08	\$0.1
Soya fortificada	5.05	0	3.07×10^{12}	5.05	\$0.1
Levadura activada	4.2	0.12	2.93×10^{03}	2.56	Inviabile

En la (tabla 4) se puede observar el análisis general de los precios de los medios de cultivo líquido, detallados por precio del medio y el precio del caldo base utilizado en su composición (anexo 3), además se puede identificar que el precio por litro de cada tratamiento en sus concentraciones finales, también la tabla consta de una proyección de precios ajustados a una misma concentración de 1×10^9 , ya que es la concentración del producto comercial que se tomó de referencia, siendo el medio de cultivo líquido a base de bebida de soya fortificada y el tratamiento a base de lactosuero los tratamientos de más bajo costo a esa concentración de UFC/mL de medio líquido de cultivo y teniendo un valor de 0.01 centavos de dólar por litro de producto, tomando en cuenta que ese valor solo representa los costos variables de producción, este análisis no tomo en cuenta costos fijos como luz eléctrica, mano de obra, depreciación de maquinaria, empaque ni canales de distribución, Por lo que solo se presenta el valor del producto comercial como una referencia del precio de venta al público de este producto es de \$9.00 dólares.

7. Discusión

En este estudio se tomó en cuenta cuatro tipos de medios, cada uno de ellos con diferente procedencia por lo que analizaremos cada uno de sus componentes. La bebida de soya fortificada es un producto de origen vegetal que posee varios procesos industriales, proveniente de una planta de soya (*Glycine max*) consta de los siguientes ingredientes: agua, semillas de soja, azúcar principalmente (Yu, 2008). El siguiente medio es lactosuero que es un subproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína durante la elaboración del queso, entre sus contenidos se encuentran principalmente lactosa, proteínas de importante valor nutritivo, minerales, vitaminas y grasa (Scott, 1991). La composición y tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado. La lactosa es el principal componente nutritivo (4.5 % p-v), proteína (8% p/v), y lípidos (5%). El tercer medio es leche azucarada, este es una bebida a base de leche de soya en polvo, agua, azúcar. Y por último el cuarto medio preparado a base de levadura activada y azúcar de caña como fuente de energía.

Por lo que se puede evidenciar anteriormente cada medio proviene de un origen diferente, orígenes animales como el lactosuero y la leche, orígenes vegetales como la bebida de fortificada de soya y microorganismos en el caso de la levadura. Es por esta diferencia principalmente que el análisis estadístico refleja coeficientes de variación muy altos.

Si bien es cierto se muestra una clara tendencia entre cada tratamiento para el conteo bacteriano, la tendencia de cada tratamiento guarda muchas similitudes en cuanto a dirección de producción. La bacteria *B. subtilis* después del inóculo en cada tratamiento pasa por un proceso de crecimiento exponencial (Brock y ottos, 2002). La bacteria crece a una velocidad alta hasta llegar al punto más alto en producción, en esta fase el tratamiento a base de lactosuero y bebida fortificada de soya presentan una corriente de rápido crecimiento, el tratamiento a base de leche azucarada sigue la misma corriente pero en menos concentración mientras que el tratamiento a base de levadura denota una misma corriente de crecimiento pero en concentraciones muy bajas.

Después de la fase exponencial prosigue la fase estacionaria, que se define como la fase donde la bacteria después de haber pasado por su pico más alto de multiplicación, se detiene manteniéndose uniforme en producción hasta llegar a la muerte (Brock y otros, 2002). En esta fase también hay diferencia entre los tratamientos y es que el tratamiento a base de bebida de soya fortificada sigue una tendencia estable, a menor escala que la fase exponencial, es decir en este tratamiento todavía se puede evidenciar multiplicación por parte de *B. subtilis* (Frioni, 2011). En los tratamientos a base de leche azucarada se estabiliza, con un ligero decrecimiento de producción, en el tratamiento a base de lactosuero se demuestra un decrecimiento importante en la concentración final de UFC/ml de medio líquido de cultivo, y por último el tratamiento a base de levadura que comienza a decrecer pero en la misma proporción en la que creció en la fase uno.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, el tratamiento con mayor concentración de UFC de la bacteria *B. subtilis* es el tratamiento formulado a base de bebida de soya fortificada, llegando a una concentración final de 3.07×10^{12} UFC/ml de medio líquido de cultivo, con una apariencia uniforme, sin encontrarse sedimentos, ni olores desagradables en el medio, esto debido a que el medio posee una alta cantidad de proteína y carbohidratos necesarios para la multiplicación bacteriana (Reis 2004).

