

# ADAPTATION OF *Bacillus licheniformis* TO MOLASSES FOR IMPROVED PRODUCTION OF A BIOFERTILIZER STRAIN

## ADAPTACIÓN DE *Bacillus licheniformis* A MELAZAS PARA LA PRODUCCIÓN MEJORADA DE UNA CEPA BIOFERTILIZANTE

Luis E. Mota-Pacheco<sup>1</sup>, Paula C. Guadarrama-Mendoza<sup>1</sup>, Raúl Salas-Coronado<sup>1</sup>, Adelfo Escalante<sup>2</sup>, Thomas J. Montville<sup>3</sup>, Rogelio Valadez-Blanco<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agroindustrias, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Carretera a Acatlima Km 2.5, Huajuapán de León, Oaxaca 69000, México. (luis.pacheco.14@ucl.ac.uk, pcgm2005@hotmail.com, rsalas@mixteco.utm.mx, rvaladez@mixteco.utm.mx). <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001. Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. adelfo@ibt.unam.mx. <sup>3</sup>Department of Food Science, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers, the State University of New Jersey, New Brunswick, NJ 08901, USA. montville@aesop.rutgers.edu

### ABSTRACT

The use of biofertilizers can reduce reliance on chemical fertilizers which are not renewable, are expensive to import, and degrade both the rhizosphere and the larger ecosystem. The aim of this research was to use sugarcane molasses to increase the production of a *Bacillus licheniformis* strain that can be used as a biofertilizer. A strain of *B. licheniformis* with nitrogen-fixation capability was isolated from a corn crop rhizosphere sample and adapted to increasing concentrations of sugarcane molasses up to 11 g L<sup>-1</sup>. The nature of the adaptation is likely to be a mutation induced by selective pressure. Diauxic growth was observed during cell adaptation at the different molasses concentration probably due to the modulation of the cell enzymatic activity for substrate uptake. The adapted cells presented a 6-fold increase in the growth rate ( $r_x$ ) at 11 g L<sup>-1</sup> molasses concentration, as compared to the cells during adaptation. With the use of a 3 L bioreactor, it was observed a 100% increase in the biomass specific yield (*i.e.* amount of cellular biomass produced per amount of molasses consumed) and a 68% increase in  $r_x$  in comparison with the flask cultures. In conclusion, *B. licheniformis* MV1 was successfully adapted to the use of a sugar industry byproduct as its main substrate with an increased yield and growth rate at a bioreactor scale. This can provide an alternative for low-cost and sustainable large-scale production of this organism for its use as a biofertilizer.

**Key words:** sustainable agriculture, rhizosphere bacterial biofertilizers, *Bacillus licheniformis*, sugarcane molasses, induced bacterial adaptation, biomass production.

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: May, 2018. Approved: February, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 1183-1201. 2019.

### RESUMEN

El uso de biofertilizantes puede reducir la dependencia de los fertilizantes químicos, que no son renovables, su importación es costosa, y degradan tanto la rizósfera como el ecosistema en general. El objetivo de la presente investigación fue usar melazas de caña de azúcar para aumentar la producción de una cepa de *Bacillus licheniformis* que pueda usarse como biofertilizante. Una cepa de *B. licheniformis* con capacidad para fijar nitrógeno se aisló de una muestra de la rizósfera de cultivo de maíz y se adaptó a concentraciones de melaza de caña en incremento hasta 11 g L<sup>-1</sup>. Es posible que la naturaleza de la adaptación sea una mutación inducida por presión de selección. Un crecimiento diaúxico se observó durante la adaptación celular a diferentes concentraciones de melazas, debido probablemente a la modulación de la actividad enzimática de la célula para la absorción desde el sustrato. Las células adaptadas presentaron un aumento de seis veces su tasa de crecimiento ( $r_x$ ) a una concentración de melazas de 11 g L<sup>-1</sup> en comparación con las células durante la adaptación. Con el uso de un biorreactor de 3 L, se observó un aumento de 100% en el rendimiento específico de biomasa, es decir, en la cantidad de biomasa celular producida por cantidad de melazas consumida; así como un aumento del 68% en  $r_x$  en comparación con los cultivos en matraz. En conclusión, *B. licheniformis* MV1 se adaptó exitosamente al uso de un derivado de la industria azucarera como su sustrato principal con aumentos en el rendimiento y en la tasa de crecimiento a escala de biorreactor. Esto puede brindar una alternativa para la producción de gran escala de este microorganismo a bajo costo y de manera sustentable para su uso como biofertilizante.

## INTRODUCTION

Biological amendments to soil offer many advantages to the increasing application of chemical fertilizers (Basu *et al.*, 2017). They can be sustainably produced from local agricultural by-products, posing fewer threats to the environment, and might help crops qualify as “organic” under U.S. regulations (Organic Foods Production Act of 1990). The use of biofertilizers would reduce reliance on chemical fertilizers which are expensive to import, degrade the soil organic and microbiological characteristics, deplete dissolved oxygen, and degrade the larger ecosystem (Plante, 2007).

The capability of biofertilizers to establish symbiotic relationships with plants, help crop nutrition and remediate the soil is well-established (Basu *et al.*, 2017). The rhizobacterium *Bacillus licheniformis* can act as an effective biofertilizer in agricultural systems by using different mechanisms such as auxin production, nitrogen fixation and phosphorus solubilization (Rojas *et al.*, 2001; Domenech *et al.*, 2006; Jha and Saraf, 2012). *B. licheniformis* strains were also used as biocontrol agents (Lim and Kim, 2010; Chung *et al.*, 2010), and *Bacillus* spp. bacteria can help to protect plants from fungal diseases by inducing the host systemic resistance (Adam *et al.*, 2014). Also, *B. licheniformis* improved the production of phenolic compounds and antioxidant activity of tomato fruits and regulated the secondary metabolism during greenhouse tomato cultivation (Ochoa-Velasco *et al.*, 2016). This metabolism is related to the self-defense mechanisms of the plants (Maciel Ferraz *et al.*, 2015).

Few reports in the literature have addressed the production of biomass at a bioreactor scale for obtaining inoculants of *B. licheniformis*. Lim and Kim (2010) used a range of substrates, including molasses, for the production of *B. licheniformis* and *B. subtilis* at an 8 L bioreactor scale. Chung *et al.* (2010) produced an inoculant consisting of thermo-resistant endospores of *B. licheniformis* and *B. subtilis* to suppress the presence of the phytopathogen *Phytophthora capsici* on red pepper cultivars. Zhao *et al.* (2008) reported a high yield production of *B. licheniformis* spores ( $1.7 \times 10^{11}$  CFU g<sup>-1</sup> of substrate) by using solid-state fermentation, where the substrate was a mixture of rice straw, wheat bran, and nutritional supplements. The large-scale production

**Palabras clave:** agricultura sustentable, biofertilizantes bacterianos de la rizósfera, *Bacillus licheniformis*, melazas de caña de azúcar, adaptación bacteriana inducida, producción de biomasa.

## INTRODUCCIÓN

Los coadyuvantes biológicos al suelo ofrecen muchas ventajas con respecto a la aplicación, cada vez más frecuente, de fertilizantes químicos (Basu *et al.*, 2017). Estos agentes pueden producirse de manera sustentable con el uso de derivados de la agricultura, presentar menos amenazas al medio ambiente y podrían contribuir a que las cosechas califiquen como “orgánicas” de acuerdo con los reglamentos en EE. UU. (Organic Foods Production Act, o el Acta de Producción de Alimentos Orgánicos, de 1990). El uso de biofertilizantes reduciría la dependencia de los fertilizantes químicos cuya importación es costosa, degradan las características orgánicas y microbiológicas del suelo, merman el oxígeno disuelto, y degradan el ecosistema en general (Plante, 2007).

La capacidad de los biofertilizantes para establecer relaciones simbióticas con plantas, ayudar a la nutrición de las cosechas y reparar el suelo se ha comprobado (Basu *et al.*, 2017). La rizobacteria *Bacillus licheniformis* puede funcionar como un biofertilizante efectivo en sistemas agrícolas al usar diferentes mecanismos tales como la producción de auxinas, la fijación de nitrógeno y la solubilización de fósforo (Rojas *et al.*, 2001; Domenech *et al.*, 2006; Jha y Saraf, 2012). Cepas de *B. licheniformis* también se han usado como agentes de biocontrol (Lim Kim, 2010; Chung *et al.*, 2010), y la bacteria *Bacillus* spp. puede ayudar a proteger a las plantas contra hongos patógenos al inducir la resistencia sistémica del huésped (Adam *et al.*, 2014). Además de esto, *B. licheniformis* mejoró la producción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de frutos de jitomate, y reguló el metabolismo secundario durante el cultivo de jitomates en invernadero (Ochoa-Velasco *et al.*, 2016). Este metabolismo está relacionado con los mecanismos de defensa de las plantas (Maciel Ferraz *et al.*, 2015).

Pocos documentos en la literatura han abordado el tema de la producción de biomasa a escala de biorreactor para obtener inoculantes de *B. licheniformis*. Lim y Kim (2010) utilizaron una variedad de sustratos, melazas incluidas, para la producción de *B. licheniformis* y *B. subtilis* a una escala de biorreactor de

of biofertilizers requires an economical substrate for growth. The industrial use of an agricultural waste as the carbon source can reduce biofertilizer production costs and help the process to become a sustainable technology by reducing the use of chemical fertilizers. We report here the increased production of a new *B. licheniformis* isolate by adapting this strain to increasing concentrations of molasses prior to cultivation in a bioreactor.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation and maintenance of the strain

A corn crop rhizosphere sample was collected from a semi-arid soil of the Oaxacan Mixteca region (Huajuapán de León, Oaxaca, Mexico). The sample was inoculated first in an ATCC:838 medium at 37 °C for the isolation of nitrogen-fixing bacteria (NFb medium). The cultures were further inoculated into NFb medium supplemented with Congo Red dye (CR) (Rodríguez-Cáceres, 1982) and incubated at 35 °C for 72 - 96 h. Scarlet-red colonies were isolated, grown in LB broth and recultured in the NFb-CR medium. The strain was purified after three growing cycles. For culture preservation, the strain was kept in NFb-CR or LB-CR media at 4 °C and recultured every three weeks in the same media.

### Strain identification

Strain identification was carried out by performing a 16S rDNA sequence analysis of the isolate. The analysis was performed following the method described by Escalante *et al.* (2008). A partial 16S rDNA sequence was submitted to the GenBank nucleotide database using the software BLAST. Strain identification was performed by searching for the best sequence match according to the highest percent of identity. Phylogenetic analyses were performed using the software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) and the trees were produced using the Maximum likelihood method with all sequences. The percentage of 1000 bootstrap samplings supporting each topological clade in the neighbour-joining analysis was estimated.

