

13 RESULTADOS

13.1 EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis* 832 SILVESTRE EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXÍGENO Y AL VACÍO, CALCULANDO LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (K) Y EL TIEMPO MEDIO DE GENERACIÓN (G).

La cepa de *B. subtilis* silvestre se sembró en matraces nefelométricos con medios líquidos 2xYT agitándolos a 37°C. El experimento se realizó por triplicado y se midió la densidad óptica. Se registró el crecimiento en las cinco condiciones a evaluar; aerobiosis, microaerofilia, vacío, anaerobiosis y anaerobiosis+ vacío.

A continuación se muestran las graficas de la cepa silvestre en las diferentes concentraciones: (los datos usados para las gráficas de esta cepa en las diferentes condiciones se presenta en la tabla 3). Se calculó g y k para cada condición para obtener la velocidad de duplicación y tiempo medio de división. En la siguiente sección se muestran los valores obtenidos en *B.subtilis* silvestre Tabla 4.

Tabla 3 Muestra los valores en las diferentes condiciones en las que se evaluó la cepa silvestre.

Cepa silvestre				
Aerobiosis	Microaerofilia	Al vacío	Anaerobiosis	Anaerobiosis + vacío
0.003	0.004	0.007	0.004	0.004
0.003	0.033	0.017	0.005	0.016
0.003	0.188	0.184	0.039	0.251
0.023	0.515	0.242	0.36	0.34
0.09	0.69	0.254	0.75	0.37
0.32		0.255	0.73	0.36
0.55		0.28		0.39
0.736				
0.855				

Tabla 4 Valores de tiempo medio generacional (g) y velocidad de crecimiento (k) en las diferentes condiciones en las que se evaluó la cepa silvestre.

Cepa de <i>B.subtilis</i> Silvestre		
Condiciones	Valor de g (hr)	Valor de k (# de generaciones/hr)
Aerobiosis	1.104	0.906
Microaerofilia	1.345	0.743
Anaerobiosis	1.532	0.652
Vacío	5.26	0.19
Anaerobiosis + Vacío	3.71	0.269

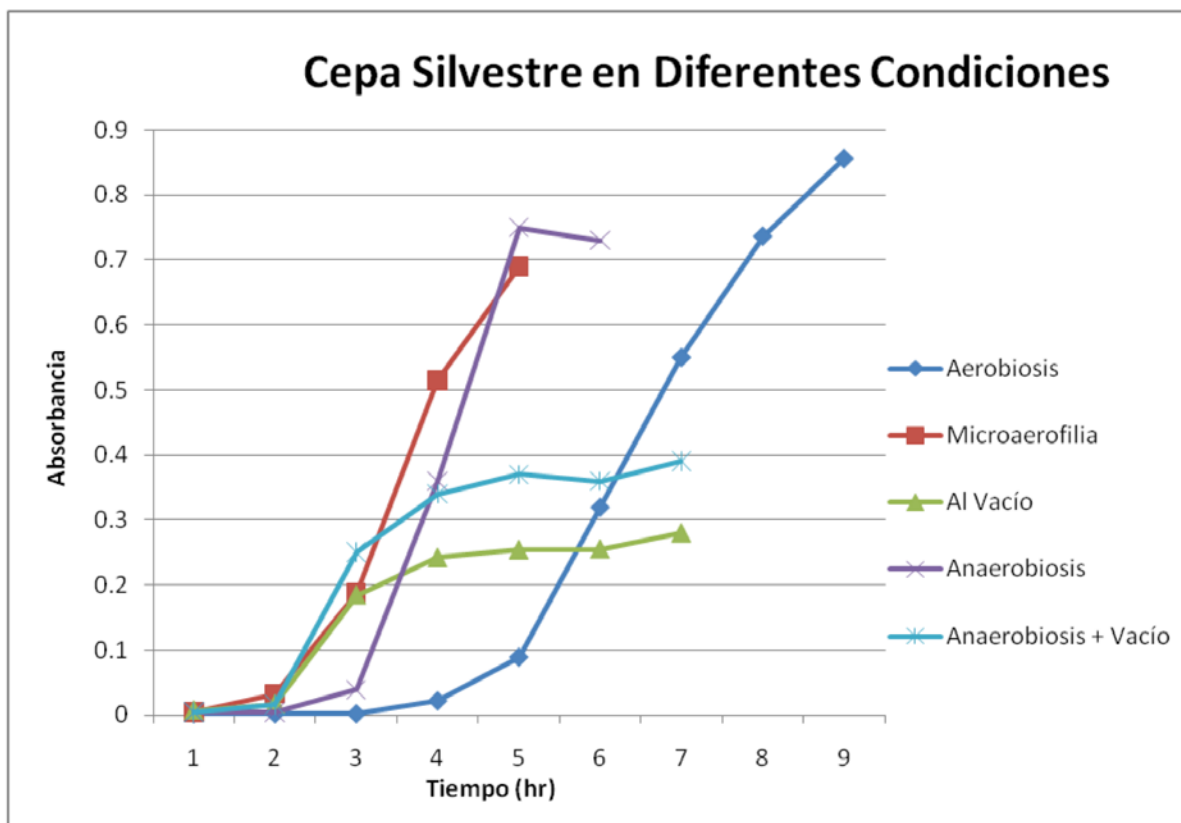


Figura 15 Comparación de la cepa silvestre en las diferentes condiciones a 37°C en agitación constante de 150 rpm.