El segundo mejor tratamiento está el medio a base de lactosuero, llegando a una concentración final de 2.23×10^{10} UFC/ml de medio líquido de cultivo, pasando por un pico de 1.43×10^{12} UFC/ml de medio líquido de cultivo en la fase dos, este medio de cultivo líquido presenta una apariencia muy uniforme, no presenta sedimentos ni olores desagradables, si bien es cierto la concentración final de UFC/ml de medio líquido de cultivo no es llamativa el pico de producción en la fase dos llama la atención, es decir este tratamiento posee alta calidad de componentes para un buen arranque en producción bebido a que el medio presenta nutrientes como lactosa que funciona como fuente de carbono, sales minerales, vitaminas solubles, proteína soluble y algo de grasa (Yanez, 2012), pero necesita la adición de vitaminas y minerales presentes en los medio de cultivo a base de soya, para que pueda presentar crecimiento estable en la fase dos.

El tercer mejor medio líquido de cultivo es el tratamiento a base de leche azucarada, llegando a 1.97×10^{10} UFC/ml de medio de cultivo líquido en concentración final, presentando un pico de producción en fase dos de 2.67×10^{10} UFC/ml de medio de cultivo líquido. Con un color más claro que en la fase uno y una apariencia con presencia de sedimentos.

Por último el medio de cultivo líquido a base de levadura activada, que presentó una concentración final de 2.93×10^3 UFC/ml de medio de cultivo líquido. Consta de una apariencia no uniforme, con sedimentos notorios, tonalidades amarillentas y presencia de olores desagradables, contrario a lo que Hernández (2003) menciona en su estudio, en el cual presenta la levadura como un medio idóneo para la producción masiva de bacterias del genero *Bacillus*.

Si bien es cierto el mejor tratamiento fue el de la bebida de soya fortificada al marcar la mayor concentración final de UFC/mL de medio de cultivo líquido y la mejor tendencia en crecimiento pero no la más óptima la producción comercial ya que sus componentes al ser importados se someten a varios procesos para poder llegar al país lo que puede llevar a un desabastecimiento de materia prima, además depende también de salvaguardias, impuestos y transporte lo que también eleva costos de producción.

Por otro lado el lactosuero, es un subproducto de la industria láctea de fabricación de quesos. Ecuador posee una tradición ganadera y una corriente de cambio de matriz productiva se ha incentivado a pequeños ganaderos a formar asociaciones y poder ofrecer productos como quesos y yogurt (Agso, 2012) lo que nos genera la oferta de este desecho agroindustrial, actualmente no utilizada en ningún proceso productivo por lo que puede ser considerado como un medio de bajo costo, si es que este medio pasa por un proceso de enriquecimiento en vitaminas, minerales y fuentes de carbono.

En una comparación económica (tabla 2) podemos observar que los precios de los medios de cultivo líquidos varían de forma considerable, dependiendo de sus componentes, es así que el tratamiento a base de leche azucarada con un valor cercano a 1.56 dólares,

mientras que el medio de cultivo líquido a base de lactosuero es de 0.08 centavos por litro, el medio de cultivo líquido a base de bebida de soya fortificada llega a valor de 5.05 dólares por litro, y por último el medio de cultivo a base de levadura cuesta 2.56 por litro, pero si analizamos todos los tratamientos bajo una misma concentración como producto final, sin duda el medio más económicamente óptimo para escalar la producción de *B. subtilis* (tabla 2) es el medio de cultivo a base de bebida fortificada de soya, más aun si lo comparamos con el producto comercial que tiene un valor de \$9 dólares/ L, lo que nos indica que la utilización de este medio de cultivo podría abaratar costos de producción y elaborar productos competitivos al mercado de biopéptidos.

