MEJORAMIENTO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE UN INOCULANTE CON BASE EN BACTERIAS FOSFATO SOLUBILIZADORAS

ELSY CAROLINA PLAZAS ARIZA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al titulo de

Microbióloga Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C.
2007

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

MEJORAMIENTO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION

DE UN INOCULANTE CON BASE EN BACTERIAS FOSFATO

SOLUBILIZADORAS

ELSY CAROLINA PLAZAS ARIZA

APROBADO

_____	_____
Ph.D. RUTH REBECA BONILLA	Ph.D. AURA MARINA PEDROZA
DIRECTORA	CODIRECTORA
_____	_____
Msc. MARIA MERCEDES MARTINEZ	Msc. ADRIANA MATIZ
JURADO	JURADO

MEJORAMIENTO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION

DE UN INOCULANTE CON BASE EN BACTERIAS FOSFATO

SOLUBILIZADORAS

ELSY CAROLINA PLAZAS ARIZA

APROBADO

M. Phil. ANGELA UMAÑA	Msc DAVID GOMEZ
DECANO ACADEMICO	DIRECTOR DE LA CARRERA

DEDICATORIA

A Dios por permitirme dar este paso y a mis Padres por estar siempre a mi lado guiándome y apoyándome.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ruth Bonilla. Laboratorio Microbiología de Suelos CORPOICA Tibaitata

Dra. Aura Marina Pedroza. Pontificia Universidad Javeriana. Por su permanencia, asesoría y comprensión en cada paso del proyecto

Mis Padres por apoyarme cada instante, darme amor y comprensión

Familiares por su preocupación.

Oscar quien es el eslabón, que permitió que no desfalleciera.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 13
INTRODUCCION 15
2. MARCO TEORICO 17
2.1. BACTERIAS FOSFATO SOLUBILIZADORAS (BPS) 17
2.1.1. Mecanismos de transformación del fósforo 18
2.1.1.1. Mineralización de fósforo orgánico 18
2.1.1.2. Solubilización de fósforo 20
2.1.1.3. Inmovilización de fósforo 23
2.1.2. Cuantificación de la actividad enzimática 23
2.2. *Enterobacter agglomerans* 24
2.3. INOCULANTE BIOLÓGICO 25
2.3.1. Características que debe tener un buen inoculante 26
2.3.2. Ventajas que ofrecen los biofertilizantes 26
2.4. MEDIO DE CULTIVO 27
2.4.1. Diseño de un medio de cultivo 28
2.4.1.1. Requerimientos nutricionales 28
2.4.1.2. Disponibilidad de los componentes 30
2.4.1.3. Materias prima fundamentales 31
2.4.1.4. Formulación 32
2.5. PRODUCCION EN CULTIVO DISCONTINUO 32

2.6. BANCO DE CEPAS 32
2.6.1. Método de preservación 34
2.6.1.1. Criopreservación 34
2.7. DISEÑO DE EXPERIMENTOS 39
2.7.1. PLACKETT BURMAN 40
2.7.2. BOX-BEHNKEN 41
3. JUSTIFICACION 44
4. OBJETIVOS 46
4.1. OBJETIVO GENERAL 46
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS 46
5. MATERIALES Y METODOS 47
5.1. MICROORGANISMO UTILIZADO 47
5.2. Estandarización del inóculo para la fermentación discontinua 47
5.2.1. Reactivación en caja 47
5.2.2. Propagación del inóculo 48
5.2.3. Prueba piloto para la realización del banco de cepas criopreservadas en glicerol. 48
5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN 49
5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN 51
5.5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO A ESCALA DE LABORATORIO 52
5.6. PARÁMETROS CINÉTICOS 52
5.6.1. Métodos analíticos realizados en los diseños experimentales y curvas de crecimientos 53
5.6.2. Determinación de biomasa 53
5.6.2. Cuantificación de la actividad enzimática 53
5.6.3. Determinación de pH 54
5.6.4. Determinación de consumo de sustrato 54
5.7. MODELO ESTADÍSTICO 55
6. RESULTADOS Y DISCUSION 56

6.1. Microorganismo 56
6.1. ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO 57
6.2. REALIZACIÓN DEL BANCO PILOTO 58
6.3. ENSAYO PLACKETT BURMAN 61
6.4. BOX-BEHNKEN 67
6.5. CINETICA DE CRECIMIENTO A ESCALA DE LABORATORIO 71
6.6. COSTOS 76
7. CONCLUSIONES 77
RECOMENDACIONES 78
REFERENCIAS 79
ANEXOS 91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acción de las fosfatasas. Tomado de Alexander (1980) 20
Figura 2. Solubilización de fosfatos inorgánicos. Tomado de Useche (2003) 21
Figura 3. Reducción de formas minerales de fosfato férrico. Tomado de Lutz (1990) 22
Figura 4. Reacción del p-nitrofenilfosfato. Tomado de Barragán *et al.*, (2003) 23
Figura 5. *Enterobacter agglomerans*. Tomada por el autor 24
Figura 6. Método de Preservación. Tomado de Monroy y Meza (2002). Modificada por el Autor 34
Figura 7. Tipos de unidades de cristalización. Tomado de Wolstenholme (1970). Modificado por el Autor 35
Figura 8. Glicerol. Tomado de (www.ecosur.net). Modificado por el autor .. 38
Figura 9. Diseño de Box-Behnken para tres factores. Tomado de Montgomery (1991). Modificado por el Autor 42
Figura 10. Macroscópica de *Enterobacter agglomerans* en el medio SMRS1 con purpura de bromocresol. 48 horas de incubación, 32˚C. Tomada por el autor 57
Figura 11. Resultados de la estandarización del inóculo 58
Figura 12. Resultados Banco de Cepas 60

Figura 13. Resultados Plackett Burman. Condiciones del cultivo: Agitación: dada por la matriz, Temperatura: 32˚C Tiempo: 48 horas 65
Figura 14. Resultados Box Behnken. Bajo las condiciones del medio tres. PPC (Promedio Puntos Centrales) 68
Figura 15. Grafica de superficie de Respuesta interacción de Roca fosfórica y Sulfato de amonio 69
Figura 16. Grafica de superficie de Respuesta interacción de Roca fosfórica y Sulfato de Hierro 70
Figura 17. Grafica de superficie de Respuesta interacción de Sulfato de amonio y Sulfato de Hierro 70
Figura 18. Curva de crecimiento medio Tradicionalmente usado en el laboratorio contra Medio Propuesto 71
Figura 19. Medio Tradicional. Biomasa y Actividad Enzimática en función del tiempo 72
Figura 20. Medio Propuesto. Biomasa y Actividad Enzimática en función del tiempo 73
Figura 21. Medio Tradicional. Sustrato residual, pH y Actividad Enzimática en función del tiempo. 75
Figura 22. Medio Propuesto. Sustrato residual, pH y Actividad Enzimática en función del tiempo. 75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz Plackett Burman. Tomado de Montgomery (1991)..... 41
Tabla 2. Diseño de Box-Behnken de tres variables. Tomado de Montgomery (1991) 42
Tabla 3. Diseño Plackett Burman..... 50
Tabla 4. Diseño de Box-Behnken 51
Tabla 5. Resultados Ensayo Experimental Plackett Burman 64
Tabla 6. Composición medio 3..... 66
Tabla 7. Costo. Medio Tradicional 76
Tabla 8. Costo. Medio Propuesto..... 76