### Adaptation of the isolate to a molasses-enriched medium

#### Adaptation procedure

A sugarcane molasses medium for *B. licheniformis* contained (g L<sup>-1</sup> of distilled water): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2;

8 L. Chung *et al.* (2010) produjeron un inoculante de endoesporas termoresistentes de *B. licheniformis* y *B. subtilis* para suprimir la presencia del fitopatógeno *Phytophthora capsici* en cultivares de pimiento rojo. Zhao *et al.* (2008) documentaron una producción de rendimiento alto de esporas de *B. licheniformis* (1.7 x 10<sup>11</sup> CFU g<sup>-1</sup> de sustrato) al usar fermentación en estado sólido, en la cual el sustrato fue una mezcla de paja de arroz, salvado de trigo y suplementos nutrimentales. La producción a gran escala de biofertilizantes requiere un sustrato económico para el crecimiento. El uso industrial de un desecho agrícola como fuente de carbono puede reducir los costos de producción de biofertilizante y puede contribuir a que el proceso se convierta en una tecnología sustentable, al reducir el uso de fertilizantes químicos. En este estudio reportamos el aumento en la producción de un nuevo aislamiento de *B. licheniformis* por medio de la adaptación de esta cepa a concentraciones cada vez mayores de melazas antes de su cultivo en biorreactor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y mantenimiento de la cepa

Una muestra de rizósfera de cultivo de maíz se tomó de un suelo semiárido de la región Mixteca, en Oaxaca (Huajuapán de León, Oaxaca, México). Primero, la muestra se inoculó en un medio ATCC:838 a 37 °C para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno (medio NFb). Después, los cultivos se inocularon de nuevo en un medio NFb complementado con tinte Rojo Congo (RC) (Rodríguez-Cáceres, 1982) y se incubaron a 35 °C por 72 - 96 h. Colonias rojo escarlata se aislaron, cultivadas en caldo LB y recultivadas en medio NFb-CR. La cepa se purificó después de tres ciclos de cultivo. Para preservar los cultivos, la cepa se mantuvo en medio NFb-CR o LB-CR a 4 °C y se recultivó cada tres semanas en el mismo medio.

### Identificación de la cepa

La identificación de la cepa se llevó a cabo por medio de un análisis de secuencia de ADNr 16S de la materia aislada. El análisis se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Escalante *et al.* (2008). Una secuencia parcial de ADNr 16S se introdujo a la base de datos de nucleótidos GenBank con el uso del software BLAST. La cepa se identificó al hallar la mejor correspondencia de secuencias de acuerdo con el porcentaje de identidad más alto. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con el programa

NaCl, 0.1;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.015; agar (when solid medium was used), 15; varying amounts of molasses (0, 5, 8, 11, or 14 g L<sup>-1</sup>), maintaining a molasses:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ratio of 4:1. The molasses solution was sterilized apart from the rest of the medium components. This medium was named “Mota-Valadez” (MV) medium. Sugar analysis and optical density (OD<sub>610</sub>) were used as metrics for the capability of *B. licheniformis* to adapt to this medium.

The isolated strain was adapted to the MV medium with increasing concentrations of molasses: 5, 8, 11 and 14 g L<sup>-1</sup>. The acclimation was started by inoculating the isolate from LB agar cultures into MV broth flasks containing 5 g L<sup>-1</sup> of molasses at 30 °C. For subsequent adaptation stages (8, 11 and 14 g L<sup>-1</sup> molasses), an aliquot of the previous adaptation step was used as the inoculum. For each adaptation step, a 900 mL culture batch was prepared using the MV medium with the corresponding molasses concentration. The fresh broth was inoculated with 40 mL of the previous culture. After inoculation, the broth was mixed with a magnetic stirrer, and subsequently divided into two 400 mL flasks under aseptic conditions and treated as duplicate cultures. The OD<sub>610</sub> was determined, and colony morphology was observed under an axioscope light microscope (Axioskop™ Zeiss, Germany) every 12 h.

The OD<sub>610</sub> of the MV broth samples was measured by washing the cultured cells with two cycles of centrifugation at 3400 x g for 20 min and pellet resuspension in reverse-osmosis filtered water, followed by measuring the OD<sub>610</sub> in a DR5000 spectrophotometer (Hach, USA). Substrate consumption was determined by HPLC analysis of two culture broths: 1) the initial adaptation culture at 5 g L<sup>-1</sup> of molasses, and 2) the final adaptation stage with the cells adapted at 11 g L<sup>-1</sup> of molasses.

### Purity of the adapted strain

The adaptation process of the strain was carried out over four months. The purity of the adapted cultures for each molasses concentration was determined by an amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). After PCR amplification of the 16S rDNA gene of the cultures, the rDNA fragments were enzymatically digested with a *Hae* III restriction enzyme (BioLabs Inc., England) by incubation at 37 °C during 2 h. Following this, the digested products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel (Type I, Sigma-Aldrich, USA), using an EC-105 electrophoresis power supply (E-C Apparatus Co., USA). The gels were analyzed in a Molecular Imager Gel Doc™ XR+ Imaging System (Biorad, USA). Additionally, the cultures were microscopically visualized. The ARDRA patterns of the different molasses concentration cultures were compared to define if the cultures belong to the microbial species of the original strain. A 1 kb GeneRuler™ DNA ladder (Fermentas, USA) was used as a reference.

MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) y los árboles de las secuencias se desarrollaron usando el método de Máxima probabilidad para todas ellas. El porcentaje de 1000 remuestreos internos se estimó para apoyar cada linaje topológico en el análisis conjunto de linajes vecinos.

### Adaptación de la materia aislada a un medio rico en melaza

#### Procedimiento de adaptación

El medio de melazas de caña para *B. licheniformis* consistió en (g L<sup>-1</sup> de agua destilada): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2; NaCl, 0.1;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.015; agar (cuando se usó un medio sólido), 15; cantidades variadas de melazas (0, 5, 8, 11, o 14 g L<sup>-1</sup>), en una proporción melazas:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 4:1. La solución de melazas se esterilizó por separado del resto de los componentes del medio. Este medio fue llamado el medio “Mota-Valadez” (MV). Análisis de azúcar y densidad óptica (OD<sub>610</sub>) se utilizaron como medida de la capacidad de adaptación de *B. licheniformis* a este medio.

La cepa aislada se adaptó al medio MV con concentraciones de melazas cada vez mayores: 5, 8, 11 y 14 g L<sup>-1</sup> de melazas. La aclimatación comenzó con la inoculación del material aislado a partir de cultivos de agar LB en matraces con caldo MV que contenía 5 g L<sup>-1</sup> de melazas a 30 °C. Para las etapas de adaptación posteriores (8, 11 y 14 g L<sup>-1</sup> de melazas), se usó una alícuota del paso de adaptación previo como inóculo. Para cada paso de la adaptación, se preparó un lote de cultivo de 900 mL en el medio MV con la concentración correspondiente de melazas. El caldo fresco se inoculó con 40 mL del cultivo previo. Después de la inoculación, el caldo se mezcló con un agitador magnético y luego se dividió en dos matraces de 400 mL en condiciones asépticas, los cuales se trataron como cultivos duplicados. El OD<sub>610</sub> se determinó y la morfología de la colonia se observó bajo un microscopio óptico Axioscope (Axioskop™ Zeiss, Germany) cada 12 h.

El OD<sub>610</sub> de las muestras de caldo MV se midió con el lavado de las células cultivadas en dos ciclos de centrifugado a 3400 x g por 20 min y la resuspensión del sedimento en agua filtrada por osmosis inversa, seguidos por la medición del OD<sub>610</sub> en un espectrofotómetro DR5000 (Hach, USA). El consumo de sustrato se determinó por medio de un análisis de HPLC de dos caldos de cultivo: 1) el cultivo de adaptación inicial con 5 g L<sup>-1</sup> de melazas y 2) la etapa final de adaptación con las células adaptadas a 11 g L<sup>-1</sup> de melazas.

### Pureza de la cepa adaptada

El proceso de adaptación de la cepa se llevó a cabo durante cuatro meses. La pureza de los cultivos adaptados para cada concentración de melazas se determinó por medio de un análisis de

### Growth and substrate utilization of the adapted strain

The growth of the adapted strain in media containing different initial molasses concentrations was assessed. For these studies, media (800 mL) were prepared with 5, 8, 11 and 14 g L<sup>-1</sup> of molasses. The media were inoculated with the ultimately adapted strain and mixed with a magnetic stirrer. Each culture was then divided into two 400 mL flasks and further incubated at 30 °C and treated as duplicate cultures. Samples (10 mL) were withdrawn every 6 h for OD<sub>610</sub> measurements. The initial and final samples for each molasses concentrations were analyzed for total sugar content in triplicate by the Dubois method as described in Wrolstad *et al.* (2005).

### Cell growth of the adapted strain after reculturing in solid media

After *B. licheniformis* cells adaptation, the strain was refrigerated (5 °C) and sequentially recultured three times in LB agar plates for two months. An assay was performed to determine if the adaptation was physiological or evolutionary by comparing the growth of the adapted strain cultured in an 11 g L<sup>-1</sup> molasses medium with that of the same culture grown without molasses addition. The strain was inoculated in flasks containing MV broth (100 mL) with 11 g L<sup>-1</sup> molasses concentration. A control was prepared using the NFB medium supplemented with 5 g L<sup>-1</sup> glucose. The flasks were incubated at 28 ± 2 °C during 72 h in duplicate. After the incubation period, visual observation of cell growth was done. Then, the OD<sub>610</sub> was measured and the ARDRA profiling was performed to determine the purity of the adapted strain. Also, an aliquot of the MV broths was streaked onto LB-RC plates for cell colony morphological observation.

### Bioreactor experiment with adapted strain

The final adapted strain was cultured in a 4 L stirred tank bioreactor 2F300B (SEV, Mexico). Systems for controlling temperature and pH and data acquisition were designed and constructed at the Universidad Tecnológica de la Mixteca using a Measurement Computing® data acquisition card (USB1208-FS) and the LabView 2010 software (National Instruments, USA). A 3 L volume of the MV broth containing 11 g L<sup>-1</sup> of molasses was inoculated with 300 mL of the adapted culture, which was grown overnight in LB broth. The bioreactor was maintained at 30 ± 0.3 °C, 7 ± 0.1 pH, 200 rpm, and constant aeration during 38 h. Samples were withdrawn at regular time intervals for OD<sub>610</sub> measurements. The total sugar concentration in the medium was determined at the beginning and the end of the process in triplicate.

restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA). Después de la amplificación de PCR del gen ADN<sub>r</sub> 16S de los cultivos, los fragmentos de ADN<sub>r</sub> se sometieron a digestión enzimática con una enzima restricción *Hae* III (BioLabs Inc., England) por incubación a 37 °C durante 2 h. En seguida, los productos digeridos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Tipo I, Sigma-Aldrich, EE. UU.), con el uso de una fuente de alimentación de electroforesis EC-105 (E-C Apparatus Co., USA). Los geles se analizaron en un equipo Molecular Imager Gel Doc™ XR+ Imaging System (Biorad, EE. UU.). Además de esto, los cultivos se observaron al microscopio. Las secuencias ARDRA de los cultivos con diferentes concentraciones de melazas se compararon para definir si los cultivos pertenecen a la misma especie microbiana de la cepa original. Un marcador molecular de ADN 1 kb GeneRuler™ (Fermentas, EE. UU.) se usó como referencia.