13.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis* 832 PUB110::*vgb* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXÍGENO Y AL VACÍO, CALCULANDO LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (K) Y EL TIEMPO MEDIO DE GENERACIÓN (G).

El plásmido pUB110::*sspE*::*vgb* en *Bacillus subtilis* 832. Se recupera la cepa y se realiza el experimento por triplicado. Se mide la densidad generada por las cepas con el plásmido multicopia del gen *vgb* utilizando un espectrofotómetro en todas las condiciones establecidas (aerobiosis, microaerofilia, vacío, anaerobiosis y anaerobiosis+ vacío). Para ver los valores y la gráfica de la cepa de *B.subtilis* con el plásmido pUB110::*sspE*::*vgb* 832 en todas las condiciones ver la tabla 5 y la figura 16.

Tabla 5 Comparación de los valores del tiempo medio de generación (g) y velocidad de crecimiento (k) en las diferentes condiciones de la cepa con el plásmido pUB110::*vgb*.

Cepa de <i>B.subtilis</i> pUB:: <i>vgb</i>		
Condiciones	Valor de g (hr)	Valor de k (# de generaciones/hr)
Aerobiosis	1.85	0.538
Microaerofilia	1.5	0.66
Anaerobiosis	1.21	0.826
Vacío	2.596	0.385
Anaerobiosis + Vacío	2.622	0.381

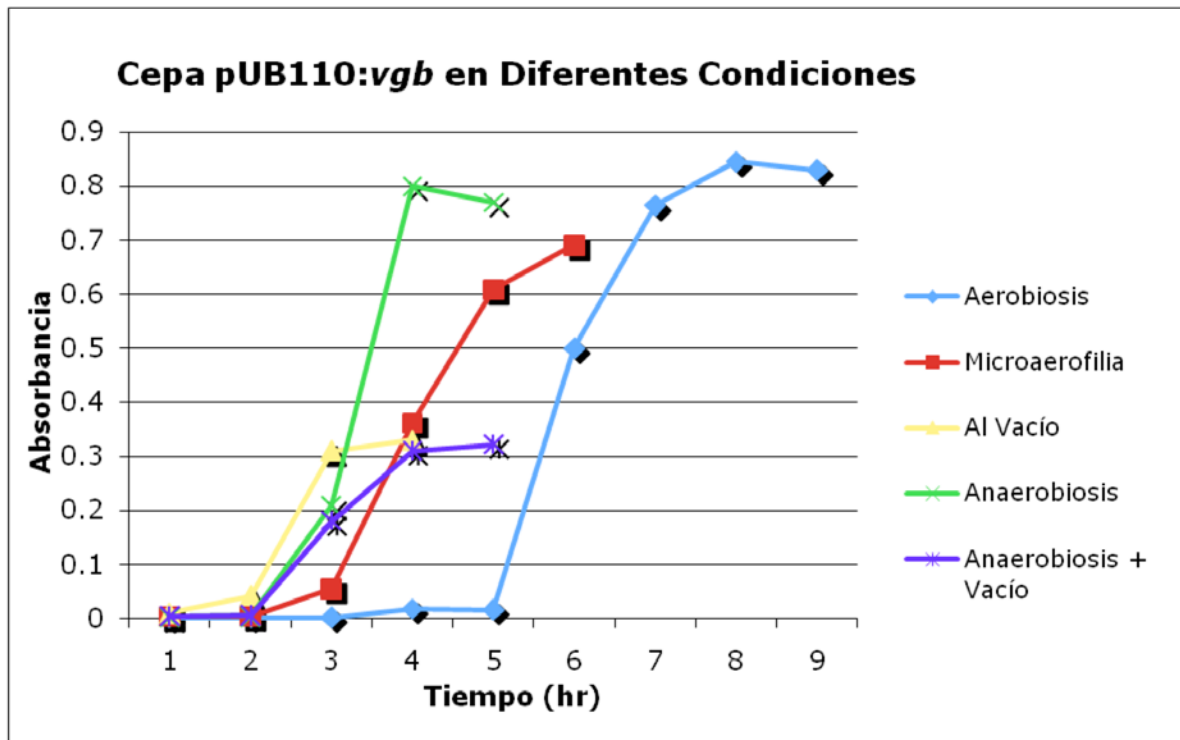


Figura 16 Comparación de la cepa pUB110:vgb en las diferentes condiciones evaluadas a 37°C en agitación constante de 150 rpm.