RESUMEN

El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas pero de difícil solubilización para estas, siendo una limitante para la producción agropecuaria en suelos tropicales. Es adicionado en muchos cultivos de interés económico por fertilización química en grandes cantidades y solo un porcentaje es asimilado por la planta. Una alternativa es la utilización de inoculantes biológicos que reducen la fertilización fosfórica de síntesis, pero para que estas tecnologías sean adaptadas por los agricultores ofreciendo beneficios como la economía en los productos y su efectividad. *Enterobacter agglomerans* es una bacteria Gram-negativa con capacidad de solubilizar fósforo inorgánico por lo tanto presenta un alto potencial para ser utilizada como biofertilizante pero sus costos de producción son altos, razón por lo cual el objetivo del presente trabajo fue buscar la disminución de los costos en los componentes del medio de cultivo para este microorganismo y la determinación de condiciones óptimas de crecimiento, sin disminuir la efectividad del inoculante. Para esto se utilizó el diseño experimental de Plackett-Burman que seleccionó los factores con mayor significancia para la variable de respuesta (biomasa) y permitió determinar la mejor combinación de todos los factores. La roca fosfórica, el sulfato de amonio y el sulfato de hierro son los factores significativos para la producción de biomasa ($p<0,05$) en el medio 3. Para la optimización del medio propuesto (medio 3), los factores que presentaron significancia fueron evaluados por medio del diseño

experimental Box-Behnken, sin encontrar diferencias significativas entre los factores evaluados. Para verificar la efectividad del medio propuesto, se evaluó la concentración de bacterias y la actividad enzimática, vs el medio tradicionalmente usado en el laboratorio, durante 78 horas con intervalos de cuatro horas para cada muestreo, demostrando que el medio propuesto genera dos unidades Log10 UFC/mL más y reduce el tiempo de producción a 26 horas; frente al medio tradicional.

INTRODUCCION

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos ha afectado notoriamente el equilibrio biogeoquímico del ecosistema suelo, siendo los cultivos los principales afectados, por la disminución o desbalance en la obtención de elementos esenciales para su crecimiento.

Es claro que la interacción existente entre las plantas y los microorganismos benéficos del suelo es sumamente importante, ya que los microorganismos proveen a la planta de elementos que para ella son indispensables y que a veces no puede obtener en las cantidades necesarias por sus propios medios; sin embargo, con el uso de fertilizantes químicos, la microbiota del suelo se ve seriamente afectada y por lo tanto, la productividad de los cultivos se reduce; esto quizás, por las modificaciones fisicoquímicas del suelo como por ejemplo, el pH, la humedad relativa (aW), y la porosidad entre otros.

Para evitar la reducción de la población microbiana benéfica para un cultivo determinado, se ha optado por utilizar fertilizantes biológicos, los cuales de igual forma favorecen el crecimiento vegetal, haciendo accesibles aquellos sustratos no disponibles ni asimilables para la planta como el fósforo o el

nitrógeno, sin alterar los ciclos biogeoquímicos y por lo tanto, favoreciendo la interacción existente entre suelo-planta-microorganismo. De acuerdo con lo anterior, los biofertilizantes pueden definirse como productos biológicos con base en células o metabolitos microbianos que se caracterizan por presentar fácil adaptación a los diferentes tipos de suelo; son de menor costo que los fertilizantes químicos; mantienen el equilibrio de los ciclos biogeoquímicos, no son contaminantes y además promueven una mayor tasa de crecimiento de la planta, reflejando mejores efectos positivos que con la fertilización química.

Sin embargo hoy en día no se obtiene una formula perfecta con la cual se puedan eliminar del todo los fertilizantes químicos, es claro que se debe manejar una mezcla con proporción mayor de fertilización biológica, con una búsqueda de la minimización o eliminación de la fertilización química. Para así reducir costos de producción para los agricultores y a la vez respetar el medio ambiente.

No obstante, a pesar que los biofertilizantes son económicos, existen mecanismos a través de los cuales es posible reducir aún más sus costos de producción, uno de ellos, el medio de cultivo en el cual se promueve el crecimiento del microorganismo, buscando materias prima de bajo costo, que provean mayor o igual efectividad, que los medios normalmente utilizados, sin afectar la producción industrial y de esta forma mejorar el medio de cultivo.

Para alcanzar este objetivo se planteó una metodología a partir de modelos estadísticos que permitiera mejorar el medio de cultivo utilizado comúnmente para la promoción del crecimiento de bacterias fosfato solubilizadoras

SRSM1 reportado por (Sundara Rao y Sinha, 1963) para la producción de un inóculo con base en una bacteria fosfato solubilizadora.

2.MARCO TEORICO

2.1.BACTERIAS FOSFATO SOLUBILIZADORAS (BPS)

El fósforo es uno de los macronutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento biológico, debido a su función en la transferencia y almacenamiento de energía obtenida de la fotosíntesis y del metabolismo de carbohidratos que luego son usados en los procesos de crecimiento y reproducción de la planta, y que está presente en el material genético y bicapas lipídicas a nivel de membrana (Halvin, 1999). Las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) son capaces de aumentar la captación de fósforo por la planta, mejorar el rendimiento de muchas cosechas y cambiar las formas insolubles del fósforo en formas solubles produciendo ácidos orgánicos y enzimas como las fosfatasas. Aunque muchas son las bacterias conocidas por su capacidad de solubilizar fósforo, se reportan algunos hongos con mayor actividad solubilizadora que las bacterias (Gyaneshwar *et al*, 2002).

Dentro de los microorganismos capaces de solubilizar el fósforo se encuentran algunos géneros bacterianos como: *Pseudomonas* spp*., Bacillus* spp*., Rhizobium* spp*., Burkholderia* spp*., Achromobacter* spp*., Agrobacterium*

spp., *Mycobacterium* spp., *Microccocus* spp., *Aereobacter* spp., *Flavobacterium* spp. y *Erwinia* spp., que tienen la capacidad de solubilizar compuestos insolubles de fosfato inorgánico, como; el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica entre otros. Existe una gran variedad de estos microorganismos que incluyen bacterias Gram-negativas y Gram-positivas que poseen la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos e hidrolizar fuentes orgánicas de fósforo insolubles; entre ellos se destacan: *Bacillus licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. atrophaceus, Paenibacillus macerans, Vibrio proteolyticus, Xanthobacter agilis, Enterobacter aerogenes, E. taylorae, E. asburiae, Kluverya cryocrescens, Pseudomonas stutzeri, Chryseomonas luteola, Bacillus circulans, Bacillus brevis, B. megaterium var. phosphaticum, B. polymixa, B. sphaericus, B. thurigensis, Xantomonas maltophilia*, *Pseudomonas aureofaciens, Pseudomonas fluorescens Pseudomonas savastanoi, Agrobacterium radiobacter, Arthrobacter sp. Enterobacter agglomerans*, entre otros (Babenko *et al.,* 1999; Aponte *et al*., 2003).

2.1.1.Mecanismos de transformación del fósforo

2.1.1.1.Mineralización de fósforo orgánico

La mineralización microbiana está fuertemente influenciada por parámetros medioambientales como el pH ligeramente alcalino que favorece esta reacción. La mineralización de la mayoría de los compuestos orgánicos se lleva acabo por la acción de fosfatasas, que catalizan hidrólisis de los enlaces éster y anhídridos de H_3PO_4, estas enzimas son expulsadas fuera de la membrana plasmática, donde son liberadas actuando sobre componentes de alto peso molecular, como el DNA, RNA y ATP (Ohtake *et al.*, 1996); otras enzimas son las fitasas que liberan fosfatos a partir del ácido fítico o sus sales de calcio, magnesio y fitina, extrayendo los fosfatos para producir

penta, tetra, di y monofosfatos y finalmente inositol libre. Las fitasas (myo-inositol hexofosfato hidrolasas) son fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar ácido fítico (myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakisfosfato) para producir ortofosfato inorgánico y una serie de ésteres fosfóricos menores (inositol-penta–a-monofosfato como productos intermediarios) y finalmente para liberar el myo-inositol. Dos fitasas están reconocidas por el IUPAC-IUB (1976): una 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y una 6-fitasa (EC 3.1.3.26), estas enzimas comienzan la defosforilación del myo-inositol en las posiciones 3 y 6 respectivamente. La 3-fitasasa es encontrada en animales y microorganismos mientras la 6-fitasa está presente en las plantas (www.saf-agri.com) .