8. Conclusiones

- Según el ANOVA correspondiente a la primera fase del estudio los tratamientos presentan diferencias significativas entre sí, sin embargo mediante la prueba de significancia Tuckey, el tratamiento a base de bebida de soya fortificada y tratamiento a base de lactosuero son los mejores en producción.
- Según el ANOVA correspondiente a la segunda fase del estudio se repite la misma tendencia de la primera fase de este experimento, es decir existe diferencia significativa entre los tratamientos. Y los medios líquidos de cultivo a base de bebida fortificada de soya y lactosuero siguen siendo los más altos en concentración de UFC/mL de medio de cultivo líquido,
- Según el ANOVA en la tercera fase se mantienen las diferencias marcadas entre tratamientos, sin embargo mediante el test de Tuckey, el tratamiento a base de bebida fortificada muestra alta diferencia a los tres medios de cultivo restantes.

- El mejor tratamiento para la multiplicación comercial de la bacteria *B. subtilis* es la bebida fortificada de soya, por la alta concentración de UFC/mL finales, por la tendencia de producción constante y bajo costo.
- Se corrobora que el medio de cultivo líquido a base de lactosuero funciona para la multiplicación de la bacteria *B. subtilis*.
- El lactosuero como subproducto agro industrial de la elaboración de quesos posee un precio que es de 0.08 centavos por litro por lo que podría representar el tratamiento óptimo para la producción comercial de la bacteria *B. subtilis*, si es que sufre un proceso de repotenciación, adicionándole fuentes de carbono, vitaminas y minerales.

9. Recomendaciones

- Según Compants (2005), la acción biocontroladora de *B. subtilis* se debe principalmente a la producción de metabolitos antibiótico por lo que un medio de cultivo que contenga mayor concentración de estos metabolitos antibióticos, podría tener mayor eficacia controlando hongos fitopatógenos. En futuros estudios se debe complementar la valoración de UFC con la valoración de metabolitos antibióticos como una concentración final, y poder saber en qué etapa del crecimiento bacteriano se acumulan estos metabolitos.
- Se puede inferir que la acumulación de estos metabolitos antibióticos en el medio de cultivo líquido previene la descomposición del sustrato actuando como conservante natural.

- Varios autores han descrito que los cationes de Mn, Fe, Mg, y Zn pueden incrementar la producción de células y metabolitos en diferentes cepas de *B. subtilis*, se podría aumentar las concentraciones de Mg y Fe, y adicionar elementos como Mn y Zn ausentes en la composición del caldo base.
- Como el lacto suero es un desecho de la industria láctea, su composición posee mínimas variaciones, es muy recomendable elaborar un protocolo de estandarización de suero para recepción y así contar con materia prima estable en composición.
- Analizar las diferentes concentraciones de lactosuero en el medio líquido de cultivo, posibles variaciones en el medio podrían aumentar la multiplicación de la bacteria *B. subtilis*.

10. Bibliografía

- Agrios, G .N, (2005). Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p
- Almécija, M.C. (2007). Obtención de la lacto-ferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España.
- Altieri, M., P.M. Rosset. (2004). Prólogo al libro "Manejo Ecológico de Plagas". CEDAR-Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba.
- Altieri, M. A. (1995). Bases y estrategias para una agricultura sustentable. Revista CLADES, Chile.
- Asaka, O. Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl Environ Microbiol 62: 4081–4085.
- Bashan, J., (1996) Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. Terra, v.14, n.2, p.159-192.
- Brock, T. & M. Madigan. (1993). MICROBIOLOGÍA. 6ta Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S.A .México
- Castellanos, JJ; Oliva, P; Izquierdo, E; Morales, N. (1995). Evaluacion de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell). Cif en cebolla. In Bioplág 95. (1995, Ciudad Habana, Cuba).INIFAT. pp 21.
- Conpants, S. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. App. Enviroment Microbiology, v.71, n.9, p.4951–4959.

Cooper, D.G., Mac Donald, C.R., Duf, S.J.B., Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis*. By continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiology* 42, 408-412.