13.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis* 832 pTrp::vgb EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE OXÍGENO Y AL VACÍO, CALCULANDO LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (K) Y EL TIEMPO MEDIO DE GENERACIÓN (G).

Una vez recuperada *B.subtilis* con el plásmido pTrp::vgb de la tesis de Genaro, 2006 se realiza el experimento por triplicado. Se mide la densidad de la cepa con el plásmido pTrp::vgb por medio de un espectrofotómetro bajo todas las condiciones en cuestión; aerobiosis, microaerofilia, vacío, anaerobiosis y anaerobiosis+ vacío. Se cuantifica el crecimiento y se analizan los resultados. Véase Tabla 6 y Figura 17. Se calculó tanto la velocidad de división (k) como el tiempo medio generacional (g), para ver los valores obtenidos de la cepa de *B.subtilis* con el plásmido pTrp::vgb ver la Tabla 7.

Tabla 6 Comparación de la cepa con el plásmido pTrp::vgb en las diferentes condiciones.

Cepa de <i>B.subtilis</i> pTrp::vgb				
Aerobiosis	Microaerofilia	Vacío	Anaerobiosis	Anaerobiosis + Vacío
0.003	0.0035	0.005	0.002	0.0015
0.004	0.0035	0.005	0.006	0.0035
0.004	0.095	0.011	0.075	0.0035
0.028	0.352	0.049	0.141	0.1
0.028	0.54	0.075	0.226	0.118
0.146	0.651		0.398	
0.51			0.56	
0.76				
0.82				

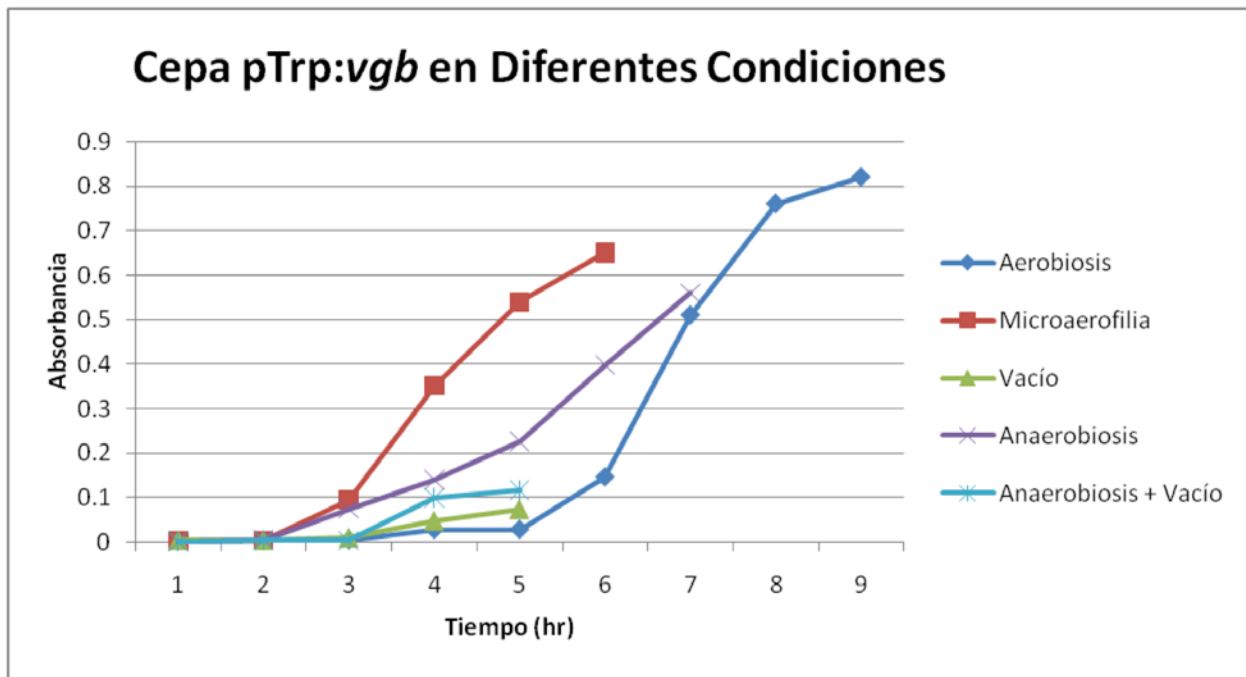


Figura 17 Comparación de cepa pTrp::vgb en las condiciones evaluadas a 37°C a una velocidad constante de 150rpm.

Tabla 7 Valores de tiempo medio de generación (g) y velocidad de crecimiento (k) en las diferentes condiciones de la cepa con el plásmido pTrp:*vgb*.