La clasificación de las fosfatasas se basa en el pH al cual presentan una actividad óptima, diferenciándose dos grupos: Fosfatasas alcalinas que exhiben actividad óptima a pH elevado (8,3 – 9,4) y Fosfatasas ácidas que presentan actividad óptima a pH bajo (4,7 – 5,5). Las fosfatasas ácidas se localizan fundamentalmente en los lisosomas, mientras que la localización subcelular de las fosfatasas alcalinas no está clara (www.e-histologia.unileon.es). Estas enzimas pueden ser sintetizadas, tanto por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasas ácidas (Ridge y Rovira, 1971; Shaykh y Roberts 1974; Dinkelaker y Marschener 1992), como por la flora micótica y las bacterias capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas (Dighton, 1983; Tarafdar y Classen, 1988). El contenido de fósforo orgánico en el suelo, el pH, la aireación y la temperatura incrementan la acción de las enzimas en la mineralización del fósforo orgánico en el suelo (Halvin, 1999). La solubilización de fósforo orgánico ocurre en el suelo a expensas de restos de plantas y animales, que contienen grandes cantidades de este compuesto. La descomposición de la materia orgánica en el suelo se efectúa por la acción de numerosos organismos saprófitos,

liberando como producto el radical ortofosfato desde estructuras unidas al carbono (Figura 1) (McGrath *et al.,* 1998). Estudios como los desarrollados por Gómez (2004) demuestran la existencia de fosfatasas intracelulares y extracelulares, tanto ácidas como alcalinas, producidas por hongos y bacterias. La síntesis de la fosfatasa comienza en el citoplasma, donde se encuentra con un precursor monomérico; del citoplasma es transportada al periplasma donde se dimensiona espontáneamente, dando así una enzima funcional (Bhatti *et al, 2002*).

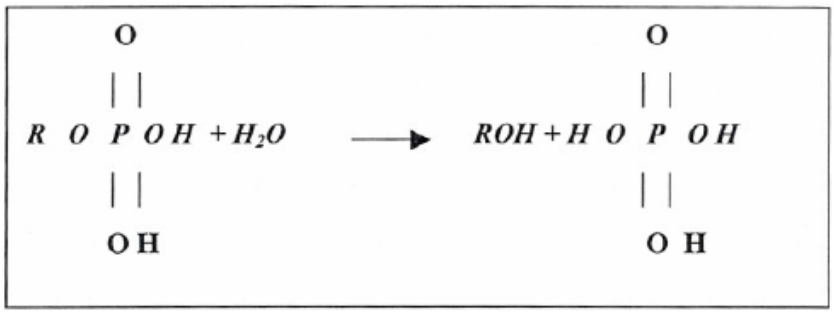

Figura 1. Acción de las fosfatasas. Tomado de Alexander (1980)

2.1.1.2.Solubilización de fósforo

La solubilización ocurre por producción de ácidos orgánicos e inorgánicos; y mecanismos de oxidorreducción. Las cepas de los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Rhizobium* sp. son los microorganismos con mayor poder de solubilización, utilizando la producción de ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización de fosfatos minerales; así como, la acción de fosfatasas ácidas las cuales juegan un papel importante en la mineralización de fósforo en el suelo (Alexander, 1994).

2.1.1.2.1.Producción de ácidos

Los microorganismos fosfato-solubilizadores son capaces de crecer en medios de cultivo con fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) ó minerales insolubles semejantes como única fuente de fosfato. Los microorganismos asimilan el

elemento y hacen soluble una porción que es liberada al medio. El fósforo inorgánico se presenta como compuestos de calcio, aluminio, hierro y puede ser soluble o insoluble. Las formas solubles provienen de la mineralización de la materia orgánica en el suelo o la solubilización de rocas fosfatadas y de los fertilizantes, mientras que, las formas insolubles son dependientes del pH del suelo, ya que a pH bajo es favorecida la formación de fosfatos de hierro, aluminio y manganeso, constituyentes de los minerales arcillosos en suelos ácidos (pH: 3.5 - 5.5), y en suelos alcalinos hay altos contenidos de calcio. La solubilización bacteriana no esta restringida a las sales de calcio, también pueden ser solubilizadas sales de hierro, aluminio, magnesio, manganeso y otros fosfatos. El principal mecanismo bacteriano para la solubilización de fosfatos insolubles es la producción de ácidos orgánicos, estos convierten el $Ca_3(PO_4)_2$ a fosfatos di y monobásicos (Figura 2), generando un aumento en la disponibilidad del elemento para las plantas (Alexander, 1987).

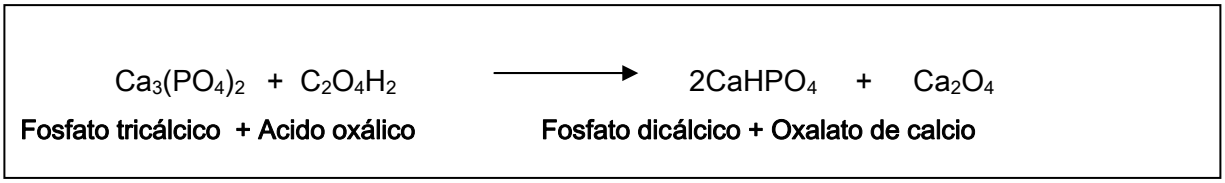

Figura 2. Solubilización de fosfatos inorgánicos. Tomado de Useche (2003)

Estos ácidos orgánicos se producen a partir de la fermentación de la glucosa por la ruta glucolítica originando la acidificación del entorno; como consecuencia el fósforo es liberado desde el fosfato mineral por la sustitución de un protón de Calcio (Alexander, 1987). Los ácidos orgánicos producidos comúnmente por las especies bacterianas incluyen: acido láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético, los cuales son difusibles en el medio.

2.1.1.2.2.Reacción de Óxido reducción

La oxido-reducción de fósforo es otro mecanismo microbiano de transformación; el fósforo se encuentra en estados de oxidación que varían del estado de valencia de la fosfina (-3) al estado oxidado del ortofosfato (+5). Las reacciones de oxidación por los microorganismos se hacen con la utilización del fosfito el cual se oxida en la célula a compuestos orgánicos de fosfato. Las bacterias utilizan preferentemente fosfatos en lugar de fosfito. (Alexander, 1987).

2.1.1.2.3.Producción de Sideróforos

La producción de sideróforos es un mecanismo de solubilización realizada por algunos microorganismos, en el que se quela los elementos que están unidos al fósforo como el hierro, liberando el fosfato. Algunos quelantes como el 2-cetogluconato, citrato, oxalato y lactato forman un complejo con la porción catiónica del fosfato insoluble forzando su disociación (Otalora y Patiño, 2003)

2.1.1.2.4.Reducción de formas minerales de fosfato férrico

En condiciones de anaerobiosis, la producción de sulfuro de hidrogeno (H_2S) reacciona con el fosfato férrico ($FePO_4$) y lo precipita como sulfuro de hierro (FeS) liberando así el fosfato (Figura 3) (Lutz, 1990).

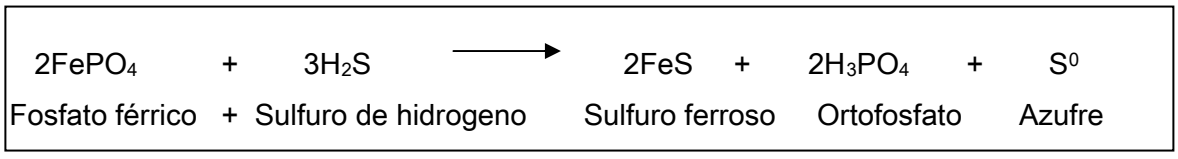

Figura 3. Reducción de formas minerales de fosfato férrico. Tomado de Lutz (1990)

2.1.1.3.Inmovilización de fósforo

La inmovilización es otra transformación microbiana del fósforo, en la cual el P es incorporado en componentes celulares, formando nueva biomasa microbiana, constituyendo ácidos nucleicos, fosfolípidos y otras sustancias protoplasmáticas. El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato como inoculantes incrementa la toma de fósforo por parte de la planta.