### Crecimiento y uso del sustrato de la cepa adaptada

El crecimiento de la cepa adaptada se evaluó en los medios con concentraciones diferentes de melazas. Para estos estudios, se prepararon medios (800 mL) con 5, 8, 11 y 14 g L<sup>-1</sup> de melazas. Los medios se inocularon con la cepa adaptada definitiva y se mezclaron usando un agitador magnético. En seguida, cada cultivo se dividió en dos matraces de 400 mL, los cuales se incubaron a 30 °C y se trataron como cultivos duplicados. Muestras (10 mL) se tomaron cada 6 h para medir OD<sub>610</sub>. Las muestras iniciales y finales para cada concentración de melazas se analizaron para determinar el contenido de azúcar por triplicado usando el método Dubois como aparece descrito por Wrolstad *et al.* (2005).

### Crecimiento celular de la cepa adaptada después del recultivo en medio sólido

Después de la adaptación celular de *B. licheniformis*, la cepa se refrigeró (5 °C) y se recultivó de manera secuencial en placas de agar LB por dos meses. Una prueba se llevó a cabo para determinar si la adaptación fue fisiológica o evolutiva, por medio de la comparación del crecimiento de la cepa adaptada cultivada en un medio de 11 g L<sup>-1</sup> de melazas con otro del mismo cultivo en medio sin la adición de melazas. La cepa se inoculó en matraces con caldo MV (100 mL) con una concentración de melazas de 11 g L<sup>-1</sup>. Un control se preparó en el medio NFB suplementado con 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa. Los matraces se incubaron a 28 ± 2 °C durante 72 h por duplicado. Después del periodo de incubación se llevó a cabo una observación visual del crecimiento celular. Luego, se midió el OD<sub>610</sub> y se llevó a cabo una prueba de secuencia en bandas ARDRA para determinar la pureza de la cepa adaptada. Además, una alícuota de los caldos MV se sembró por estriado

### Sugar analysis

Total sugar concentrations were determined using a modification of the Dubois method as reported by Wrolstad *et al.* (2005). A sucrose standard calibration curve was carried out for total sugar quantifications. Concentrations of specific sugars were determined by reverse phase HPLC in an HPLC LC 1445 system, equipped with a LC1150 pump, a 20  $\mu$ L injection loop, and a LC1240 index refraction detector (GBC, Australia). A MetaCarb 87C reverse phase column (300 x 7.8 mm) (Varian, USA) was maintained at 85 °C using an Eppendorf CH-30 heating oven. Distilled water was used to prepare a calcium EDTA (50 mg L<sup>-1</sup>) solution which, after filtration and degasification, was pumped into the column at 0.1 mL min<sup>-1</sup>. Sugar standard solutions were prepared with reagent-grade glucose, fructose (Sigma-Aldrich, USA) and sucrose (Baker, USA) at 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% (w/v), and kept refrigerated for 48 h before the injection. Broth samples and the sugar solutions were filtered through a 0.45  $\mu$ m syringe filter and subsequently injected into the HPLC system with a 25 min elution time.

### Sugar fermentation analysis

A phenol red broth base assay (MacFaddin, 2000) was used to determine the capability of the strain to ferment sugars and a phenol red broth base (Sigma Aldrich, USA) was used to prepare a basal medium broth. The fermentation of glucose and fructose was tested by separately adding 1% (w/v) of the sugars to the phenol red broth tubes. A blank culture tube was prepared without sugar addition. After media sterilization, the strain was inoculated into the test tubes and grown at 37 °C for 24 h. In this assay, a change of color from red to yellow indicates that the cells are able to ferment the test carbohydrate.

### Biomass concentration

Biomass concentration was estimated by using OD<sub>610</sub> broth samples, including one sample of a non-inoculated medium, were centrifuged at 3400 x g for 30 min. The pellet was re-suspended in distilled water, centrifuged and washed two more times. The OD<sub>610</sub> values were measured in the DR5000 spectrophotometer. A broth sample without bacterial growth was used as a blank for these measurements. Cell morphology was determined microscopically.

### Statistical analysis

An ANOVA analysis was performed using the SAS<sup>®</sup> v.8.0 software (SAS Institute, USA) to determine the contribution

en placas LB-RC para realizar observaciones morfológicas de las colonias celulares.

### Experimento en biorreactor con la cepa adaptada

La cepa final adaptada se cultivó en un biorreactor de tanque agitado 2F300B de 4 L (SEV, México). Sistemas se diseñaron y construyeron para controlar la temperatura y el pH así como para la adquisición de datos en la Universidad Tecnológica de la Mixteca usando una tarjeta de adquisición de datos Measurement Computing<sup>®</sup> (USB1208-FS) y el software LabView 2010 (National Instruments, EE. UU.). Un volumen de 3 L del caldo MV con 11 g L<sup>-1</sup> de melazas se inoculó con 300 mL del cultivo adaptado, que se cultivó durante toda la noche en un caldo LB. El biorreactor se mantuvo a 30 ± 0.3 °C, 7 ± 0.1 pH, 200 rpm, y aireación constante durante 38 h. Muestras se tomaron intervalos regulares para la medición de OD<sub>610</sub>. La concentración total del azúcar en el medio se determinó por triplicado al principio y al final del proceso.

### Análisis de azúcares

Las concentraciones azúcares totales se determinaron usando una modificación del método Dubois según consignaron Wrolstad *et al.* (2005). Una curva de calibración del estándar de sacarosa se realizó para las cuantificaciones de azúcares totales. Las concentraciones de azúcares específicos se determinaron por medio de HPLC en fase reversa en un sistema HPLC LC 1445, equipado con una bomba LC1150, un bucle de inyección de 20  $\mu$ L y un detector de índice de refracción LC1240 (GBC, Australia). Una columna de fase reversa MetaCarb 87C (300 x 7.8 mm) (Varian, EE. UU.) se mantuvo a 85 °C usando un horno Eppendorf CH-30. Agua destilada se usó para preparar una solución de EDTA de calcio (50 mg L<sup>-1</sup>) que, después de filtrarse y desgasificarse, se bombeó a la columna a 0.1 mL min<sup>-1</sup>. Soluciones de azúcares estándar se prepararon con: glucosa, fructosa (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y sacarosa (Baker, EE. UU.) de grado de reactivo a 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% (w/v), y se mantuvieron en refrigeración durante 48 h antes de la inyección. Las muestras de caldo y las soluciones de azúcar se filtraron con un filtro de jeringa de 0.45  $\mu$ m y a continuación se inyectaron al sistema HPLC con un tiempo de elución de 25 min.

### Análisis de fermentación de azúcares

Una prueba basal de caldo rojo de fenol (MacFaddin, 2000) se usó para determinar la capacidad de la cepa para fermentar azúcares y una base caldo rojo de fenol (Sigma Aldrich, EE. UU.) se utilizó para preparar un caldo de cultivo basal. La fermentación

of the initial substrate concentration on substrate consumption and biomass yield ( $p \leq 0.05$ ). Additionally, the Tukey's honestly significant difference test (Tukey HSD) was used for comparisons among means ( $p \leq 0.05$ ). For data plots, the error bars were estimated as the 95% confidence intervals of the measurements.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification of the rhizosphere isolate

A BLAST analysis of the MV1 isolate's 16S rDNA gene sequence (1423 bp) resulted in a 100% identity match against *B. licheniformis* strains with accession numbers KC899772.1, DQ071568.1, KF879265.1 and HQ634209.1 (Figure 1). The strain sequence was deposited in the GenBank as *B. licheniformis* MV1, with accession number KJ190320.

### Adaptation of *B. licheniformis* to a molasses-enriched medium

The new *B. licheniformis* MV1 soil isolate grew as short rods ( $2.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$  large and  $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$  wide) in solid medium (Figure 2A). However, in liquid culture medium, the bacteria were larger and had a non-defined shape (Figure 2B). When these bacteria were re-inoculated in a solid medium, they reverted to the rod shape. This morphological transformation

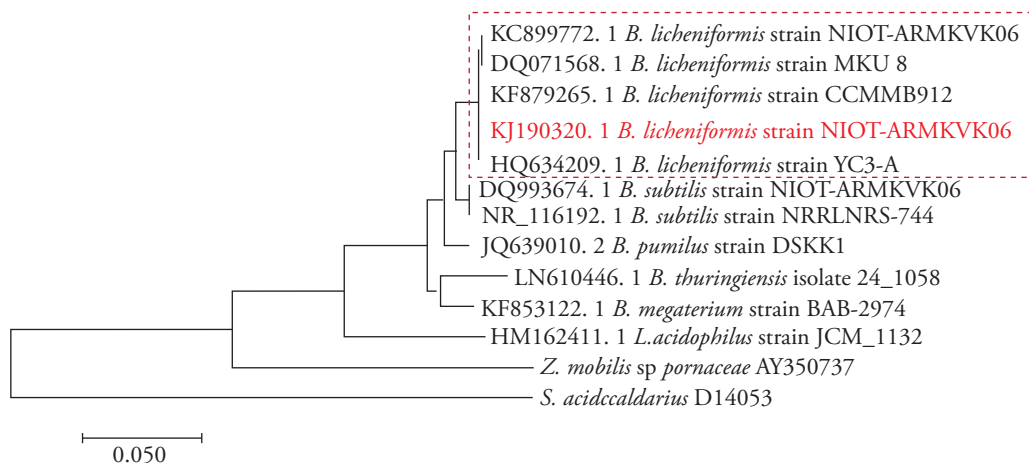
de glucosa y fructosa se evaluó al agregar, por separado, 1% (p/v) de los azúcares a los tubos con caldo rojo de fenol. Un tubo de cultivo control se preparó sin agregar azúcar. Después de la esterilización de los medios, la cepa se inoculó a los tubos de ensayo y se dejó crecer a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. En este análisis, un cambio de color de rojo a amarillo indica que las células son capaces de fermentar el carbohidrato de prueba.

### Concentración de biomasa

La concentración de biomasa se estimó con el  $\text{OD}_{610}$  de las muestras de caldo de cultivo, incluida una muestra de un medio no inoculado; las muestras se centrifugaron a  $3400 \times g$  por 30 min. El sedimento se resuspendió en agua destilada, se centrifugó y se lavó dos veces más. Los valores de  $\text{OD}_{610}$  se midieron en el espectrofotómetro DR5000. Una muestra de caldo sin crecimiento bacteriano se usó como control para estas mediciones. La morfología celular se determinó por medio del microscopio.