Costa, E., Teixido, N., Usall, J., Fons, E., Gimeno, V., Delgado, J., Vinas, I., (2001). Production of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by products. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 367-371.

Crueger, W., Crueger, A. (1993) sustratos para la fermentación industrial en: *Biotecnología: Manual de microbiología industrial*. Acribia, Madrid, pp 413.

Cruz-Ramos, H., Hoffmann T., Marino M., Nedjari H., Presecan-Siedel E., Dreesen O., Glaser P., Janh D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 182:3072-3080.

Chaves, Méndez, Nancy P. (2007). Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) thorn. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Escuela de Posgrado Universidad de Turrialba, Costa Rica, pp98.

Devine, K. M. (2000). *Bacillus subtilis*, Genetics: *Enciclopedia of Microbiology*. Ed. Lederberg J. Segunda Edición. Academic Press. I: 373-382.

Donoso, E., Lolas, M. y Muñoz, C. (2006). Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional. Universidad de Talca. pp32.

Duffus, J. (1997). Material Introductorio, salud humana y toxicología. IPCS/OMS (eds.) Módulo de capacitación del IPCS N° 1 Seguridad química: Principios básicos de toxicología aplicada. La naturaleza de los peligros químicos. Segunda edición: 15 - 91.

Espinosa de los Monteros, J., Martínez, A., Valle, F. (2001). Metabolic profiles and aprE expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. Appl. Microbiol. Biotechnol.57:379-384.

Ewe, J.A., Wan-Addullah, W.N., Liong, M.T. (2010) Viability and growth characteristics of Lactobacillus in soymilk supplemented with b-vitamins, IntfoodSciTechnol 61, 87-107.

Fernández, O. (2001) “Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario” Avances en el fomento de Productos Fitosanitarios.

Froni, L. (2011). Microbiología: básica ambiental y agrícola, Orientación Gráfica, Buenos Aires. pp 90-95.

Hernández, A. (2003). Microbiología industrial Aplicada, Editorial EUNED, Costa Rica pp 296.

Hoffmann T., Troup B., Szabo A., Hungerer C., Jahn D. (1995). The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: Cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. FEMS Microbiol.Lett. 131:219-225.

INEN. (2013), Norma Técnica Ecuatoriana No 1205:2013, Agua, determinación del número total de bacterias en placas, primera edición.

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw ,E., Thonart, P. (1999) Optimization of bio surfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 By Plackett-Burman design. Applbiochem biotech 77, 223-233.

Krispin, O., Allmansberger R. (1998). The *Bacillus subtilis* AraE protein displays broad substrate specificity for several different sugars. J. Bacteriol. 180:3250-3252.

Marino, M. H., Cruz-Ramos, T., Hoffman, P., Glaser, D. (2001). Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by arfM (ywiD). *J. Bacteriol.* 183:6815-6821.

Nagórska, K. Bikowski, M. Obuchowski, M. (2007). Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochemical Polonica* [Revisado el 7 de Mayo de 2010]; 54 No. 3: 495–508. Disponible en: http://www.actabp.pl/pdf/3_2007/495s.pdf.

Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P., Clark, D. P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: Identification of fermentative end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* 179:6749-6755.

Nakano, M.M., Zuber P. (1998). Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Ann. Rev. Microbiol.* 52:165-190.

Narváez, M.C. (2015). Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Bacillus* nativas de suelos de la provincia de Pichincha para el biocontrol del acaro *Tetranychus urticae*, Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito, 23-27 pp.

Özcan, O. (2008). Medium Development for production of *Bacillus thuringiensis* based bio pesticides. Graduated school of natural and applied sciences. Ankara, Turquía, Middle East Technical University Master of science in biotechnology: 91.

Priest, F. G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. En *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Eds. Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. American Society for Microbiology, Washington, DC. I:3-16.

Raghavendra, J. Brian, B. (2005) Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*. 96 (2). Disponible en: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0145>

Reis, F.A.S.L., Servulo, E.F.C., De Franca, F.P. (2004) lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low cost raw materials ApplMicrobiolBiotechnol 113, 899-912.