2.1.2.Cuantificación de la actividad enzimática

Por medio de esta técnica se busca cuantificar los productos de la hidrólisis que se pueden correlacionar directamente con actividad enzimática (Figura 4). Para esto se utiliza el para-nitrofenil-fosfato, donde la concentración del producto de la hidrólisis (p-nitrofenol) es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa, a partir de esta relación estequiométrica se puede definir que una unidad de fosfatasa es la cantidad de enzima capaz de liberar una micromol (µmol) de p-nitrofenol por minuto por litro bajos las condiciones de la pruebas. El principio de la técnica se basa en el uso de una fracción artificial de p-nitrofenilfosfato (sustrato orgánico) el cual es hidrolizado por fosfatasa del tipo fosfomonoesterasas para obtener ROH y HPO_4 (Vásquez *et al,* 2000).

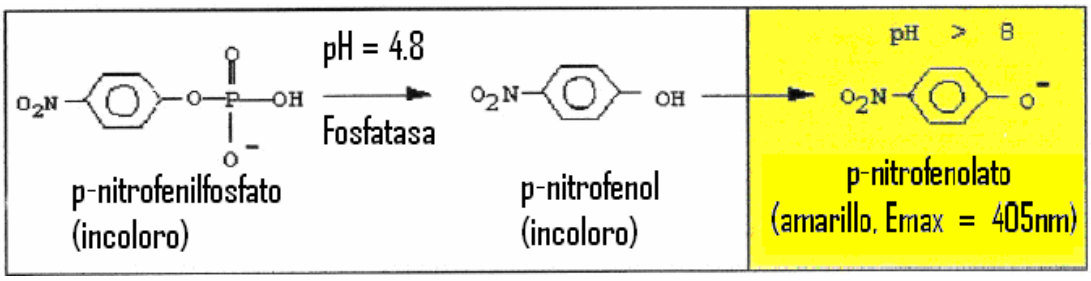

Figura 4. Reacción del p-nitrofenilfosfato. Tomado de Barragán *et al.*, (2003)

2.2. *Enterobacter agglomerans*

Enterobacter agglomerans actualmente *Patoea agglomerans*, es un bacilo Gram-negativo (Figura 5) anaerobio facultativo, de la cual a través de diferentes estudios se han mostrado las numerosas cualidades, no sólo como bacteria fosfato solubilizadora como lo reporta Babenko *et al* (1999) y Useche (2003), si no, como una buena fijadora de nitrógeno por Potrikus *et al.,* (1977) y Min Meng *et al.*, (1995). Este microorganismo es capaz de producir acido oxálico, el cual es el encargado de solubilizar fosfatos inorgánicos insolubles (Sun Suh, 2000). *Enterobacter agglomerans* ha sido utilizado como microorganismo de referencia para la solubilización de fosfatos en estudios que revelan la capacidad de solubilizar fósforo en presencia de elementos como el nitrógeno, hierro, calcio y potasio (Núñez y Vidor, 2001) y de solubilizar fosfatos insolubles como fosfato monocálcico, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato de hierro y fosfato de aluminio con valores de 1367, 1357, 1312, 28 y 19ppm respectivamente en medio MPVK (Hong-Joo *et al.,* 2006).

Figura 5. *Enterobacter agglomerans*. Tomada por el autor

Hong-Joo *et al.,* (2006) han reportado la resistencia de *Enterobacter agglomerans* a rangos de pH de 3 a 11, lo que indica su capacidad de producir fosfatasas ácidas y alcalinas, soportado por lo reportado por Kim *et*

al. (1998), donde concluyen que las que la actividad de las fosfatasas tanto alcalinas como ácidas producidas por *Enterobacter agglomerans* pueden verse inhibidas por concentraciones de fosfatos inorgánicos en el medio. Otros factores como la presencia de fósforo inorgánico (fosfato tricálcico) en el medio de cultivo, también afecta la expresión de la enzima, ya que las fosfatasas son estimuladas cuando el fósforo inorgánico es limitante en el medio de crecimiento (Freitas, 1997).

La capacidad que posee *Enterobacter agglomerans* para ser usado como biofertilizante va desde la adaptación a suelos con pH ácidos o alcalinos (Hong-Joo *et al.,* 2006), la capacidad de colonizar raíces, como lo reportado por Subhash *et al.,* (2001), donde una cepa de *Enterobacter agglomerans* mostró la capacidad de infectar y colonizar raíces de arroz, además producir AIA, también pudo fijar nitrógeno. Conjuntamente a esto se ha demostrado grandes efectos en plantas de trigo como promotor de crecimiento (Da Luz, 2001).

Enterobacter agglomerans es eficiente en la protección contra patógenos como hongos y bacterias en semillas de trigo, y se propone su uso como control biológico para proteger las semillas y así reducir el uso de pesticidas (Da Luz, 2001).

2.3.INOCULANTE BIOLÓGICO

Un inoculante biológico puede ser definido como una preparación de microorganismos que puede sustituir parcial o totalmente la fertilización química. Estos inoculantes microbianos contienen uno o más microorganismos benéficos que se pueden encontrar libres en un caldo de cultivo, en polvo o granulado e inmovilizados en soportes (Vassilev *et al*, 2001). Sin embargo, el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, a través de

la resolución 00375 del 27 de Febrero de 2004, define a un inoculante biológico como un producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que, al aplicarse al suelo o a las semillas, promueve el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera. Incluye entre otros los productos elaborados con micorrizas, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los géneros *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Frankia* sp., *Beijerinckia* sp. y bacterias fosfato solubilizadoras (ICA, 2004).

2.3.1. Características que debe tener un buen inoculante

Un buen inoculante debe aportar aproximadamente 10^6 bacterias vivas por unidad en el momento de la inoculación, no contener contaminantes que pueden dificultar el desarrollo de los microorganismos benéficos o afectar negativamente la planta. Dependiendo de la formulación es importante que el soporte proteja a la bacteria de la desecación (ICA, 2004).

2.3.2. Ventajas que ofrecen los biofertilizantes

Los inoculantes biológicos originan procesos rápidos al ser de origen microbiano, consumen poca energía no renovable y no contaminan el medio ambiente. Pueden llegar a presentar una función defensiva frente a microorganismos fitopatógenos y enriquecen la microflora del suelo con microorganismos más valiosos cualitativamente y de reproducción más enérgica (Tovar y Villamil, 1999).

Poseen mecanismos para la mineralización de la materia orgánica y aceleración del proceso de degradación, favoreciendo la solubilización de nutrientes, pueden acondicionar ó mantener el pH del suelo, con balances en relaciones Calcio/Magnesio/Potasio. Además de mejorar la estructura y

estabilidad de los agregados del suelo, permiten el aumento en los rendimientos y disminución de los niveles de fertilización de síntesis química (Venn *et al.,* 1997) y algunos organismos pueden llegar a sintetizar fitohormonas, por lo cual se clasifican dentro del grupo de organismos promotres del crecimiento vegetal (Salisbury y Ross, 1994).

Los inoculantes líquidos acuosos, por su sistema de fabricación, son perfectamente estériles y muestran una supervivencia superior a un año en el sobre, conservados a temperaturas próximas a los 4º C. Son fáciles de inocular e ideales para utilizar en aquellos sistemas en que se pueda asegurar la aplicación de riego sí ocurre una sequía inmediatamente después de la siembra. Sin embargo, presentan menor resistencia a la desecación que los formulados en turba (ICA, 2004).

2.4. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo es el material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos, así como efectuar pruebas de susceptibilidad (NOM-065-SSA1, 1993).