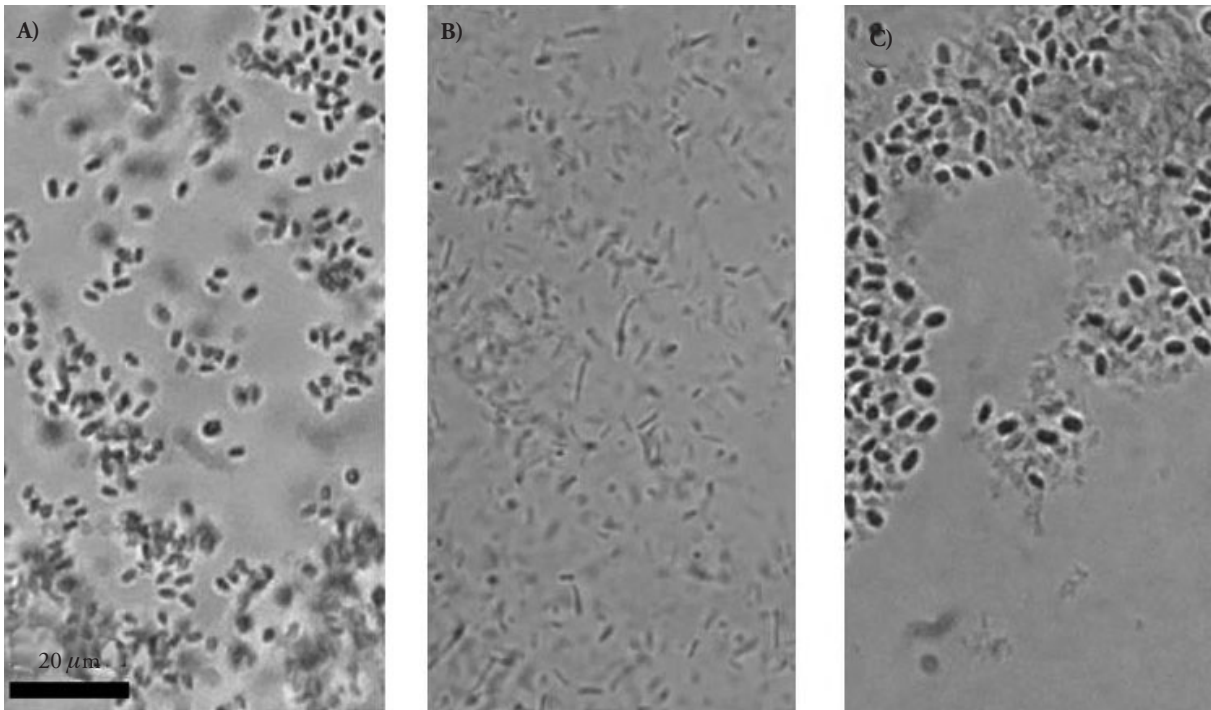
### Análisis estadístico

Un análisis ANDEVA se realizó con el paquete SAS<sup>®</sup> v.8.0 (SAS Institute, EE. UU.) para determinar la contribución de la concentración inicial de sustrato en el consumo de sustrato y el rendimiento de biomasa ( $p \leq 0.05$ ). Además, la prueba de Tukey (Tukey HSD) se usó para hacer comparaciones entre medias ( $p \leq 0.05$ ). Para graficar los datos, las barras de error se estimaron como los intervalos del 95% de confianza de las mediciones.



**Figure 1.** Phylogenetic tree of 16S rDNA partial sequences of *Bacillus licheniformis* strain MV1 isolate and reference sequences retrieved from the GenBank database. Accession numbers of reference sequences are indicated. The *B. licheniformis* cluster including isolated strain MV1 is shown in a red-dotted line box.

**Figura 1.** Árbol filogenético de secuencias parciales de ADNr 16S de la cepa aislada *Bacillus licheniformis* MV1 y secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del GenBank. Los números de accesoión de las secuencias de referencia se indican. El subgrupo de *B. licheniformis* que incluye la cepa aislada MV1 se muestra en un recuadro rojo de líneas punteadas.



**Figure 2.** *Bacillus licheniformis* MV1 in the Mota-Valadez medium with 5 g L<sup>-1</sup> molasses: A) Culture after inoculation. B) Encysted cells of *B. licheniformis* at 6 h of incubation. C) Culture at the end of incubation (100X magnification).

**Figura 2.** *Bacillus licheniformis* MV1 en el medio Mota-Valadez con 5 g L<sup>-1</sup> de melazas: A) Cultivo después de la inoculación. B) Células enquistadas de *B. licheniformis* a 6 h de incubación. C) Cultivo al final de la incubación (Magnificación 100X).

was referred as “encystment”. Similar cellular behaviour has been observed for other rhizosphere microorganisms (Sadasivan and Neyra, 1987). To the best of our knowledge, this is the first study reporting encystment in *B. licheniformis*. Additionally, *B. licheniformis* produced an insoluble polymer in the broth culture. The polymer formed a matrix which surrounded the rod cells thus promoting cell coalescence with the consequent formation of a macroscopic polymer layer.

The strain exhibited metabolic changes producing an insoluble polymer and a low biomass production rate ( $r_x$ ), 3.8 x 10<sup>-3</sup> optical density units (ODU) per hour, when the growth medium was changed from solid to liquid. Kaynar and Beyatli (2009) reported the production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, an insoluble polymer, by *B. licheniformis*.

In order to induce higher biomass productivity, the microorganism was adapted to increasing cane molasses concentrations using batch flask cultures. At 12 h of incubation in the MV medium with 5 g L<sup>-1</sup> of

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de la materia aislada de la rizósfera

Un análisis BLAST de la secuencia del gen ADN<sub>r</sub> 16S de la materia aislada MV1 (1423 bp) dio como resultado una coincidencia de identidad del 100% en relación con las cepas de *B. licheniformis* con números de accesión KC899772.1, DQ071568.1, KF879265.1 y HQ634209.1 (Figura 1). La secuencia de la cepa se depositó en el GenBank como *B. licheniformis* MV1, con el número de accesión KJ190320.

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

La cepa nueva *B. licheniformis* MV1 aislada del suelo creció con forma de bacilos cortos (2.5±0.7 µm de largo y 0.7±0.1 µm de ancho) en medio sólido (Figura 2A). Sin embargo, en medio de cultivo

molasses, the strain started changing to its encysted form (Figure 2B). At 18 h of incubation, a pellicle was formed at the medium surface. At the end of the incubation period, the microorganism returned to its normal rod shape (Figure 2C). A similar behavior occurred in the 8 and 11 g L<sup>-1</sup> cultures, but in these cases, the encysted periods were shorter than that observed in the 5 g L<sup>-1</sup> run. Furthermore, no polymer was produced in the 11 g L<sup>-1</sup> culture. Finally, no cell growth was observed in the 14 g L<sup>-1</sup> molasses experiment during 500 h of incubation.

The cells of *B. licheniformis* were successfully adapted to the enriched molasses liquid medium, thus preventing the microorganisms to encyst and to produce biopolymers. The purity of the strain before, throughout, and after the adaptation process was determined by ARDRA profiling. This determination confirmed that the adapted microorganisms were genetically similar to the original strain: *i.e.*, no microbial contamination occurred during the adaptation period (Figure 3). The maximum molasses concentration for increased biomass production was 11 g L<sup>-1</sup>, reaching an OD<sub>610</sub> value of 1.0 and a maximum  $r_x$  value of  $2.88 \times 10^{-3}$  ODU h<sup>-1</sup>. At greater molasses concentrations, no cell growth was observed, probably due to cell inhibition caused by the increased concentrations of the medium components.

Diauxic and triauxic growth patterns were observed during the adaptation process at the different molasses concentrations (Figure 4). Since a variety of functions fitted the growth stages, for the purpose of comparing the rate at the different growth stages, linear regressions were performed to fit the growth data. The cell growth rates ( $r_x$ ) were obtained from the slope of the fitted linear plots and are reported in ODU h<sup>-1</sup> (Table 1). Both, the 5 g L<sup>-1</sup> and the 11 g L<sup>-1</sup> cultures presented diauxic growth, while in the 8 g L<sup>-1</sup> culture, three growth stages were observed (Figure 4). The highest growth rate occurred at the second growth stage in all the cultures (Table 1) while the growth rate decreased with molasses concentration.

#### Growth of the adapted strain with different molasses concentrations

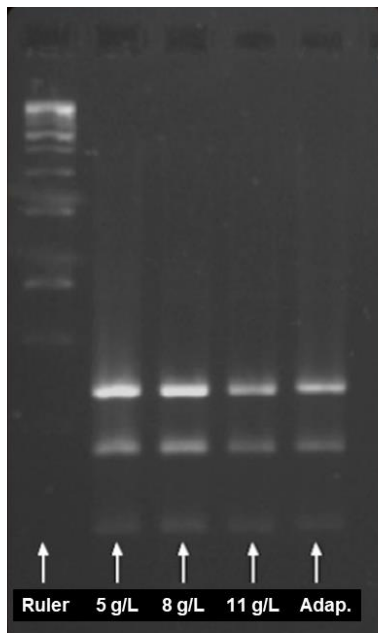
Although the final biomass concentrations with the adapted strain culture were lower than those obtained during the adaptation period, the growth

líquido, las bacterias crecieron más grandes y no presentaron una forma definida (Figura 2B). Cuando estas bacterias se re-inocularon en un medio sólido, regresaron a la forma bacilar. A esta transformación morfológica se le denominó “enquistamiento”. Un comportamiento celular similar se ha observado en otros microorganismos de la rizósfera (Sadasivan y Neyra, 1987). Hasta donde sabemos, éste es el primer experimento que registra el enquistamiento en *B. licheniformis*. Además de esto, *B. licheniformis* produjo un polímero insoluble en el caldo de cultivo. El polímero formó una matriz que rodeó las células bacilares y promovió la coalescencia celular, con la consecuente formación de una capa macroscópica de polímero.

La cepa presentó cambios metabólicos, produjo un polímero insoluble y una tasa baja de producción de biomasa ( $r_x$ ),  $3.8 \times 10^{-3}$  unidades de densidad óptica (UDO) por hora, cuando el medio de crecimiento cambió de sólido a líquido. Kaynar y Beyatli (2009) documentaron la producción del polímero insoluble poli- $\beta$ -hidroxibutirato por parte de *B. licheniformis*.

Para inducir productividad de biomasa mayor, el microorganismo se adaptó a concentraciones cada vez mayores de melazas de caña con el uso de cultivos lote en matraz. A las 12 h de incubación en el medio MV con 5 g L<sup>-1</sup> de melazas, la cepa comenzó a transformarse a su forma enquistada (Figura 2B). A las 18 h de incubación, se formó una película en la superficie del medio. Al final del periodo de incubación, el microorganismo volvió a su forma bacilar habitual (Figura 2C). Un comportamiento similar se observó en los cultivos de 8 y 11 g L<sup>-1</sup>, aunque en estos casos, los periodos de enquistamiento fueron menores a los observados al de 5 g L<sup>-1</sup>. Además de esto, no hubo producción de polímero en el cultivo con 11 g L<sup>-1</sup>. Finalmente, no se observó crecimiento celular en el experimento con 14 g L<sup>-1</sup> de melazas durante 500 h de incubación.

Las células de *B. licheniformis* se adaptaron con éxito al medio líquido enriquecido con melazas, lo cual evitó que los microorganismos se enquistaran y produjeran biopolímeros. La pureza de la cepa antes, durante y después del proceso de adaptación se determinó por medio de un análisis ARDRA de secuencia en bandas. Esta determinación confirmó que los microorganismos adaptados eran genéticamente similares a la cepa original, es decir, no hubo contaminación microbiana alguna durante el periodo



**Figure 3.** Amplified 16S rDNA restriction analysis (ARDRA) of the *Bacillus licheniformis* cultures obtained at different stages during the adaptation to molasses. Lanes from left to right: 1 kb GeneRuler™ DNA ladder, and 5, 8, 11 g L<sup>-1</sup> molasses concentration culture samples, and adapted cells sample.

