

14 DISCUSIÓN

Se logró recuperar las cepas de *B.subtilis* con los plásmidos pTrp y pUB110*sspE::vgb* del cepario de la UDLA-P.

La ventaja de trabajar con las cepas en donde dichos plásmidos se encuentran presentes, es principalmente el brindarle a las bacterias las propiedades de poder desarrollarse como si estuviesen en condiciones óptimas, mientras que crecen en medios hipóxicos o cercanos al vacío.

Se observó en trabajos previos que la cepa recuperada de *B.subtilis* pTrp::*vgb* pierde su capacidad para degradar almidón (lo cual se comprobó haciéndola crecer en un medio con almidón), además de que el plásmido se integra a una región específica del cromosoma bacteriano. Al comparar el crecimiento de las cepas con el plásmido pTrp::*vgb* se observa que en la mayoría de las condiciones el crecimiento se ve disminuido a diferencia de las cepas con el plásmido pUB110::*sspE::vgb* y de la silvestre. Las condiciones en la que se observa una reducción considerable de la fase *lag* es la de aerobiosis y microaerofilia, en donde se desarrolla incluso a la par de la cepa que tiene el plásmido de pUB110::*sspE::vgb* y la silvestre. La posible razón por la que pudiese verse retardado el crecimiento de estas cepas es porque el plásmido de pTrp::*vgb* se integra al cromosoma bacteriano, lo que posiblemente pudiera afectar vías metabólicas o alguna etapa indispensable para el desarrollo y adecuación de las bacterias al medio expandiendo la fase *lag* y prolongando el crecimiento exponencial. El aumento en la densidad de cada inóculo en *B.subtilis* con pTrp::*vgb*, reflejó diferencias con respecto al de las otras dos cepas en condiciones carentes de oxígeno. Se observa un retraso y una menor densidad en; anaerobiosis, vacío y anaerobiosis + vacío. Estos resultados reflejaron un antagonismo con lo esperado en la hipótesis en donde la incrustación del gen *vgb* se activa en condiciones de hipoxia y debiese crecer de manera más efectiva con respecto a la cepa silvestre, respuesta que no sucedió. Se estimó el tiempo medio generacional (*g*) y la velocidad de división (*k*) en donde la cepa pTrp::*vgb* fue más lenta, y requirió de más tiempo para dividirse. Se realizó un análisis estadístico para determinar diferencias significativas, lo cual se observó en situaciones anóxicas.

Comparando las cepas de *B.subtilis* con el plásmido pUB110::*sspE::vgb* y la cepa silvestre se observó un crecimiento semejante en la mayoría de las condiciones, sin embargo se desarrollan mejor las cepas con el plásmido multicopia de *vgb*. Aunque se observa que es el último en comenzar el crecimiento exponencial en aerobiosis a partir de la Figura 18 se puede apreciar pendientes similares sin una diferencia significativa lo que indica una velocidad de crecimiento exponencial parecida. La cepa con el plásmido multicopia se desarrolla de manera más efectiva y significativa en la condición de vacío como se observa en la figura 20. En las figuras; 18, 19, 21 y 22 perteneciente a: aerobiosis, microaerofilia, anaerobiosis y anaerobiosis + vacío no se observa un crecimiento significativo con respecto a la cepa salvaje pero sí variantes en la fase *lag* de la cepa con el plásmido pUB110::*sspE::vgb*. Es interesante mencionar que en la condición en anaerobiosis+ vacío aunque la velocidad de crecimiento es parecida en *B.subtilis* con pUB110::*sspE::vgb* y la silvestre, en la figura 22 se refleja un retraso de la cepa con el gen multicopia en la fase *lag*. Se observó crecimiento de las tres cepas en todas las condiciones aunque en tiempos y densidades diferentes. Esto permite suponer y/o inferir que es posible el desarrollo de *B.subtilis* en planetas ó satélites carentes de atmosfera, mientras existan nutrientes indispensables para el crecimiento microbiano en donde al parecer las condiciones no suprimen el crecimiento microbiano.

Como era de esperarse el mayor crecimiento de las tres cepas se vio expresado gráficamente en condiciones donde abunda la concentración de oxígeno (aerobiosis) ya que la cepa se encuentra en óptimas condiciones con los nutrientes necesarios para tener un desarrollo pleno y eficiente. Por otro lado fue en las condiciones de vacío y de anaerobiosis + vacío donde se observó un menor crecimiento reflejado en los valores bajos registrados por el espectrofotómetro (Figura 21 y Figura 22).

Se obtuvieron y compararon las velocidades de división y el tiempo medio generacional de las tres cepas en las diferentes condiciones, además de representarse por medio de gráficas las curvas de crecimiento con fases correspondientes a las que evidencia un típico desarrollo bacteriano, lo que indica que no se afecta de manera radical la producción del VHb en el crecimiento de las cepas de *B.subtilis*.