La preparación de medios de cultivo para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos. Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

Los medios pueden clasificarse, considerando la naturaleza química de los componentes, en 1) medios sintéticos o medios químicamente definidos, y 2) medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen

animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, entre otros, que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable (Estola *et al*., 1994).

2.4.1.Diseño de un medio de cultivo

El diseño de un medio de cultivo para fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas. Otros aspectos que son también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previas y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos, como es el caso de la importancia del anión $P0_4$ (Estola *et al*., 1994).

2.4.1.1.Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del $C0_2$ como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. (Madigan, 1998). Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El oxígeno (0_2) es uno de los oxidantes más comunes en el metabolísmo energético. En la ausencia del 0_2, el $N0_3$ o $S0_4$ son utilizados como aceptores de electrones por algunas bacterias. Las bacterias metanogénicas son auxótrofos anaerobios que utilizan H_2 para reducir el $C0_2$ a CH_4 para obtener energía. Otros protistas obtienen su energía, en condiciones anaerobias por reacción

de óxido-reducción realizadas sobre compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía. (Estola *et al.*, 1994). Otro elemento importante es el nitrógeno elemento esencial utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular.

Sin embargo, los microorganismos varían considerablemente respecto a los nutrientes que pueden necesitar es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes:

→ Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg.

→ Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro.

Factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc. (www.biologia.edu.ar)

El criterio mínimo para la formulación de un medio de cultivo es el de contener todos los elementos necesarios para la producción de biomasa y productos enzimáticos. Adicionalmente es importante manejar esta formulación con las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo. (http://docencia.izt.uam.mx)

El pH del medio influye en el crecimiento microbiano y afecta directamente todos los procesos en los que estén implicadas enzimas, al mismo tiempo la velocidad de crecimiento de las células microbianas depende de la actividad del agua o de la humedad relativa (Harrison y Loveless, 1991)

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de P04 H y S04. El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes. Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato. Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías: a) Los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn b) los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I. En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidos cualitativamente. (Estola *et al.,* 1994)

2.4.1.2.Disponibilidad de los componentes

Aparte de su presencia en el medio de cultivo, los nutrientes deben estar disponibles para ser usados por la célula. Es importante tener en cuenta la disponibilidad correspondiente a iones metálicos cuya concentración es modificada por quelación, ya que muchos constituyentes del medio y

productos del metabolismo actúan como agentes complejantes o precipitantes, por ejemplo aminoácidos, hidroxiácidos, hidróxidos, y los aniones $P0_4$ y $C0_3^{-2}$. (www.biologia.edu.ar)

2.4.1.3.Materias prima fundamentales

Los componentes empleados en la industria de fermentación son generalmente complejos, por tanto es importante tener en cuenta el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Si tenemos en cuenta que el costo de los nutrientes representa entre al 10 y el 60% del costo total de mucho productos obtenidos por fermentación, se hace prioritario disminuir el costo de los medios. Las materias primas más importantes corresponden a fuentes de carbono y de nitrógeno. Las fuentes de carbono pueden ser: Hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina (Estola *et al.*, 1994).

Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica más comunes son el amoníaco o las sales de amonio. Las orgánicas están representadas por varios productos, como ser: Hidrolizados de proteínas (Peptonas), Extracto de carne, Extracto de levadura, Extracto de malta, "Cornsteep" el agua de maceración de la industria del maíz. (Estola *et al.,* 1994)

Es muy importante también la correcta elección de una determinada fuente cuando se presentan varias alternativas posibles. En este sentido deben considerarse los costos, la disponibilidad y el problema de impurezas que puede acompañar a las distintas materias primas utilizadas.

2.4.1.4.Formulación

La formulación tiene que ver con los aspectos cuantitativos de los medios, es decir debe establecer las concentraciones de cada componente a ser utilizadas.

Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes lo da el conocimiento de la composición de biomasa del microorganismo a ser empleado. Una composición elemental y típica de la biomasa es (porcentaje de peso seco): Carbono, 46-48; Nitrógeno, 7-12; Fósforo, 1-3; Azufre, 0.5-1.0; Mg, 0.5-1%. Es decir, que si queremos formular un medio para producir una determinada cantidad de biomasa debemos promover las distintas fuentes que aseguren como mínimo las cantidades de elementos que deben ser suministrados. (www.biologia.edu.ar)

2.5.PRODUCCION EN CULTIVO DISCONTINUO

La duración del cultivo batch o discontinuo está, por supuesto, también limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo y del sustrato limitante para la fermentación. Una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el batch. El cultivo tipo "batch", si bien es quizás el más difundido aunque es el que menos posibilidades de control ofrece. Una vez sembrado el medio de cultivo y fijada la temperatura, las células quedan a su propia potencialidad, que se manifiesta creciendo a la máxima velocidad que le permite el medio de cultivo empleado, siendo el operador solo espectador de los acontecimientos (Estola *et al.,* 1994).

2.6.BANCO DE CEPAS

Actualmente la mayoría de los laboratorios de microbiología cuenta con una colección de microorganismos y la necesidad de su conservación para

posteriores y variados usos es fundamental. Un lugar que reserve una cantidad de cepas codificadas y debidamente almacenadas para su conservación, genera las siguientes responsabilidades.

- Mantenimiento de una gran cantidad de especies y cepas.
- Incorporación a la colección de nuevas especies de valor industrial o investigativo, junto con la información apropiada de sus características taxonómicas y bioquímicas.
- Mantenimiento de los microorganismos en las mejores condiciones posibles (medio, luz, temperatura, entre otros).
- Llevar registros detallados de los datos concernientes a las cepas y especies recibidas y disponer de los mismos cuando sean requeridos.
- Chequeo de pureza previo a cualquier despacho.
- Edición de un catálogo que contenga una corta y clara información perteneciente a cada cepa, disponible para permitir la distribución, junto con la renovación periódica de los datos.

Las colecciones de servicio tienen dos objetivos básicos: preservación de especies de valor preciado y la distribución de ellas; con lo que se trata de asegurar la existencia continua de microorganismos que son de importancia para la ciencia y la industria (Arévalo *et al.,* 1993).

Las bacterias son un amplio grupo de microorganismos, por lo tanto es importante manejar condiciones optimas de pH, medio de cultivo, temperatura de incubación, dependiendo del microorganismo a utilizar. Es importante conservarlos entre el final de la fase logarítmica y el comienzo de la fase estacionaria. (Kirsop y Snell, 1984; Khursheed, 1989)

2.6.1.Método de preservación

Las características que definen la escogencia del método de preservación (Figura 6) son de vital importancia para la elaboración de un banco de cepas.

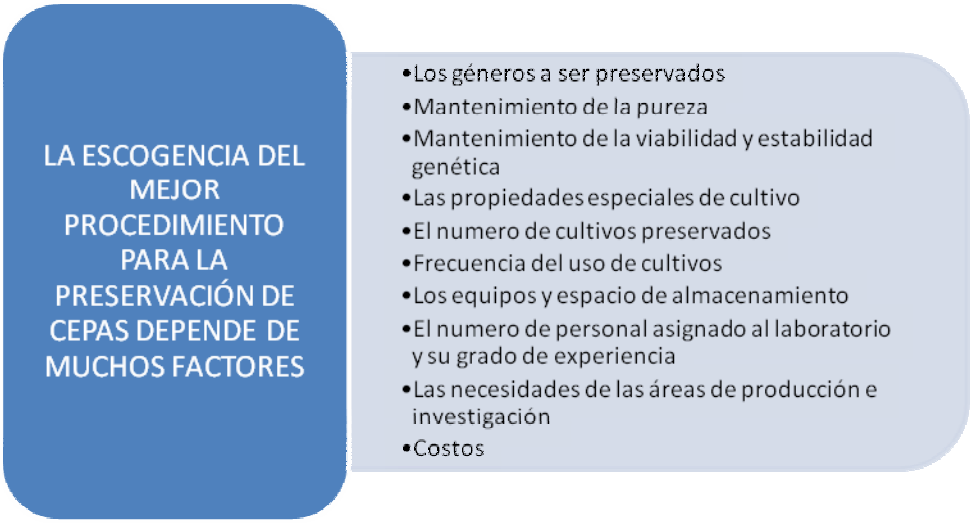

Figura 6. Método de Preservación. Tomado de Monroy y Meza (2002). Modificada por el Autor

2.6.1.1.Criopreservación

Es el congelamiento y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas en donde el agua es uno de los mayores componentes de la célula viva y es remplazado por hielo durante el proceso. En el descongelamiento el material congelado retorna a su estado líquido (Monroy y Meza, 2002).