Cepa de <i>B.subtilis</i> pTrp:: <i>vgb</i>		
Condiciones	Valor de g (hr)	Valor de k (# de generaciones/hr)
Aerobiosis	1.112	0.898
Microaerofilia	1.505	0.664
Anaerobiosis	3.213	0.311
Vacío	5.118	0.915
Anaerobiosis + Vacío	6.72	0.4188

13.4 Comparación de las cepas en las diferentes concentraciones de oxígeno y vacío.

Se obtuvo crecimiento de *B.subtilis* bajo las diferentes condiciones. Después de obtener los promedios de los experimentos por triplicado de cada cepa en las diferentes situaciones, se procedió a compararlas, se obtuvo y comparó las velocidades de crecimiento y el tiempo medio generacional de cada cepa en la condición de aerobiosis. En dicha condición se observa un crecimiento similar en las tres cepas (véase figura 18), registrándose la mayor densidad de todas las condiciones a las que se expusieron las cepas. La abundancia de oxígeno funciona como control en el experimento por lo que hay un crecimiento eficiente y en poco tiempo como se esperaba. Existe un crecimiento exponencial más marcado en las cepas con plásmidos a diferencia de la silvestre. Para examinar los valores obtenidos por el espectrofotómetro revisar Apéndice 18.3.

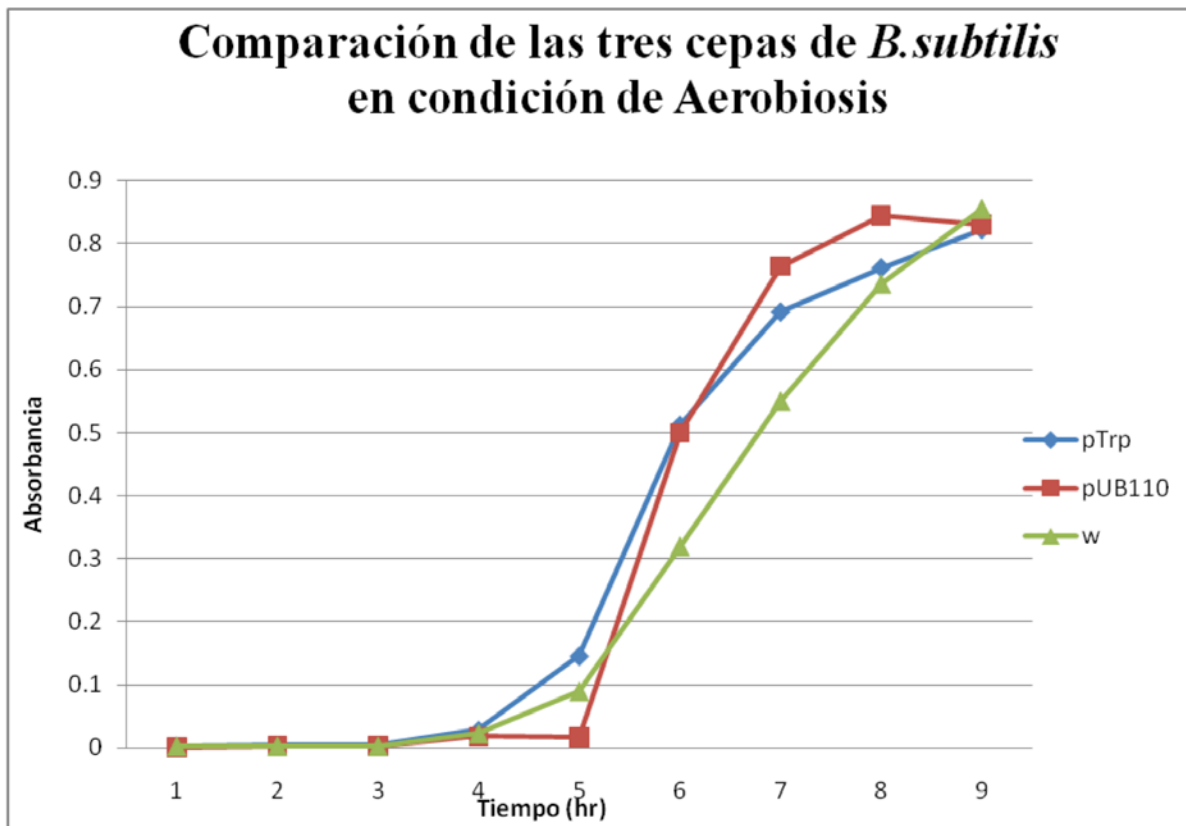


Figura 18 Se comparó el crecimiento de las tres cepas de *B.subtilis* a 37°C en condición de aerobiosis y con agitación constante de 150 rpm.