Rivera, C. G, (2007). Conceptos introductorios a la fitopatología. San José de Costa Rica. EUNED. pp346.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.V., Dunfour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonist of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. Mol plant Microbe interact 20 430-440.

Scott, R. (1991) Fabricación de queso, Acribia, Zaragoza. ISBN 9788420009827

Shariati, P., Mitchell W. J., Boyd A., Priest F. G. (1995). Anaerobic metabolism in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Microbiol. 141:1117-1124.

Slepecky, R. A. (1992). What is Bacillus. En Biology of Bacilli. Applications to Industry. Doi R.H, McGloughlin M. (eds.) Butterworth-Heineman. EUA.I:1-21.

Snay, J., Jeong, J. W., Atai, M. M. (1989). Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. Biotechnol. Progress. 5: 63-69.

Stambury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (1995) Media for industrial fermentations. En: Whitaker, A., Hall, S.J. (Eds) Principles of fermentation technology. Pergamonpress. Oxford, pp 93-121.

Stephenson, K., Bron, S., Harwood, C. R. (1999). Cellular lysis in *Bacillus subtilis*; the affect of multiple extracellular protease deficiencies. Lett. Appl. Microbiol. 29:141-145.

Tabbene, O., Slimene, IB., Dejebali, K., Mangoli, M.L., Urdaci, M.C., Liman F., (2009) Optimazation of médium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* b38 Biotechnolprog. 25, 1266-1274

Torres, LA; Wong, W; Miguel, A; Fernández, A; Amat, Z. (2001). Actividad antagonica de especies de *Bacillus* spp. contra *Rizhoctoniasolani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanidad Aceptado para publicación.

Tortora, G.J., Funke, B. R., Case, C.L., (2007) Microbiology: an introduction 9na edición pp 931.

Ueda, S. (1989). Industrial applications of *B. subtilis*: utilization of soybean as natto, a traditional Japanese food. In *Bacillus subtilis*: molecular biology and industrial applications. Edited by B. Maruo and H. Yoshikawa. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands. pp. 143–161.

Urbina, C. M. (2011). Enfermedades causadas por hongos, fitopatología general, Universidad agropecuaria del trópico seco, Estelli, p2.

Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G., (1986) fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J Antibiotic 39, 888-901.

Vega, L., Fernández, O. (2001) Microorganismos Antagonistas Para El Control Fitosanitario, Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica), [En línea] 2001[Revisado 6 de Noviembre de 2016]; No.62,pp 96 – 100.

Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higon, G. (2001) Industrial microbiology: an introduction Blackwell Science. Oxford, pp 193.

Wang, L-F. (1992). Appendix 2: Standard *Bacillus* Media. En Biology of Bacilli.Applications to Industry.Doí R.H, McGloughlin M. (eds.) Butterworth-Heineman. EUA. pp: 351.

Yanez, V.R., (2012) Potencial de la cepa cpa-8 de *Bacillus substillis* como agente de bio control de enfermedades de post cosecha de fruta, Universidad de Lleida, Tesis doctoral pp 44-87.

Yu, B., Lu, Z.X., Bie, X.M., Lu, F.X., Huang, X.Q. (2008) optimization of the medium composition for production of protease and soy bean peptides by *Bacillus subtilis* SHZ Using response surface methodology. Int food SciTechnol 43, 1365-2621

Zhang, J., Greasham, R. (1999). Chemically defined media for comercial fermentations Appl MicrobiolBiotechnol 51, 407-421

Zukowski, M. M. (1992). Production of commercially valuable products.En Biology of Bacilli.Applications to Industry.Doii R.H, McGloughlin M. (eds.) ButterworthHeineman. EUA. 11:311-338.