La posibilidad de congelar las células facilita la estabilidad del material vivo durante largos periodos de tiempo. Cuando una suspensión se congela el agua es convertida en hielo. Este proceso es iniciado a una temperatura inferior a los cero grados centígrados pero la temperatura real del congelamiento depende de las características congelantes de la suspensión, dicha temperatura puede disminuir por la adición de sustancias a la suspensión como los crioprotectores (Simione y Brown, 1991).

Los cambios a consecuencia del proceso de congelamiento pueden afectar la célula abruptamente. Siendo estos cambios físicos o biológicos y producidos en el congelamiento o en el descongelamiento. Durante el congelamiento es importante tener en cuenta: el tipo de unidades de cristalización desarrolladas, la cantidad de hielo formado, y la configuración y distribución relativa de las fases amorfa y cristalina (Luyet, 1970; Monroy y Meza, 2002).

2.6.1.1.1.Tipo de unidades de cristalización desarrolladas

La combinación de las bajas temperaturas, la tasa de congelamiento, la naturaleza y concentración de los solutos establece el tipo de formación de hielo a formar (Figura7) clasificados en: sólidos compactos sin ángulos (Figura7a), formas de arborescencia como: preservación hexagonal: cuando la tasa de congelamiento es baja (Figura7b), arborescentes irregulares: congelamiento rápido (Figura7c), esferales: congelamiento muy rápido (Figura7d) (Wolstenholme, y O'connor, 1970; Monroy y Meza, 2002).

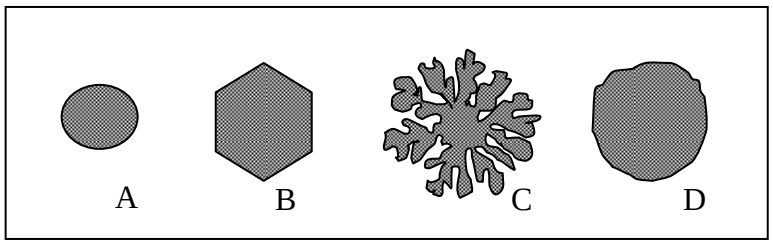

Figura 7. Tipos de unidades de cristalización. Tomado de Wolstenholme (1970). Modificado por el Autor

2.6.1.1.2.Cantidad de hielo formado

En una suspensión celular, las primeras formas de hielo provocan un incremento en las concentraciones de solutos en el exterior de las células. Debido a la diferencia en presión osmótica, el agua sale de la célula generando un desbalance en la concentración de sales, en este proceso

están involucradas directamente la tasa de congelamiento y la permeabilidad celular. Al aumentarse la concentración de solutos dentro de la célula esta podría ser dañada por una diferencia osmótica (Simione y Brown, 1991).

Caso contrario, si la concentración de agua al interior de la célula es alta, puede causar daño celular por la formación de cristales de hielo en el interior. Este delicado balance involucra la tasa de congelamiento y la velocidad de descongelación. Entre más rápido sea mejores resultados son obtenidos (Simione y Brown, 1991).

2.6.1.1.3.Velocidad de congelamiento

La velocidad de congelamiento o también llamada velocidad de formación de hielo, influye directamente en la formación y tamaño de los cristales y a su vez sobre las células durante el congelamiento. Cuando la tasa de congelamiento es rápida habrá más hielo intracelular y menor será el desbalance osmótico. Cuando la tasa de congelación es lenta, el hielo intracelular es menor y mayor es el desbalance osmótico (NUNC Cryopreservation Manual, 2002). Así, un congelamiento rápido minimiza los efectos de la concentración de solutos con una formación uniforme de hielo, pero se producirá una formación interna de hielo. El uso de aditivos crioprotectores resguarda la célula durante estos procesos y de igual manera minimiza los efectos perjudiciales de un incremento en la concentración de solutos y la formación de hielo. (Kirsop *et al,* 1984; Simione y Brown, 1991; Hunter-Cevera *et a.,* 1996; NUNC Cryopreservation Manual, 2002).

2.6.1.1.4.Consecuencias del congelamiento en células

Las temperaturas de congelamiento desarrollan algunos cambios en la célula como: exosmosis, la cual es definida como el incremento de la solubilidad de gases (el gas soluble contenido aumenta resultado en la formación de

burbujas de gas); deshidratación; incremento en la concentración de electrolitos, coloides, sales, carbohidratos, lípidos y proteínas; disminución del pH; cambios en la temperatura y conductividad eléctrica; disminución en la actividad de algunas enzimas; incremento en la actividad de algunas enzimas; acumulación de intermediarios metabólicos; reducción del espacio intermolecular; incremento del contacto intermolecular; disrupción de puentes de hidrogeno débiles; anomalías en las soluciones; plegamiento y distorsión de moléculas largas; perdida de la integridad de la membrana celular; invasión a la célula de sales toxicas y mutagénicas; concentración eutéctica de todas las soluciones; solidificación e inmovilización de todas las moléculas y aumento de la viscosidad (Monroy y Meza, 2002).

La formación de cristales producidos dentro de la célula puede causar la aparición de aberturas en la membrana plasmática, esto podría explicar la necesidad de un congelamiento rápido para que no se produzcan cristales intracelularmente y un descongelamiento rápido que prevenga el crecimiento de los cristales existentes (Levitt y Dear1970; Monroy y Meza, 2002).

2.6.1.1.5.Glicerol como agente crioprotector

Sustancias como el glicerol (Figura 8) y el dimetilsulfóxido, tienen la propiedad de ser agentes crioprotectores que pueden penetrar la célula por medio de la membrana celular, siendo osmóticamente indiferentes a ella (Monroy y Meza, 2002).