Tabla 8 Comparación de las velocidades de división y tiempo medio generacional de las tres cepas de *B.subtilis* en la condición de aerobiosis.

aerobiosis	Valor de g (hr)	Valor de k (#de generaciones/hr)
Cepa Silvestre	1.104	0.906
Cepa pTrp:: <i>vgb</i>	1.112	0.898
Cepa pUB 110:: <i>vgb</i>	1.85	0.538

Tabla 9 Análisis estadísticos a comparando la cepa silvestre con las cepas que poseen plásmidos en la condición de aerobiosis. Para observar las formulas ir a Apéndice 18.4.

Aerobiosis						
pTrp	pUB	w	media w	Desv est w	error pUB	error pTrp
0.003	0.001	0.003	0.003	0.03	0.0001	4.21862E-07
0.004	0.002	0.003	0.003	0.03	2.474E-05	3.93496E-05
0.004	0.002	0.003	0.003	0.03	2.474E-05	3.93496E-05
0.028	0.018	0.023	0.02	0.03	0.0005	0.001
0.028	0.0164	0.09	0.009	0.03	0.002	0.01
0.146	0.5	0.32	0.03	0.03	6.92	0.41
0.51	0.764	0.55	0.5	0.1	0.45	0.015
0.76	0.845	0.736	0.7	0.03	0.37	0.018
0.82	0.83	0.855	0.8	0.03	0.019	0.038

Las cepas de *B. subtilis* se inoculan en agitación a 37°C en los matraces nefelométricos y se obtienen densidades en el espectrofotómetro que se muestran en la tabla mostrada en Apéndices 18.3. Se observa una velocidad similar de crecimiento en las tres cepas ya que las fases *log* son parecidas como se muestra en la Figura 19 y en la Tabla 9 que se registra una menor densidad que en la condición de aerobiosis. Para verificar los valores obtenidos de la comparación en condiciones microaerofílicas revisar la tabla 18.3 en apéndices.

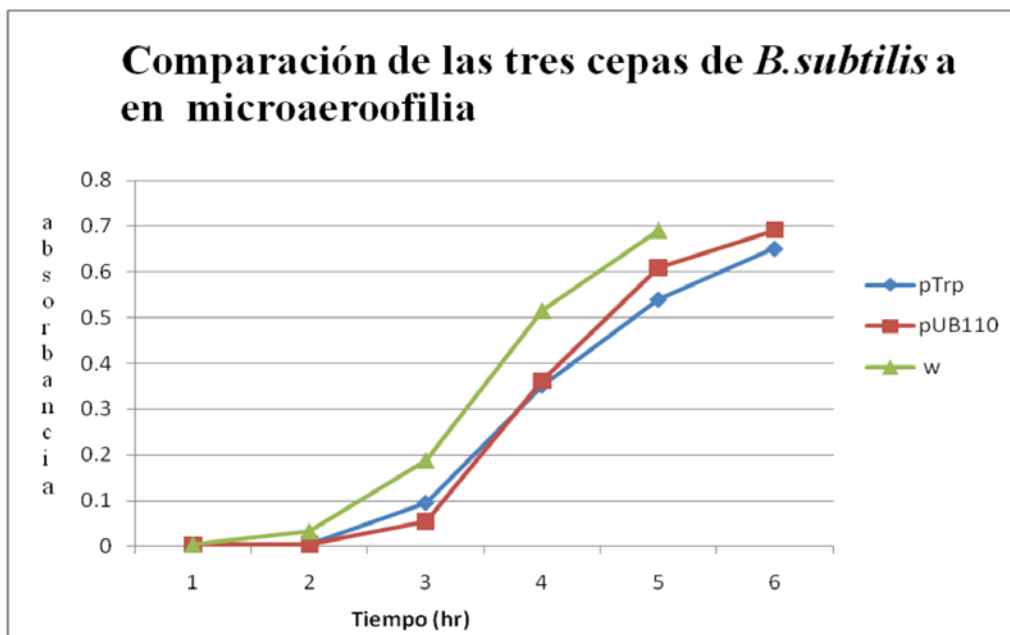


Figura 19 Comparación de los crecimientos microbianos de las tres cepas de *B.subtilis* a 37°C en condición de microaerofilia. Las mediciones se realizaron cada dos horas.

Tabla 10 Valores del tiempo medio generacional y de velocidad de división en las tres cepas en la condición de microaerofilia.

Microaerofilia	Valor de g (hr)	Valor de k (#de generaciones/hr)
Cepa Silvestre	1.345	0.743
Cepa pTrp:: <i>vgb</i>	1.505	0.664
Cepa pUB 110:: <i>vgb</i>	1.5	0.66

Tabla 11 Análisis estadístico comparando la cepa silvestre con las cepas que poseen plásmidos en la condición de microaerofilia. Para observar las formulas ir a Apéndice 18.4.