**Figura 3.** Análisis de restricción del gen amplificado ADNr 16S (ARDRA) de los cultivos de *Bacillus licheniformis* obtenidos en diferentes etapas durante la adaptación a melazas. Carriles de izquierda a derecha: marcador de ADN 1 kb GeneRuler™, y muestras de cultivos con concentraciones de melazas de 5, 8, 11 g L<sup>-1</sup>, y muestra de células adaptadas.

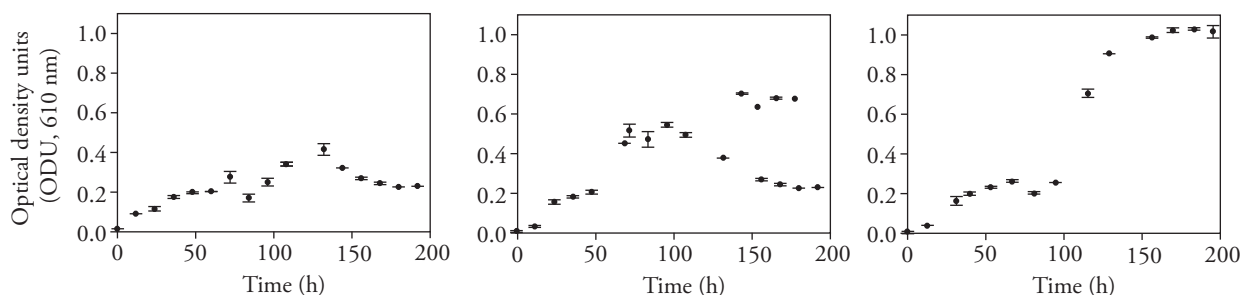
rates were considerably greater (Table 1): about 2, 3, and 6 times higher for the 5, 8, and 11 g L<sup>-1</sup> cultures, respectively. The maximum biomass production was obtained in the cultures with 11 and 14 g L<sup>-1</sup> molasses (Figure 5), with a slightly higher growth

de adaptación (Figure 3). La concentración máxima de melazas para obtener una producción de biomasa mayor fue de 11 g L<sup>-1</sup>, con un valor OD<sub>610</sub> de 1.0 y un valor r<sub>x</sub> máximo de 2.88 x 10<sup>-3</sup> ODU h<sup>-1</sup>. No se observó crecimiento celular en mayores concentraciones de melazas, quizá debido a una inhibición celular causada por las concentraciones elevadas de los componentes del medio.

Patrones de crecimiento diáuxico y triáuxico se observaron durante el proceso de adaptación a las diferentes concentraciones de melazas (Figura 4). Debido a que, una variedad de funciones se ajustaba a las etapas de crecimiento, y con el fin de comparar las velocidades en las diferentes etapas de crecimiento, se realizaron regresiones lineales para ajustar los datos de crecimiento. Las tasas de crecimiento celular (r<sub>x</sub>) se obtuvieron de la pendiente de las curvas lineales ajustadas y se indican en ODU h<sup>-1</sup> (Cuadro 1). Tanto los cultivos de 5 g L<sup>-1</sup> como los de 11 g L<sup>-1</sup> presentaron crecimiento diáuxico, mientras que en el cultivo de 8 g L<sup>-1</sup> se observaron tres etapas de crecimiento (Figura 4). La mayor tasa de crecimiento ocurrió en la segunda etapa de crecimiento en todos los cultivos (Cuadro 1) mientras que la tasa de crecimiento se redujo con la concentración de melazas.

### Crecimiento de la cepa adaptada con diferentes concentraciones de melazas

Si bien las concentraciones finales de biomasa del cultivo de la cepa adaptada fueron menores a las obtenidas durante el periodo de adaptación, las tasas de crecimiento fueron considerablemente mayores (Tabla 1): aproximadamente 2, 3, y 6 veces mayores para los cultivos de 5, 8, y 11 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.



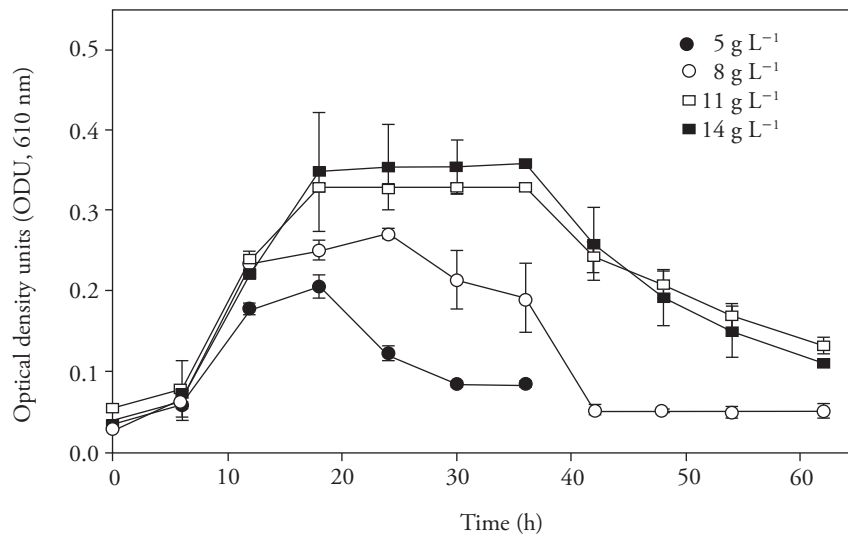
**Figure 4.** *Bacillus licheniformis* growth in the Mota-Valadez medium at different concentrations of sugarcane molasses: A) 5 g L<sup>-1</sup>, B) 8 g L<sup>-1</sup>, C) 11 g L<sup>-1</sup>. Error bars indicate the 95% confidence interval for the measurements.

**Figura 4.** Crecimiento de *Bacillus licheniformis* en el medio Mota-Valadez a diferentes concentraciones de melazas de caña de azúcar: A) 5 g L<sup>-1</sup>, B) 8 g L<sup>-1</sup>, C) 11 g L<sup>-1</sup>. Las barras de error indican el intervalo del 95% de confianza de las mediciones.

**Table 1.** Linear-fit growth rates for the adapting and the adapted *Bacillus licheniformis* cultures with different molasses concentrations.**Cuadro 1.** Tasas de crecimiento de ajuste lineal de los cultivos en adaptación y adaptados de *Bacillus licheniformis* con diferentes concentraciones de melazas.

Molasses concentration (g L <sup>-1</sup> )	Adapting cultures <sup>†</sup>			Adapted cultures <sup>‡</sup>	
	Period of exponential growth	Growth rate <sup>§</sup> (x 10 <sup>-3</sup> ODU h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Growth rate <sup>¶</sup> (x 10 <sup>-3</sup> ODU h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
5	1st	3.80	0.964	10.56	0.917
	2nd	5.21	0.960		
8	1st	2.28	0.915	13.99	0.892
	2nd	4.77	0.939		
	3rd	1.30	0.815		
11	1st	1.15	0.953	16.29	0.937
	2nd	2.88	0.895		
14	-	N.D.	-	18.32	0.936

N.D. No cell growth detected. <sup>†</sup>Diauxic or triauxic cell growth patterns were observed in the adapting-cell experiments. <sup>‡</sup>A single cell growth pattern was observed in the adapted-cell experiments. Growth rates reported in optical density units (ODU) per hour. <sup>§</sup>A linear equation fit was considered for the fast cell growth periods, in which the slope represents the cell growth rate. Lag phase was considered. Growth rates reported in optical density units (ODU) per hour. <sup>¶</sup>Cell growth rates calculated as in <sup>§</sup>. Lag phase was not considered. ♦ N.D. No se detectó crecimiento. <sup>†</sup>Patrones de crecimiento diáuxico o triáuxico se observaron en los experimentos de células en adaptación. <sup>‡</sup>Un patrón de crecimiento unicelular se observó en los experimentos de células adaptadas. Las tasas de crecimiento se indican en unidades de densidad óptica (UDO) por hora. <sup>§</sup>Una ecuación de ajuste lineal se consideró para los periodos de rápido crecimiento celular, en los cuales la pendiente representa la tasa de crecimiento celular. La fase de retardo se consideró. Las tasas de crecimiento se indican en unidades de densidad óptica (UDO) por hora. <sup>¶</sup>Tasas de crecimiento celular calculadas como en <sup>§</sup>. No se consideró la fase de retardo.

**Figure 5.** Cell growth of the adapted *Bacillus licheniformis* strain in the Mota-Valadez medium with different molasses concentrations. Error bars indicate the 95% confidence interval for the measurements.**Figura 5.** Crecimiento celular de la cepa adaptada de *Bacillus licheniformis* en el medio Mota-Valadez con diferentes concentraciones de melaza. Las barras de error indican el intervalo del 95% de confianza de las mediciones.

rate in the 14 g L<sup>-1</sup> culture (Table 1). The growth rate was plotted as a function of molasses concentration (5, 8, 11 and 14 g L<sup>-1</sup>), for the adapted strain corresponding to a first order growth kinetics:  $r_x = k C_{\text{molasses}} + c$ ; where  $k$  is the rate constant (0.853);  $C_{\text{molasses}}$  is the molasses concentration;  $c = 6.69 \times 10^{-3}$  ODU h<sup>-1</sup>; and the R<sup>2</sup> value is 0.984. Additionally, total sugar concentrations were quantified before and after growth (Table 2). *B. licheniformis* consumed the same amounts of sugars in all cultures, except for the 14 g L<sup>-1</sup> of molasses culture where substrate utilization and biomass/substrate yield ( $Y_{x/s}$ ) were lower.

### Sugar utilization of the non-adapted and adapted strains

From the sugar fermentation assay, it was concluded that both the adapted and the non-adapted *B. licheniformis* strains have the capability to ferment glucose and fructose. An analysis of the three main sugars present in molasses (glucose, fructose, and sucrose) during *B. licheniformis* growth was performed for the different molasses-concentration batches at the beginning and after the molasses adaptation process by using HPLC (Figure 6). For the non-adapted strain, the samples were obtained from the 5 g L<sup>-1</sup> molasses initial culture described in the experimental section.

In the 5 g L<sup>-1</sup> culture of the adapting cells, a diauxic growth was observed. Similar behaviors occurred for the growth curves at higher molasses concentrations

La producción máxima de biomasa se obtuvo en los cultivos con 11 y 14 g L<sup>-1</sup> de melaza (Figura 5), con una tasa de crecimiento ligeramente mayor en el cultivo de 14 g L<sup>-1</sup> (Tabla 1). La tasa de crecimiento se graficó como una función de la concentración de melazas (5, 8, 11 y 14 g L<sup>-1</sup>) para la cepa adaptada que corresponde a una cinética del crecimiento de primer orden:  $r_x = k C_{\text{molasses}} + c$ ; donde  $k$  es la constante de velocidad (0.853);  $C_{\text{molasses}}$  es la concentración de melazas;  $c = 6.69 \times 10^{-3}$  ODU h<sup>-1</sup>; y el valor de R<sup>2</sup> es 0.984. Además de esto, las concentraciones totales de los azúcares se cuantificaron antes y después del crecimiento (Cuadro 2). *B. licheniformis* consumió la misma cantidad de azúcares en todos los cultivos, excepto por el cultivo con 14 g L<sup>-1</sup> de melazas, en el que el consumo del sustrato y el rendimiento de biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) fueron menores.