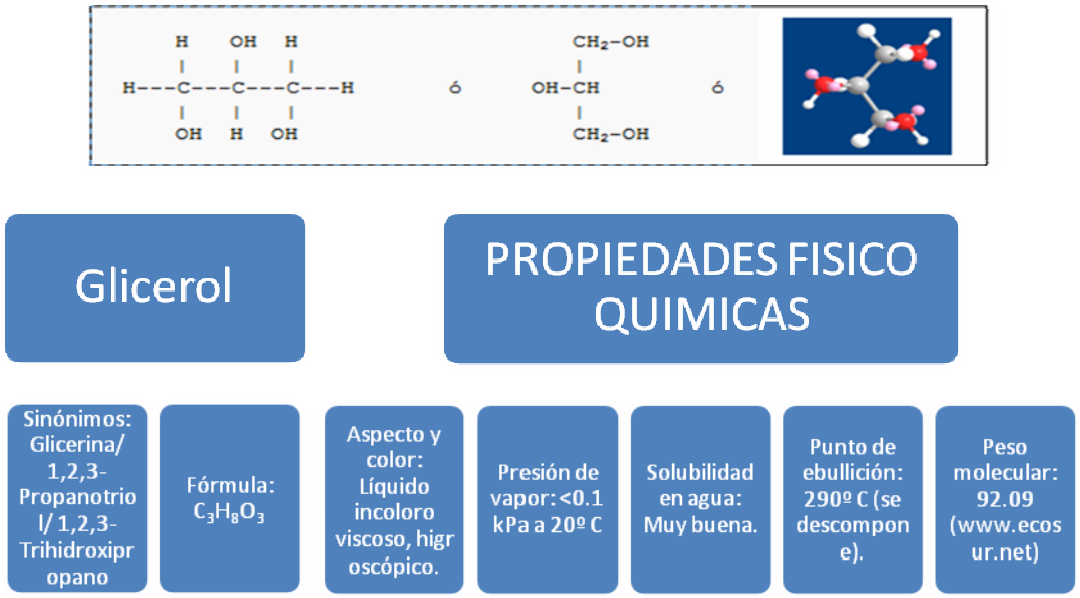

Figura 8. Glicerol. Tomado de (www.ecosur.net). Modificado por el autor

Por consiguiente pueden estar presentes en concentraciones considerablemente altas sin alterar el volumen celular. Sin embargo, cuando la concentración total de soluto aumenta por adición del agente crioprotector, es posible disminuir la formación de hielo a cualquier temperatura de congelamiento. Esto podría reducir osmóticamente la actividad de los constituyentes originales presentes en concentraciones isotónicas. El agente protector penetra la membrana celular con suficiente libertad para permanecer en la célula y no afectarla osmóticamente además de actuar como barrera entre las proteínas previniendo la formación de uniones S-S intermolecularmente, sin que la concentración requerida sea toxica para ella (Meryman, 1970).

Estos aditivos protegen la célula reduciendo la concentración de electrolitos en la solución residual congelada alrededor de esta y a cualquier temperatura para proteger el interior siempre y cuando el aditivo sea permeable (Monroy y Meza, 2002). Algunos microorganismos sujetos a

condiciones de baja actividad de agua solo pueden obtener agua para llevar a cabo sus reacciones metabólicas aumentando su concentración interna de solutos, esto puede llevarse a cabo por el bombeo de iones hacia el interior celular o sintetizando o concentrando un soluto orgánico. Estos solutos que se acumulan en el citoplasma para ajustar la actividad del agua no deben inhibir la bioquímica celular y son denominados solutos compatibles (Madigan *et al.,* 1998). Un ejemplo de ellos es el glicerol (Monroy y Meza, 2002). Estudios realizados por Yeagle (1992) sobre la entrada del glicerol a las bacterias como *E.coli* por difusión facilitada a través de poros transmembranales hidrofílicos no estereoespecíficos de un diámetro igual o cercano a 0,4 nm.

2.7.DISEÑO DE EXPERIMENTOS

No existen suficientes reportes ó información que definan los factores que aumentan la productividad y rentabilidad de un medio de cultivo para bacterias fosfato solubilizadoras.

Por tanto los diseños experimentales y la estadística dan un acercamiento a la necesidad de obtener conclusiones validas y objetivas a pesar de la influencia de muchas variables y de los errores experimentales. Una clásica optimización es conducida por la variación de un factor independiente mientras se generaban y aguardaban las demás constantes. Este procedimiento consumía tiempo y era incapaz de arrojar una verdadera optimización por la baja interacción de variables independientes (Hyun-Woo*et al,* 2007).

Convencionalmente la optimización de un medio de cultivo se realizaba con métodos de una variable en un tiempo. Con varias variables, pero solo una era mantenida en un nivel constante donde solo el nivel óptimo de la variable a prueba es determinado (Hyun-Woo*et al,* 2007). Aunque este método es

sencillo, es laborioso y consume tiempo cuando existen muchos factores a ser determinados. Además funciona siempre y cuando exista una interacción entre variables.

Una metodología de superficie de respuesta (RSM) es un enfoque matemático eficiente y poderoso aplicado en la optimización de medios y procesos de fermentación como lo reportado por Adinarayana y Ellaiah (2002); Park *et al,* (2002); Suamant *et al,* (2002) sobre producción de enzimas y Lhomme y Roux (1991) para la producción de biomasa. Dando información acerca de la interacción entre variables necesaria para la optimización del diseño y el proceso, y dar múltiples respuestas al mismo tiempo (Xin Chen *et al,* 2005). La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una técnica estadística eficiente para la optimización de múltiples variables de predecir las mejores condiciones del desempeño con un número mínimo de experimentos (Gouda *et al,* 2001).

2.7.1.PLACKETT BURMAN

Este diseño atribuido a Plackett y Burman (1946), consiste en diseños factoriales fraccionarios de dos niveles, utilizados para utilizar K = N-1 variables en N ensayos, donde N es múltiplo de 4, es decir, son útiles cuando N = 12, 20, 24, 28, 36. Se obtienen escribiendo el renglón apropiado en forma de columna, Cuando N = 12 (+,+,-,+,+,+,-,-,-,+,-,-). Una segunda columna se genera a partir de la primera moviendo los elementos de la columna un renglón hacia abajo y colocando el ultimo elemento en la primera posición. Similarmente se genera una tercera columna a partir de la segunda. Este procedimiento continua hasta que se genera la columna K (Tabla 1). En el diseño de 12 corridas o ensayos cada efecto principal tiene como alias parcial toda interacción AB tiene como alias los nueve efectos principales C,

D,… K. Además, cada efecto principal tiene como alias parciales 45 interacciones bifactoriales (Montgomery, 1991).

Tabla 1. Matriz Plackett Burman. Tomado de Montgomery (1991)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.7.2. BOX-BEHNKEN

Box y Behnken (1960) han propuesto algunos diseños de tres niveles para ajustar superficies de respuesta (Tabla 2). Estos diseños se forman combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser más eficientes en términos del número de corridas o ensayos requerido, y son rotatorios.

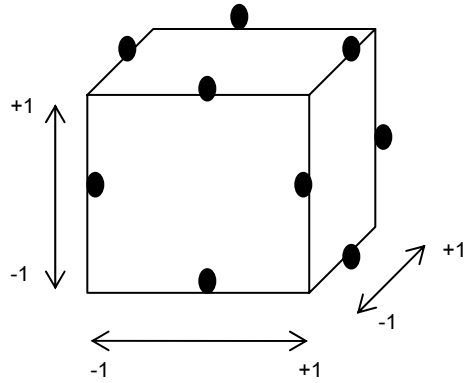

Figura 9. Diseño de Box-Behnken para tres factores. Tomado de Montgomery (1991). Modificado por el Autor

Un diseño de tres variables es representado en la figura 9. Observándose que el diseño no contiene puntos en los vértices de la región cúbica creada por los límites superior e inferior para cada variable. Esto podría ser ventajoso cuando los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones factor-nivel que son prohibidamente costosas o imposibles de probar debido a restricciones físicas del proceso (Montgomery, 1991).

Tabla 2. Diseño de Box-Behnken de tres variables. Tomado de Montgomery (1991)

ENSAYO	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1

13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3.JUSTIFICACION

Los elementos más limitantes para el crecimiento de las plantas en suelos tropicales son el nitrógeno y el fósforo, demandando grandes cantidades de fertilizantes de síntesis química; por esta razón la alternativa de utilización de inoculantes biológicos ha generado una opción ecológica y viable para la producción de cultivos de interés económico. La utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno y fosfato solubilizadoras conocidas mundialmente por sus beneficios como biofertilizantes es importante, teniendo en cuenta que el nitrógeno y el fósforo son elementos esenciales en el crecimiento de cualquier planta y microorganismo. Con la incorporación de este tipo de bioinsumos en el suelo se beneficia la interacción microorganismo-suelo-planta mediante el incremento de nitrógeno y fósforo asimilable. De otra parte, estos microorganismos, poseen un valor agregado como es la inducción a la producción de hormonas de crecimiento o de sustancias bactericidas, fungicidas e incluso nematocidas e insecticidas, dependiendo de la especie bacteriana.