Microaerofilia						
pTrp	pUB	w	w media	Desv est w	error pTrp	error pUB
0.003	0.003	0.004	0.004	0.03	5.443E-06	5.443E-06
0.003	0.004	0.033	0.03	0.03	0.02	0.02
0.095	0.055	0.188	0.18	0.04	0.19	0.39
0.352	0.362	0.515	0.51	0.03	0.84	0.74
0.54	0.609	0.69	0.69	0.06	0.35	0.10

Las cepas se inoculan a 37°C y se muestra el crecimiento obtenido en la siguiente Figura 20. Se observa un crecimiento exponencial más productivo y notorio en la cepa con el plásmido pUB110::*vgb*, ya que crece mejor en menor tiempo. La cepa silvestre se muestra más productiva que la que posee el plásmido pTrp::*vgb*. Las mediciones se realizan cada cuatro horas durante 20 horas. Se compararon las velocidades de división y tiempo medio generacional de las tres cepas en la condición de Vacío como se muestra en la Tabla 10.

Para ver la tabla con los valores obtenidos con el espectrofotómetro ir a apéndice 18.3

Tabla 12 Valores del tiempo medio generacional y de velocidad de división en las tres cepas de *B.subtilis* en la condición de vacío.

Al Vacío	Valor de g (hr)	Valor de k (#de generaciones/hr)
Cepa Silvestre	5.26	0.19
Cepa pTrp:: <i>vgb</i>	5.118	0.915
Cepa pUB 110:: <i>vgb</i>	2.596	0.385

Tabla 13 Análisis estadístico comparando la cepa silvestre con las cepas que poseen plásmidos en la condición de vacío. Para observar las formulas ir a Apéndice 18.4.

Vacío						
pTrp	pUB110	w	w media	Desv est w	error pTrp	error pub
0.005	0.01	0.005	0.007	0.004	0.0009	0.002
0.005	0.042	0.012	0.016	0.004	0.0293	0.14
0.011	0.31	0.13	0.181	0.032	0.904	0.51
0.049	0.33	0.18	0.242	0.004	9	1.83
0.075		0.19	0.253	0.015	2.11	4.26

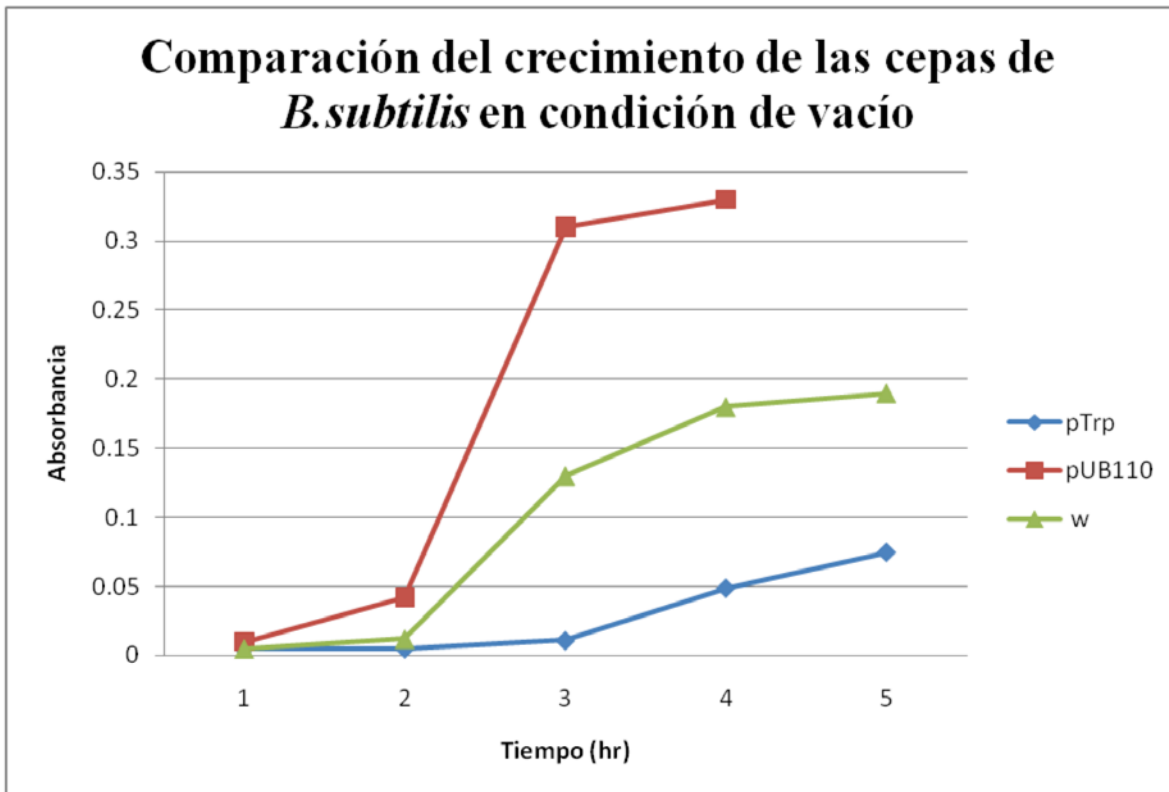


Figura 20 Comparación de los crecimientos de las tres cepas de *B. subtilis* a 37°C en condición de vacío. Las mediciones se realizaron cada cuatro horas.