### Uso de azúcares de las cepas adaptadas y no adaptadas

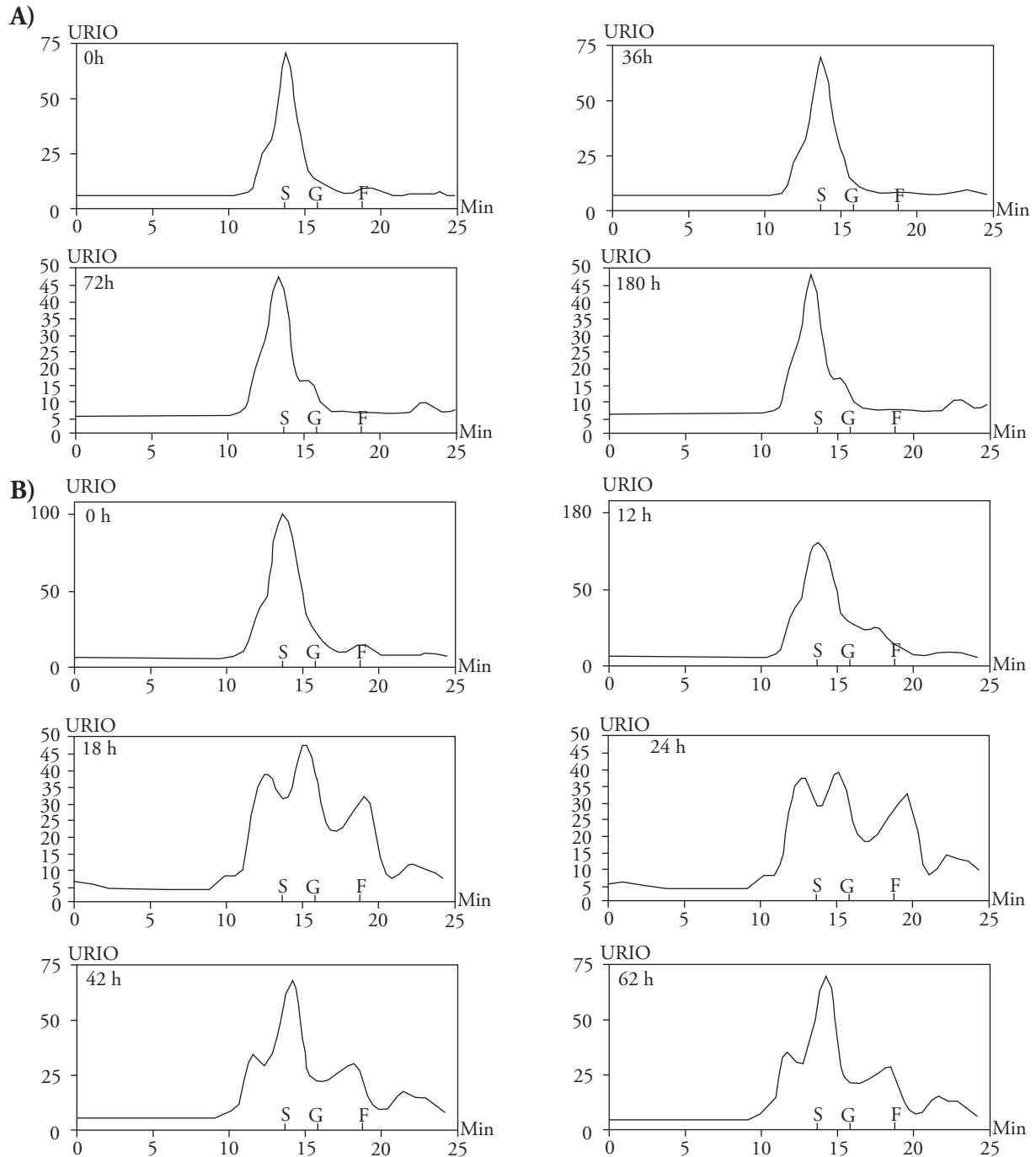
De la prueba de la fermentación de azúcares, se concluyó que, tanto las cepas de *B. licheniformis* adaptadas como las no adaptadas, tienen la capacidad de fermentar glucosa y fructosa. Un análisis de los tres azúcares principales presentes en la melaza (glucosa, fructosa, y sacarosa) se llevó a cabo durante el crecimiento de *B. licheniformis* en diferentes concentraciones de melazas de los lotes al inicio y al final del proceso de adaptación a melazas usando HPLC (Figura 6). Para la cepa no adaptada, las muestras se

**Table 2.** Substrate consumption and biomass yield ( $Y_{x/s}$ ) by the adapted *Bacillus licheniformis* strain in the Mota-Valadez medium with different molasses concentrations.

**Cuadro 2.** Consumo de sustrato y rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) por la cepa adaptada de *Bacillus licheniformis* en el medio Mota-Valadez con diferentes concentraciones de melazas.

Molasses concentration (g L <sup>-1</sup> )	Substrate consumption (%)	$Y_{x/s}$ (ODU <sup>†</sup> mmol <sup>-1</sup> e q of sucrose)
5	80.77 ± 1.21a	0.249 ± 0.006a
8	78.16 ± 1.43a	0.251 ± 0.010a
11	79.22 ± 0.27a	0.250 ± 0.002a
14	73.72 ± 3.53b	0.202 ± 0.003b

<sup>†</sup> Optical density units. Results are expressed as the mean ± the standard deviation of the culture measurements. Different letters indicate significant differences among means (Tukey HSD; p ≤ 0.05) ♦ <sup>†</sup> Unidades de densidad óptica. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de las mediciones del cultivo. Letras diferentes letras indican diferencias estadística entre las medias (Tukey HSD; p ≤ 0.05).



**Figure 6.** HPLC sugar analysis of the *B. licheniformis* molasses growth media (refractive index intensity units *vs.* time). A) Non-adapted strain in 5 g L<sup>-1</sup> of molasses medium at different sampling times. B) Adapted strain with 11 g L<sup>-1</sup> of molasses medium at different sampling times. The retention time of the sugar standards are indicated in the x axis: S, sucrose; G, glucose; F, fructose.

**Figura 6.** Análisis de azúcares por HPLC del medio de cultivo de *B. licheniformis* en melazas (unidades de intensidad del índice de refracción *vs.* tiempo). A) Cepa no adaptada en un medio de 5 g L<sup>-1</sup> de melazas a diferentes tiempos de muestreo. B) Cepa adaptada en un medio de 11 g L<sup>-1</sup> de melazas a diferentes tiempos de muestreo. El tiempo de retención del estándar de los azúcares se indica en el eje horizontal: S, sacarosa; G, glucosa; F, fructosa.

(Figure 3). At the beginning of the adaptation process (Figure 6A), sucrose was the primary sugar and small amounts of glucose and fructose were observed. At 36 h of incubation, fructose and glucose were depleted, while sucrose decreased slightly. At this time, the second growth stage of the culture started (Figure 4A). At 72 h of incubation, sucrose concentration decreased, and glucose accumulated significantly in the medium, while no fructose was detected. After this time, no other changes occurred until the end of the incubation.

The non-adapted *B. licheniformis* cells used fructose as the principal carbon source (Figure 6A). It appears that after the initial fructose depletion, the microorganism promoted the hydrolysis of sucrose to a certain level and consumed only fructose. Fructose utilization by *B. licheniformis* was reported elsewhere for the production of amylase (Aiyer, 2004). Other studies have reported the use of fructose as the main carbon source for fermentations performed by species of the *Bacillus* genus (Cheng *et al.*, 2012; Nishanth *et al.*, 2013; Mishra and Sharma, 2014; Ghosh *et al.*, 2016). Besides, *B. licheniformis* possesses the phosphoenolpyruvate (PEP) dependent sugar phosphotransferase system (PTS) for glucose, fructose and sucrose (Kanehisa *et al.*, 2016). According to Tangney *et al.* (1993), fructose-grown *B. licheniformis* cells had a diminished glucose accumulation rate and did not present PTS: activity in comparison to cells previously grown on glucose. Thus, the assimilation of fructose instead of glucose by the non-adapted cells could be explained considering the regulation of the global metabolic and regulatory networks for both sugars (Buescher *et al.*, 2012).

In the cultures of the adapted strain using 11 g L<sup>-1</sup> molasses (Figure 6B), at 12 h of incubation the sucrose concentration decreased while fructose and glucose slightly increased. At 18 h of incubation, the sucrose concentration further decreased with a major increase in glucose and fructose, which implies that while sucrose was hydrolyzed and part of the glucose was catabolized, the rest accumulated in the medium together with fructose. This sugar consumption occurred during the fast growing stage of the culture from 6 to 18 h (Figure 5); at 24 h of incubation glucose decreased without changes in sucrose and fructose; and from 24 to 42 h of incubation, during the stationary phase (Figure 5), a small reduction in sucrose and fructose occurred

obtuvieron del cultivo inicial de melazas de 5 g L<sup>-1</sup> descrito en la sección experimental.

En el cultivo de 5 g L<sup>-1</sup> de las células en adaptación, se observó un crecimiento diáuxico. Comportamientos similares se observaron en las curvas de crecimiento a concentraciones mayores de melazas (Figura 3). Al principio del proceso de adaptación (Figura 6A), la sacarosa fue el azúcar primario y se observaron pequeñas cantidades de glucosa y fructosa. Después de 36 h de incubación, la fructosa y la glucosa se consumieron, mientras que la sacarosa se vio ligeramente reducida. Fue en ese momento que comenzó la segunda etapa de crecimiento del cultivo (Figura 4A). A las 72 h de incubación, la concentración de sacarosa se redujo y la glucosa se acumuló en el medio de manera considerable, mientras que no se detectó fructosa. Después de ese momento no hubo cambios hasta el final de la incubación.

Las células no adaptadas de *B. licheniformis* utilizaron fructosa como su principal fuente de carbono (Figura 6A). Al parecer, después de la disminución inicial de fructosa, el microorganismo promovió la hidrólisis de sacarosa hasta cierto punto y únicamente consumió fructosa. El consumo de fructosa por *B. licheniformis* se registró en otras investigaciones para la producción de amilasa (Aiyer, 2004). Otros estudios han reportado el consumo de fructosa como la fuente principal de carbono en fermentaciones realizadas por especies del género *Bacillus* (Cheng *et al.*, 2012; Nishanth *et al.*, 2013; Mishra and Sharma, 2014; Ghosh *et al.*, 2016). Asimismo, *B. licheniformis* posee el sistema azúcar fosfotransferasa (SFT) dependiente del fosfoenolpiruvato (FEP) para glucosa, fructosa y sacarosa (Kanehisa *et al.*, 2016). Según Tangney *et al.* (1993), las células de *B. licheniformis* cultivadas en fructosa tuvieron una tasa reducida de acumulación de glucosa y no presentaron actividad de SFT:glucosa en comparación con células previamente cultivadas en glucosa. Por ende, la asimilación de fructosa en lugar de glucosa por las células no adaptadas podría explicarse considerando la regulación de las redes metabólicas y regulatorias para ambos azúcares (Buescher *et al.*, 2012).