11. Anexos

Anexo No.1 Formulas de medios utilizados

- Medio T3 LIQUIDO (1.0L)

Ingredientes	Cantidad
Tryptona	3 g
Triptosa	2g
Extracto de levadura	1.5 g
Fosfato de sodio	6.9 g
Cloruro de magnesio	0.005 g
Agua destilada	1,0 L

- Medio T3 Agar (1.0 L)

Ingredientes	Cantidad
Tryptona	3 g
Triptosa	2g
Extracto de levadura	1.5 g
Fosfato de sodio	6.9 g
Cloruro de magnesio	0.005 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.0L

- Caldo base (1,0 L)

Ingredientes	Cantidad
Fosfato di potásico	1g
Cloruro de potasio	0.5g
Sulfato de magnesio	0.5g
Sulfato de hierro	0.01g
Agua destilada	1.0L

- Medio de cultivo líquido a base de leche azucarada

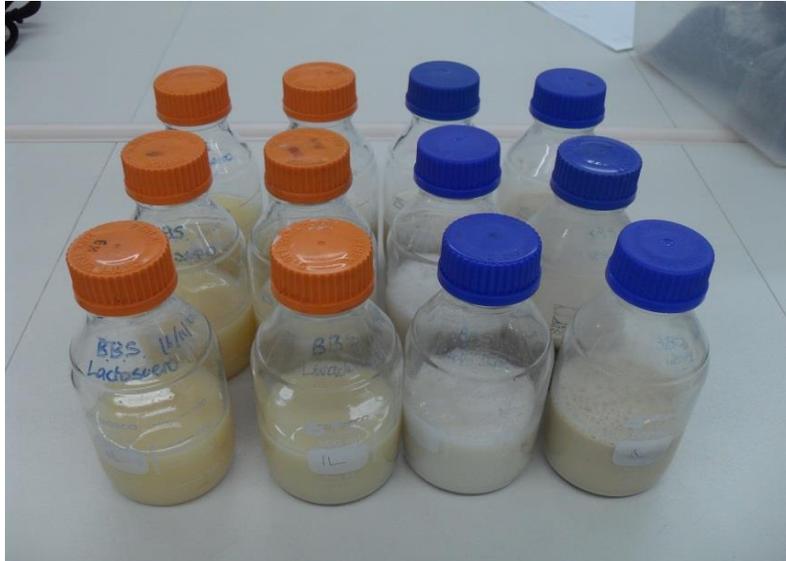
Los componentes para la elaboración del medio de cultivo líquido a base de leche azucarada son: agua purificada, leche de soya en polvo azucarada, azúcar, caseinato de sodio, leche en polvo, aceite vegetal, sucroesteres, vitaminas B1, B6 y B12

- Medio de cultivo líquido bebida fortificada de soya

Los componentes para la elaboración del medio de cultivo líquido a base de bebida de soya fortificada son: agua, semillas de soya, azúcar, sal, acesulfato K y sucralosa, vitaminas A y D.

Anexo No.2

- Foto de los medios de cultivos líquidos



- Foto de medios sólidos con presencia de *B.subtilis* y hongos fitopatogenos.



Anexo No.3

- Tabla No1 Análisis de varianza en la fase uno

FASE UNO

TRATAMIENTO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3	SUMAT	MEDIA
Bebida de soya	3.05×10^{09}	3.40×10^{09}	4.10×10^{09}	1.10×10^{10}	3.67×10^{09}
Lactosuero	2.70×10^{09}	3.40×10^{09}	3.90×10^{09}	1.00×10^{10}	3.33×10^{09}
Leche azucarada	1.20×10^{07}	1.50×10^{07}	1.30×10^{07}	4.00×10^{07}	1.33×10^{07}
Levadura	6.90×10^{02}	5.90×10^{02}	6.10×10^{02}	1.89×10^{03}	6.30×10^{02}
				2.10×10^{10}	1.20×10^{09}

FV	GL	SC	CM	FCAL	F TAB	CV
TRATAMI	3	3.68×10^{19}	1.23×10^{19}	96.78129	3.31	30.44801
ERROR	8	1.01×10^{18}	1.27×10^{17}			
TOTAL	11	3.78×10^{19}				

- Tabla No2 Análisis de prueba de significancia de Tuckey al 5% en fase uno

SY	2.05×10^{08}
Q	4.53
T	9.31×10^{08}

	Bebida de soya	Lactouero	Leche azucarada	Tratamiento 1	A
Levadura activa	3.37×10^{09}	3.33×10^{09}	1.33×10^{07}	Tratamiento 2	A
Leche azucarada	3.65×10^{09}	3.32×10^{09}		Tratamiento 3	B
Lactosuero	3.33×10^{08}			Tratamiento 4	C