Se mide la densidad de las tres cepas cada dos horas y se comparan los resultados. Se muestra en la gráfica 21 como la cepa pUB110::v**g**b y la silvestre tienen un crecimiento muy similar en estas condiciones, aunque la cepa con el gen multicopia refleje con crecimiento exponencial más pronunciado. Una vez más el crecimiento de la cepa con el plásmido pTrp::v**g**b se muestra disminuido en comparación de sus contrapartes. Se obtienen los valores del tiempo medio generacional y de velocidad de división en las tres cepas en la condición de anaerobiosis. (Véase tabla 11). Los valores obtenidos de las densidades de crecimiento en esta condición se muestran en la tabla del apéndice 18.3.

Tabla 14 Valores del tiempo medio generacional y de velocidad de división en las tres cepas de *B. subtilis* en la condición de anaerobiosis.

Anaerobiosis	Valor de g (hr)	Valor de k (#de generaciones/hr)
Cepa Silvestre	1.532	0.652
Cepa pTrp::v g b	3.213	0.311
Cepa pUB 110::v g b	1.21	0.826

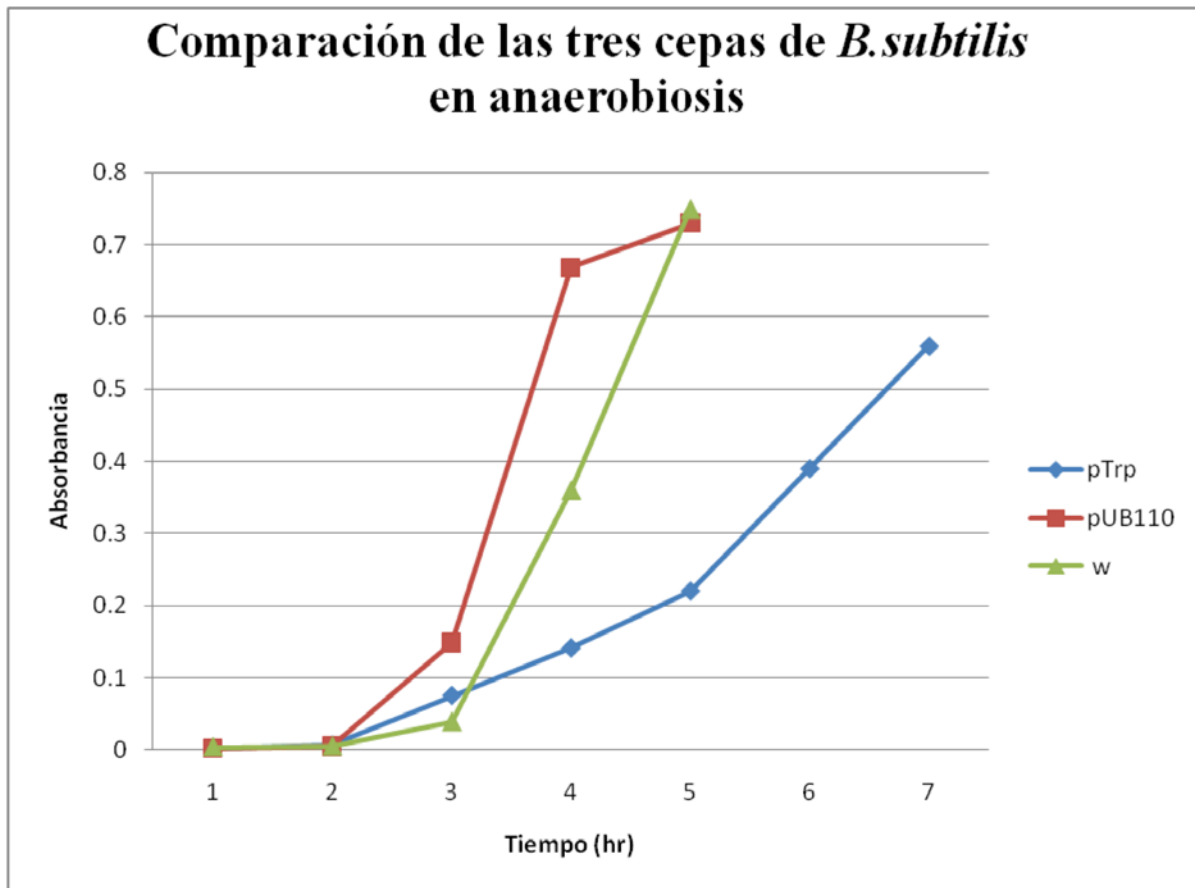


Figura 21 Comparación de los crecimientos de las tres cepas de *B.subtilis* a 37°C en condición de anaerobiosis. Las mediciones se realizaron cada dos horas.