En los cultivos de la cepa adaptada con 11 g L<sup>-1</sup> de melazas (Figura 6B), a 12 h de incubación, la concentración de sacarosa se redujo, mientras que se presentó un leve aumento de fructosa y glucosa. A las 18 h de incubación, la concentración de sacarosa se redujo aún más y se presentó un aumento importante

while a considerable glucose accumulation took place. The sugar pattern did not change from 42 to 62 h of the incubation, corresponding to the death phase (Figure 5). From these results, it was evident that after adaptation, during the growing period, *B. licheniformis* catabolized mainly glucose.

Despite the fact that no changes in the glucose and sucrose concentrations were observed after 72 h of incubation, the maximum OD<sub>610</sub> occurred at 132 h of the run, whereas no polymer was produced. The remaining sucrose was not hydrolyzed, probably because the microorganism favored the use of the polymer produced during the initial cell growth stage to reach the maximum biomass concentration (Wang *et al.*, 2016).

The adapted *B. licheniformis* cells were able to improve their hydrolysis capability, achieving greater sucrose consumption as the molasses initial concentration increased. In addition, the adapted microorganism preferred to use glucose instead of fructose as the main carbon source. This may imply that as a consequence of the adaptation process the glucose PTS uptake mechanism was activated.

During cell adaptation, diauxic growth stages were observed for the different molasses concentrations tested. Das Neves *et al.* (2007) reported a diauxic cell growth of *B. atrophaeus* when glucose and casein media were used as carbon sources. A possible explanation for the diauxic growth is that at the beginning of the culture, the cells assimilated the monosaccharides present in the medium, mainly glucose, and fructose. As glucose and fructose were depleted, the cells required to synthesize enzymes for sucrose hydrolysis, thus resulting in the second growth stage (Bailey and Ollis, 1986). In agreement with this hypothesis, the hydrolysis of sucrose, which is the main sugar in cane molasses, corresponded to the highest biomass growth rate for the different molasses concentrations tested.

#### Assessment of the nature of *B. licheniformis* adaptation to molasses

An experiment was performed to have an insight into the nature of *B. licheniformis* adaptation to the molasses medium. Adapted cells were maintained in agar LB and after 3 reculturing cycles, the strain was grown in MV medium with 11 g L<sup>-1</sup> molasses. The molasses cultures presented high OD<sub>610</sub>. The control,

en glucosa y fructosa, lo cual implica que, mientras la sacarosa fue hidrolizada y parte de la glucosa se catabolizó, el resto se acumuló en el medio, junto con la fructosa. Este consumo de azúcares ocurrió durante la etapa de rápido crecimiento del cultivo de 6 a 18 h (Figura 5); tras 24 h de incubación, la glucosa se redujo sin cambios en la sacarosa y fructosa; y de 24 a 42 h de incubación, durante la fase estacionaria (Figura 5), hubo una pequeña reducción de sacarosa y fructosa, mientras que ocurrió una acumulación considerable de glucosa. El patrón de azúcares no cambió entre las 42 y 62 h de incubación, etapa correspondiente a la fase de muerte (Figure 5). A partir de estos resultados resulta evidente que después de la adaptación, durante el periodo de crecimiento *B. licheniformis* catabolizó principalmente glucosa.

A pesar de que no se observaron cambios en las concentraciones de glucosa y sacarosa después de las 72 h de incubación, el OD<sub>610</sub> máximo ocurrió a las 132 h de la corrida, sin que se produjera ningún polímero. La sacarosa restante no se hidrolizó, quizá debido a que el microorganismo favoreció el consumo del polímero producido durante la etapa inicial de crecimiento celular para alcanzar la máxima concentración de biomasa (Wang *et al.*, 2016).

Las células adaptadas de *B. licheniformis* pudieron mejorar su capacidad de hidrólisis, logrando un mayor consumo de sacarosa a medida que la concentración inicial de melazas aumentaba. Además de esto, el microorganismo adaptado prefirió utilizar glucosa en lugar de fructosa como fuente principal de carbono. Esto puede implicar que, como consecuencia del proceso de adaptación, se activó el mecanismo de asimilación glucosa SFT.

Durante la adaptación celular, se observaron etapas de crecimiento diáuxico para las diferentes concentraciones de melazas probadas. Das Neves *et al.* (2007) indicaron un crecimiento celular diáuxico de *B. atrophaeus* cuando los medios de glucosa y caseína se usaron como fuentes de carbono. El crecimiento diáuxico podría deberse a que, al inicio del cultivo, las células asimilaron los monosacáridos presentes en el medio, principalmente glucosa y fructosa. A medida que se iban reduciendo la glucosa y la fructosa, las células tuvieron que sintetizar enzimas para la hidrólisis de sacarosa, lo cual dio como resultado la segunda etapa de crecimiento (Bailey and Ollis, 1986). De acuerdo con esta hipótesis, la hidrólisis de la sacarosa, que es el azúcar principal de las

with no molasses addition, presented remarkably lower  $OD_{610}$  but considerably higher polymer formation in comparison to the molasses culture. The  $OD_{610}$  of the molasses culture was remarkably high: 1/5 diluted  $0.92 \pm 0.08$ . Following growth, the cells were inoculated in LB-CR agar plates and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h. Characteristic *B. licheniformis* colonies were observed for both the molasses and the control cultures and the purity of the strain after the adaptation process was confirmed by ARDRA profiling (Figure 3).

The growth rates of the adapted strain were considerably greater than those of the cells during the adaptation process. Besides, it is remarkable that the adapted strain growth rates increased with molasses concentration following a first order growth kinetics, in contrast to the adapting cultures. The drastic kinetic change appears to be due to the full adaptation of the cells to the high molasses concentration medium. Higher concentrations may be further tested to evaluate if the curve follows a Monod growth kinetics when the Monod constant ( $k_s$ )  $\ll C_{\text{molasses}}$ .

Considering that after storage and three reculturing cycles in solid LB media, the strain was able to grow well in an  $11\text{ g L}^{-1}$  molasses MV medium, the adaptation is believed to be a selective-pressure induced mutation, rather than just a physiological adaptation. When a bacteria population encounters highly stressing conditions which compromise its survival, the cells are capable of adapting to such selective pressure by the modulation of their cellular networks (Behe, 2010; Hottes *et al.*, 2013). The adaptation of *Bacillus* species to stressing conditions such as high acidity was reported by Chen *et al.* (2009), as well as due to salinity, and nutrient limitations (Kohlstedt *et al.*, 2014). To the best of our knowledge, our study is the first report on the adaptation of *B. licheniformis* to sugarcane molasses.

### Bioreactor culture with the adapted strain

At the end of the bioreactor run (38 h), the biomass concentration approximately doubled that of the flask cultures. A lag phase was observed during the first 8 h of the bioreactor run. The fast growth stage followed a logarithmic function:  $OD_{610} = A \ln(t) + B$ , with  $R^2(\text{yy}) = 0.977$ . A linear fit was obtained for the fast growth period to compare the growth rate

melazas de caña de azúcar, correspondió a la mayor tasa de crecimiento de biomasa en las diferentes concentraciones de melazas probadas.

### Evaluación de la naturaleza de la adaptación de *B. licheniformis* a melazas

Un experimento se llevó a cabo para entender la naturaleza de la adaptación de *B. licheniformis* al medio de melazas. Las células adaptadas se mantuvieron en agar LB y después de 3 ciclos de recultivo, la cepa se cultivó en un medio MV con  $11\text{ g L}^{-1}$  de melaza. El cultivo de melazas presentó un alto  $OD_{610}$ . El control, sin melazas añadidas, presentó un  $OD_{610}$  notablemente menor, aunque con una formación de polímeros considerablemente mayor en comparación con el cultivo de melazas. El  $OD_{610}$  del cultivo de melazas resultó notablemente alto:  $0.92 \pm 0.08$  de una dilución 1/5. Después del crecimiento, las células se inocularon en cajas de agar LB-CR e incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Cultivos característicos de *B. licheniformis* se observaron tanto para los cultivos control y los de melazas, y la pureza de la cepa después del proceso de adaptación se confirmó por el análisis de secuencia de bandas ARDRA (Figura 3).

Las tasas de crecimiento de la cepa adaptada fueron considerablemente mayores a las de las células durante el proceso de adaptación. Además de esto, es notable que las tasas de crecimiento de la cepa adaptada aumentaron con la concentración de la melaza siguiendo una cinética de crecimiento del primer orden, en contraste con los cultivos en adaptación. El cambio drástico cinético parece deberse a la adaptación total de las células al medio con concentración alta de melazas. Concentraciones incluso más altas pueden probarse para evaluar si la curva sigue una cinética de crecimiento de Monod cuando, la constante de Monod ( $k_s$ )  $\ll C_{\text{molasses}}$ .

Considerando que después del almacenamiento y tres ciclos de recultivo en un medio LB sólido, la cepa pudo crecer bien en un medio MV con  $11\text{ g L}^{-1}$  de melazas, se cree que la adaptación corresponde a una mutación inducida por presión selectiva, más que solo una respuesta de adaptación fisiológica. Cuando una población de bacterias se enfrenta a condiciones altamente estresantes que comprometen su supervivencia, las células con capaces de adaptarse a tal presión selectiva con la modulación de sus redes celulares (Behe, 2010; Hottes *et al.*, 2013). La

with the flasks experiments. The growth rate of the fast growth stage was  $27.41 \times 10^{-3}$  ODU  $h^{-1}$ , with an  $R^2$  value of 0.957. Sugar consumption during the bioreactor culture was  $88.96 \pm 0.03\%$ . The biomass specific yield ( $Y_{X/S}$ ) was  $0.4910 \pm 0.0001$  ODU  $mmol^{-1}$  eq. sucrose (95% confidence interval).

The use of the bioreactor increased 100% the biomass yield with an  $OD_{610}$  of 0.67, as compared to the flask cultures. Contrary to the flask experiments in which a lag phase was not observed, an 8 h lag phase was evident in the bioreactor culture. It appears that because the inoculating culture was grown on LB broth, the strain had to adjust its enzymatic capabilities for substrate uptake in the bioreactor molasses broth. Hancock *et al.* (2010) and Hornbæk *et al.* (2004) reported a lag phase in the growth of *B. licheniformis* cells at a bioreactor scale. The bioreactor fast growth stage followed a logarithmic function and the maximum growth rate was about 68% greater than that of the 11 g  $L^{-1}$  adapted flasks culture. In addition, the efficiency of substrate utilization improved in the bioreactor culture, with a 100% biomass specific yield increase. This enhancement in the bioreactor performance can be attributed to the strict control of temperature, stirring, and pH during the bioreactor run.