- Tabla No3 Análisis de varianza en la fase dos

FASE DOS

TRATAMIENTO	1	2	3	SUMAT	MEDIA
Bebida de soya	2.20×10^{12}	2.00×10^{12}	1.90×10^{12}	6.10×10^{12}	2.03×10^{12}
Lactosuero	1.00×10^{12}	1.90×10^{12}	1.40×10^{12}	4.3×10^{12}	1.43×10^{12}
Leche azucarada	2.70×10^{10}	2.30×10^{10}	3.00×10^{10}	8.00×10^{10}	2.67×10^{10}
Levadura	3.40×10^{03}	4.80×10^{03}	3.90×10^{03}	1.21×10^{03}	4.03×10^{03}
				1.05×10^{13}	3.49×10^{12}

FV	GL	SC	CM	FCAL	F TAB	CV
TRATAMI	3	9.42×10^{24}	3.14×10^{24}	55.38679	3.31	40.88715
ERROR	8	4.53×10^{23}	5.67×10^{22}			
TOTAL	11	9.87×10^{24}				

- Tabla No4 Análisis de prueba de significancia de Tuckey al 5% en fase dos

SY	1.37×10^{11}
Q	4.53
T	6.23×10^{11}

	Bebida de soya	Lactouero	Leche azucarada	Tratamiento 1	A
Levadura activada	2.03×10^{12}	1.43×10^{12}	2.67×10^{10}	Tratamiento 2	A
Leche azucarada	2.0033×10^{12}	1.4033×10^{12}		Tratamiento 3	B
Lactosuero	6.00×10^{11}			Tratamiento 4	C

- Tabla No5 Análisis de varianza en la fase tres

FASE TRES

TRATAMIENTO	1	2	3	SUMAT	MEDIA
Bebida de soya	3.40×10^{12}	2.80×10^{12}	3.00×10^{12}	9.20×10^{12}	3.07×10^{12}
Lactosuero	2.40×10^{09}	2.20×10^{09}	2.23×10^{09}	6.83×10^{12}	2.28×10^{09}
Leche azucarada	1.90×10^{10}	2.40×10^{10}	1.60×10^{10}	5.90×10^{10}	1.97×10^{10}
Levadura	0.00×10^{00}	4.40×10^{03}	2.93×10^{03}	7.33×10^{03}	2.44×10^{03}
				9.27×10^{12}	3.09×10^{12}

FV	GL	SC	CM	FCAL	F TAB	CV
TRATAMI	3	2.11×10^{25}	7.02×10^{24}	300.8027	3.31	29.67663
ERROR	8	1.87×10^{23}	2.33×10^{22}			
TOTAL	11	2.12×10^{25}				

- Tabla No6 Análisis de prueba de significancia de Tuckey al 5% en fase tres

SY	8.82×10^{10}
Q	4.53
T	4.00×10^{11}

	Bebida de soya	Lactouero	Leche azucarada	Tratamiento 1	A
Levadura activada	3.07×10^{12}	1.23×10^{10}	1.97×10^{10}	Tratamiento 2	B
Leche azucarada	3.0503×10^{12}	2.60×10^{09}		Tratamiento 3	B
Lactosuero	3.0477×10^{12}			Tratamiento 4	C

- Tabla No7 Tabla de precios de caldo base

Tabla de precios de caldo base					
Formula	Nombre del compuesto	Precio	Cantidad	Requerimiento	Precio /LITRO
K ₂ HPO ₄	DI-POTASIO HIDROGENO FOSFATO	65.89	1000g	1g	0.07
KCL	POTASIO CLORURO ACS	54.22	1000g	0.5g	0.03
MgSO ₄	MAGNESIO SULFATO HEPTAHIDRATADO	29.39	500g	0.5g	0.03
FeSO ₄	HIERRO II SULFATO HEPTAHIDRATADO	43.16	500 g	0.01g	0.00
				TOTAL:	0.12