Tabla 15 Análisis estadístico comparando la cepa silvestre con las cepas de *B.subtilis* que poseen plásmidos en la condición de anaerobiosis. Para observar las formulas ir a Apéndice 18.4.

Anaerobiosis						
pTrp	pUB110	w	media w	Desv est w	error pTrp	error pUB
0.002	0.002	0.004	0.003	0.061	5.14799E-05	5.14799E-05
0.006	0.005	0.005	0.004	0.070	5.46276E-05	1.30879E-05
0.075	0.149	0.039	0.026	0.20	0.011	0.07
0.141	0.668	0.36	0.33	0.42	0.09	0.26
0.22	0.73	0.75	0.748	0.25	1.11	0.001

Se creó un ambiente de “súper vacío” que fue evaluado con la misma técnica de cuantificación de densidad en los matraces nefelométricos usando el espectrofotómetro. Las mediciones realizadas fueron en periodos de cuatro horas en un total de 24-28 horas.

Se infiere con la gráfica 22 que el crecimiento de la cepa silvestre y la que posee el plásmido pUB110::*vgb* crecen de manera semejante en dicho ambiente a diferencia de la cepa con el plásmido unicopia el cual refleja un crecimiento ineficiente y retrasado. Se

observa que la cepa silvestre tiene aun mejor capacidad para crecer que la cepa con multicopia del gen aunque no en forma importante. Se comparó los valores del tiempo medio generacional y de velocidad de división en las tres cepas en la condición dicha condición como se observa en la Tabla 12.

Tabla 16 valores del tiempo medio generacional y de velocidad de división en las tres cepas de *B.subtilis* en la condición de anaerobiosis + vacío.

Anaerobiosis + Vacío	Valor de g (hr)	Valor de k (#de generaciones/hr)
Cepa Silvestre	3.71	0.269
Cepa pTrp:: <i>vgb</i>	6.72	0.4188
Cepa pUB 110:: <i>vgb</i>	2.622	0.381

Tabla 17 Análisis estadístico comparando la cepa silvestre con las cepas que poseen plásmidos en la condición de anaerobiosis + vacío. Para observar las formulas ir a Apéndice 18.4.

Anaerobiosis + vacío

pTrp	pUB110	w	media w	Desv Est w	Error pTrp	Error pUB
0.001	0.003	0.004	0.004	0.03	0.0002	2.64677E-05
0.003	0.006	0.058	0.012	0.12	.0006	0.0002
0.003	0.18	0.25	0.24	0.23	0.25	0.019
0.032	0.314	0.34	0.33	0.33	0.26	0.0007
0.106	0.32	0.37	0.36	0.36	0.17	0.004
0.118			0.34	0.35	0.14	0.33

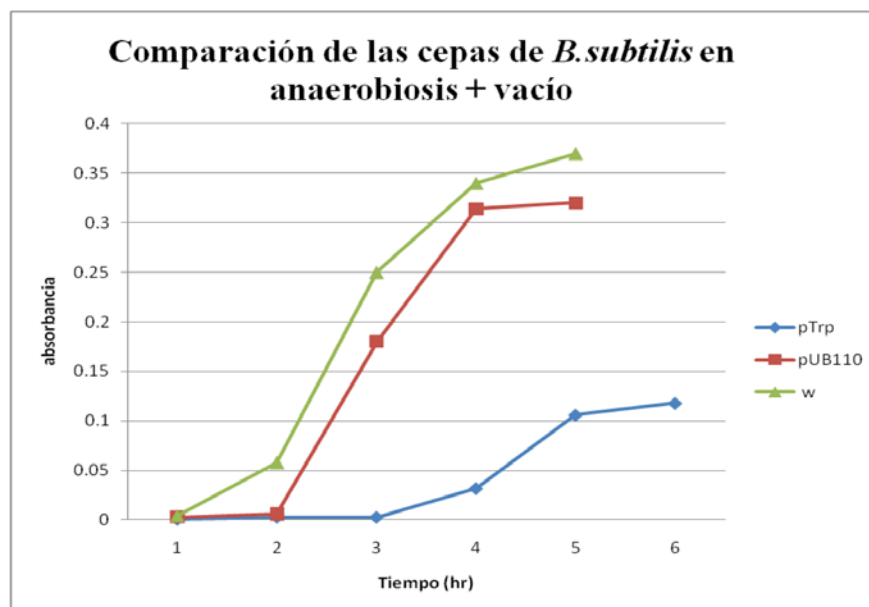


Figura 22 muestra la comparación del crecimiento de las tres cepas de *B.subtilis* a 37°C en condición de vacío. Las mediciones fueron realizadas en periodos de cuatro horas.