## CONCLUSIONS

A *Bacillus licheniformis* MV1 strain was successfully isolated and identified from a corn crop rhizosphere sample. This microorganism produces an insoluble polymer and is capable of changing its morphology (encysted cells) to survive adverse conditions. Cells of *B. licheniformis* were successfully adapted to an enriched molasses liquid medium, thus preventing the microorganisms to encyst and to produce biopolymers.

Adapted *B. licheniformis* cells improved their hydrolysis capability, achieving greater sucrose consumption as the molasses concentrations in the medium increased. The adapted microorganism switched its metabolism to catabolize glucose instead of fructose as the main carbon source.

The use of a bioreactor for *B. licheniformis* growth increased the biomass yield (100%) and growth rate (68%), as compared to the flask cultures. *B. licheniformis* isolate was successfully adapted to higher concentrations of molasses, which can provide

adaptación de especies de *Bacillus* a condiciones estresantes, como acidez alta, la documentaron Chen *et al.* (2009); así como a salinidad y a limitaciones nutrimentales (Kohlstedt *et al.*, 2014). Hasta donde tenemos conocimiento, nuestro estudio es el primer reporte sobre la adaptación de *B. licheniformis* a melazas de caña de azúcar.

## Cultivo en biorreactor con la cepa adaptada

Al final del proceso en biorreactor (38 h), la concentración de la biomasa casi fue el doble de la obtenida en los cultivos en matraz. Una fase de retardo se observó durante las primeras 8 h del proceso en el biorreactor. La etapa de crecimiento rápido siguió una función logarítmica:  $OD_{610} = A \ln(t) + B$ , con  $R^2(yy) = 0.977$ . Un ajuste lineal se realizó en el periodo de crecimiento rápido para comparar la tasa de crecimiento con los experimentos en matraces. La tasa de crecimiento de la etapa de crecimiento rápido fue de  $27.41 \times 10^{-3}$  ODU  $h^{-1}$ , con un valor de  $R^2$  de 0.957. El consumo de azúcares durante el cultivo en biorreactor fue de  $88.96 \pm 0.03\%$ . El rendimiento específico de biomasa ( $Y_{X/S}$ ) fue de  $0.4910 \pm 0.0001$  ODU  $mmol^{-1}$  eq. sacarosa (intervalo de 95% de confianza).

El uso del biorreactor aumentó el rendimiento de biomasa en 100%, con un  $OD_{610}$  de 0.67, en comparación con los cultivos en matraz. Al contrario de los experimentos en matraces, en los que no se observó una fase de retardo, en el cultivo en biorreactor se observó una fase de retardo de 8 h. Al parecer, debido a que el cultivo inoculante se cultivó en caldo LB, la cepa tuvo que ajustar sus capacidades enzimáticas para asimilar el sustrato presente en el caldo de melazas del biorreactor. Hancock *et al.* (2010) y Hornbæk *et al.* (2004) reportaron una fase de retardo en el crecimiento de células de *B. licheniformis* a nivel biorreactor. La etapa de crecimiento rápido en biorreactor siguió una función logarítmica y la tasa máxima de crecimiento fue aproximadamente 68% mayor que la del cultivo adaptado en matraz de 11 g  $L^{-1}$ . Además de esto, la eficiencia en el consumo del sustrato mejoró en el cultivo en biorreactor, con un aumento del 100% en el rendimiento específico de biomasa. Esta mejoría en el rendimiento en biorreactor puede atribuirse a los controles estrictos de temperatura, agitación y pH que se realizaron durante el proceso en el biorreactor.

a sustainable process that uses locally-available renewable resources for the large-scale production of *B. licheniformis* biofertilizers.

### ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge the financial support of the Fondo Mixto Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) - Estado de Oaxaca (No. 12424) and the Universidad Tecnológica de la Mixteca for performing this work. Mota-Pacheco acknowledges the support of CONACYT scholarship No. 331763 for this research.

### LITERATURE CITED

- Adam, M., H. Heuer, and J. Hallmann. 2014. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS ONE* 9: 1–9.
- Aiyer, P.V.D. 2004. Effect of C : N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African J. Biotechnol.* 3: 519–522.
- Bailey, J. E., and D. F. Ollis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd. edn. Singapore: McGraw-Hill. 984 p.
- Basu, S., R. Rabara, and S. Negi. 2017. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. *Plant Gene* 12: 43–49.
- Behe, M. J. 2010. Experimental evolution, loss-of-function mutations, and the first rule of adaptive evolution. *Q. Rev. Biol.* 85: 419–445.
- Buescher, J. M., W. Liebermeister, M. Jules, M. Uhr, J. Muntel, E. Botella, B. Hessling, *et al.* 2012. Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. *Science* 335: 1099–1103.
- Chen, J. L., M. L. Chiang, and C. C. Chou. 2009. Survival of the acid-adapted *Bacillus cereus* in acidic environments. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 424–428.
- Cheng, S. W., Y. F. Wang, and M. L. Wang. 2012. Statistical optimization of medium compositions for alkaline protease production by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 26: 225–231.
- Chung, S., J. H. Lim, and S. D. Kim. 2010. Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus* strains having *Phytophthora* blight suppression and growth promoting functions. *J. Korean Soc. App. Biol. Chem.* 53: 485–492.
- Das Neves, L. C. M., K. S. de Oliveira, M. J. Kobayashi, T. C. V. Penna, and A. Converti. 2007. Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media. *Appl. Biochem. Biotech.* 137: 539–554.
- Domenech, J., M. S. Reddy, J. W. Kloepper, B. Ramos, and J. Gutierrez-Mañero. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol* 51: 245–258.

### CONCLUSIONES

Una cepa de *Bacillus licheniformis* MV1 se aisló y se identificó exitosamente a partir de una muestra de la rizósfera de un cultivo de maíz. Este microorganismo produce un polímero insoluble y tiene la capacidad de cambiar su morfología (células enquistadas) para sobrevivir a condiciones adversas. Células de *B. licheniformis* se adaptaron con éxito a un medio líquido enriquecido con melazas, previniendo el enquistamiento de los microorganismos y la producción de polímeros.

Las células adaptadas de *B. licheniformis* mejoraron su capacidad de hidrólisis, logrando un mayor consumo de sacarosa a medida que se aumentó la concentración de melazas en el medio. El microorganismo adaptado transformó su metabolismo para catabolizar glucosa en lugar de fructosa como principal fuente de carbono.

El uso de un biorreactor para el crecimiento de *B. licheniformis* aumentó el rendimiento de biomasa (100%) y la tasa de crecimiento (68%), en comparación con los cultivos en matraz. La cepa aislada de *B. licheniformis* se adaptó de manera exitosa a concentraciones mayores de melazas, lo cual puede aportar un proceso sustentable que utiliza recursos renovables disponibles a nivel local para la producción a gran escala de biofertilizantes basados en *B. licheniformis*.

—End of the English version—



- Escalante, A., M. Giles-Gómez, G. Hernández, M. S. Córdova-Aguilar, A. López-Munguía, G. Gosset, and F. Bolívar. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124: 126–134.
- Ghosh, S., U. Mohan, and U. C. Banerjee. 2016. Studies on the production of shikimic acid using the aroK knockout strain of *Bacillus megaterium*. *World J. Microb. Biot.* 32: 1–11.
- Hancocks, N. H., C. R. Thomas, S. M. Stocks, and C. J. Hewitt. 2010. An investigation into the preservation of microbial cell banks for  $\beta$ -amylase production during 5 l fed-batch *Bacillus licheniformis* fermentations. *Biotechnol. Lett.* 32: 1405–1412.
- Hornbæk, T., A. K. Nielsen, J. Dynesen, and M. Jakobsen. 2004. The effect of inoculum age and solid versus liquid propagation on inoculum quality of an industrial *Bacillus licheniformis* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 145–151.

- Hottes, A. K., P. L. Freddolino, A. Khare, Z. N. Donnell, J. C. Liu, and S. Tavazoie. 2013. Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet.* 9: e1003617.
- Jha, C. K., and M. Saraf. 2012. Evaluation of multispecies plant-growth-promoting consortia for the growth promotion of *Jatropha curcas* L. *J. Plant Growth Regul.* 31: 588–598.
- Kanehisa, M., Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, and M. Tanabe. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44: D457–D462.
- Kaynar, P., and Y. Beyatli. 2009. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. isolated from the intestines of various fishes. *Fish. Sci.* 75: 439–443.
- Kohlstedt, M., P. K. Sappa, H. Meyer, S. Maaß, A. Zaprasis, T. Hoffmann, J. Becker, *et al.* 2014. Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: a multi-omics perspective. *Environ. Microbiol.* 16: 1898–1917.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.
- Lim, J. H., and S. D. Kim. 2010. Biocontrol of Phytophthora blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations. *J. Korean Soc. App. Biol. Chem.* 53: 766–773.
- MacFaddin, J. F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd. edn. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. 912 p.
- Maciel Ferraz, H. G., R. Sousa Resende, P. Coutinho Moreira, P. Ricardino Silveira, E. Aparecida Milagres, J. Rogério Oliveira, and F. Ávila Rodrigues. 2015. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. *Bragantia* 74: 417–427.
- Mishra, V. K., and H. Sharma. 2014. Decolourization of textile azo dyes by laccase producing *Bacillus* spp. isolated from soil. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 16: 313–319.
- Nishanth, S. K., B. Nambisan, and C. Mohandas. 2013. Antifungal activity of crude extract produced by *Bacillus* sp. associated with entomopathogenic nematode from media formulated by six nitrogen sources with fructose against *Penicillium expansum*. *Arch. Phytopathology Plant Protect.* 46: 1222–1229.
- Ochoa-Velasco, C. E., R. Valadez-Blanco, R. Salas-Coronado, F. Sustaita-Rivera, B. Hernández-Carlos, S. García-Ortega, and N. F. Santos-Sánchez. 2016. Effect of nitrogen fertilization and *Bacillus licheniformis* biofertilizer addition on the antioxidants compounds and antioxidant activity of greenhouse cultivated tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L. var. Sheva). *Sci. Hortic-Amsterdam* 201: 338–345.
- Plante, A. F. 2007. Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. *In*: Paul, E. A. (ed.). *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. 3rd. edn. Academic Press. Burlington. pp: 389.
- Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990–991.
- Rojas, A., G. Holguin, B. R. Glick, and Y. Bashan. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 181–187.
- Sadasivan, L. and C. A. Neyra. 1987. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.* 169: 1670–1677.
- Tangney, M., F. G. Priest, and W. J. Mitchell. 1993. Two glucose transport systems in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 175: 2137–2142.
- Wang, X., Z. Li, X. Li, H. Qian, X. Cai, X. Li, and J. He. 2016. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism is unrelated to the sporulation and parasporal crystal protein formation in *Bacillus thuringiensis*. *Front. Microbiol.* 7: 836.
- Wrolstad, R. E., T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, D. Smith, and P. Sporns. 2005. *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*. 1st. edn. Wrolstad, R. E., T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, D. Smith, and P. Sporns. (eds.). John Wiley & Sons Inc. New Jersey. 606 p.
- Zhao, S., N. Hu, J. Huang, Y. Liang, and B. Zhao. 2008. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 30: 295–297.