El uso de tecnologías limpias como las antes mencionadas disminuyen los efectos ambientales, económicos y sociales de la producción agropecuaria. Por ello, el uso de técnicas o mecanismos que permitan la producción de estos insumos biológicos a bajo costo es imperativo. La investigación que conlleva al desarrollo de tecnologías que permitan el escalamiento de los productos biológicos a bajo costo es indispensable, más aún si el nicho de mercado demandante son agricultores que por sus ingresos no pueden utilizar insumos costoso.

La disminución de costos en un proceso de producción es clave para la elaboración y comercialización de cualquier tipo de producto que quiera estar en el mercado; más aún si este tiene como nicho de mercado un sector de la sociedad como el campesino, con dificultades económicas para acceder a tecnologías de producción costosa. Por esto, la utilización de sustratos de bajo costo sin afectar la eficacia del inoculante es esencial.

Es importante recalcar la labor de investigación para generar nuevos proyectos que disminuyan el valor del proceso industrial ó que aumenten los beneficios de los inoculantes, para que sean mejores y más accesibles a los agricultores, tecnologías que sean llevadas a los productores con valores económicos.

4.OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Producir a escala de laboratorio un inóculo con base en una bacteria fosfato solubilizadora en un medio de cultivo mejorado.

4.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar un protocolo para la producción del inóculo con base en *Enterobacter agglomerans* en medio de cultivo líquido y elaborar el banco de cepas primario y de trabajo.

- Seleccionar los factores asociados a nutrientes, aireación y porcentaje de inóculo que favorecen la producción de biomasa y enzimas por medio del diseño experimental Plackett-Burman.

- Optimizar el medio de cultivo que tuvo mejores resultados en el diseño experimental Plackett-Burman mediante el diseño experimental Box-Behnken empleando materias primas de bajo costo.

- Realizar curvas de crecimiento a escala de laboratorio empleando el medio de cultivo mejorado y comparar con el medio de cultivo de referencia.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1.MICROORGANISMO UTILIZADO

La cepa escogida para el presente proyecto hace parte de la colección de CORPOICA obtenida por Caballero y Camelo (2006), quienes la reportan como la bacteria con mayor capacidad de solubilización de fósforo proveniente de roca fosfórica (20%P_2 O_5) con halos de solubilización mayores de 5mm en el medio SMRS1; fue aislada de muestras de suelos tomadas en el municipio Agustín Codazzi (Cesar) ubicado en la zona Caribe Colombiana, con pH de 7,06. El microorganismo fue identificado como *Enterobacter agglomerans,* para lo cual se utilizó el set de identificación bioquímica BBL Cristal®, donde el software arrojo un porcentaje de confianza del 100%.

5.2.Estandarización del inóculo para la fermentación discontinua

5.2.1.Reactivación en caja

A partir de un vial de *Enterobacter agglomerans* obtenido de la colección de bacterias fosfato solubilizadoras, de CORPOICA se procedió a realizar una siembra masiva ó por agotamiento en el medio de cultivo agarizado

específico para bacterias fosfato solubilizadoras (SMRS1), incubándolo durante 48 horas a 32℃.

5.2.2.Propagación del inóculo

Se realizó una suspensión celular en solución salina (NaCl) al 0.85% (p/v) correspondiente al tubo 5 del patrón Mc Farland, que fue confirmado por medio de espectrofotometría con blanco de agua destilada a 540 nm y por medio de diluciones seriadas y recuento en placa, para verificar su concentración en términos de UFC/mL de suspensión, el cual fue realizado por triplicado en 3 momentos diferentes en el tiempo con intervalos de un día. Posterior al procedimiento descrito anteriormente se preparó un inóculo con 10% de la suspensión anterior y 90% del medio de cultivo estéril (SMRS1) y fue incubado a 32℃, 120 rpm, por 48 horas (Bonilla, 2007). Terminado este tiempo se realizaron diluciones seriadas y recuento en placa para verificar su concentración en términos de UFC/mL de inóculo. Cada determinación fue realizada por triplicado, en momentos diferentes en el tiempo con intervalos de un día para verificar su reproducibilidad. Para confirmar si el protocolo de preparación de la suspensión y propagación del inóculo es reproducible se llevó a cabo una comparación de medias con el programa estadístico SAS 9.0.

5.2.3.Prueba piloto para la realización del banco de cepas criopreservadas en glicerol.

A partir de una suspensión celular en solución salina (NaCl) al 0.85% (p/v) correspondiente al tubo 5 del patrón Mc Farland llevada a un cultivo por 48 horas, a 32˚C y 120 rpm se realizó una mezcla en una proporción de 70:30% (v/v) respecto al inóculo y el glicerol (previa esterilización). Posteriormente se

realizaron 50 viales que se mantuvieron a -20℃. Se verificó su concentración por medio de un recuento en placa al tiempo cero, a la media hora (mezcla sin refrigerar), 24 y 48 horas, 8 y 16 días, a razón de 4 viales por muestreo, teniendo en cuenta la siguiente formula:

$$0.4\sqrt{N} \quad [1]$$

Donde N es el número de viales contenidos en el banco. La anterior metodología fue realizada por triplicado en 3 momentos diferentes en el tiempo con intervalos de un día. Los viales se almacenaron para ser utilizados como banco piloto y banco de trabajo para el desarrollo de la investigación.

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN

Plackett–Burman, se considera una técnica eficiente para la optimización de los componentes de un medio. Este diseño estadístico se utilizó con el objetivo de discernir el efecto de varios componentes del medio así como los factores ambientales del proceso. El diseño de Plackett-Burman (Montgomery, 2003), es un método estadístico que contempla dos niveles de selección para cada variable, un nivel bajo (-1) y un nivel alto (+1). La tabla 4 muestra los factores estudiados y los niveles de cada factor usados en el diseño experimental. El diseño experimental está basado en un modelo de primer orden:

$$Y = \beta o + \Sigma \beta i \, Xi \quad [2]$$

Donde Y es la respuesta (biomasa o actividad fosfatasa), βo es el intercepto del modelo y βi es el coeficiente estimado para cada variable o factor Xi.

Se evaluaron 11 factores a dos niveles de variación alto (+1) y bajo (-1) (Tabla 3). Se emplearon Erlenmeyer de 50 mL con 8mL o 9mL de medio dependiendo del tratamiento, con un pH de 7.2 ± 0.2, y una temperatura de 32°C, siendo el experimento realizado por triplicado. Adicional a 12 tratamientos se implementaron los siguientes 2 controles: C1, consistente en el medio actualmente usado en el laboratorio (grado químico) y C2; correspondiente al medio modificado (grado comercial). Los factores evaluados fueron: Sacarosa, Nitrógeno Orgánico, roca fosfórica, Sulfato de Amonio, Cloruro de Potasio, Sulfato de Magnesio, Sulfato de Manganeso, Sulfato de Hierro, Cloruro de Sodio, Porcentaje de inóculo y Velocidad de Agitación. Las variables de respuesta estimadas fueron: viabilidad en UFC (log 10), actividad enzimática (UP/L/min) y se determinó el sustrato residual.

Tabla 3. Diseño Plackett Burman

FACTOR	CLAVE	NIVEL BAJO (-)	NIVEL ALTO (+)
Sacarosa	A	5 g/L	15 g/L
Levadura	B	1 g/L	2 g/L
Roca fosfórica	C	1 g/L	10 g/L
Sulfato de Amonio	D	0,01 g/L	1 g/L
Cloruro de Potasio	E	0,01 g/L	0,4 g/L
Sulfato de Magnesio	F	0,01 g/L	0,6 g/L
Sulfato de Manganeso	G	0,0001 g/L	0,008 g/L
Sulfato de Hierro	H	0,0001 g/L	0,004 g/L
Cloruro de Sodio	I	0,01 g/L	0,4 g/L
% Inóculo (v/v)	J	5%	20%
Vel agitación	K	20 rpm	240 rpm

Fuente: El autor

5.4.DISEÑO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN

Teniendo en cuenta los factores significativos en el diseño experimental Plackett Burman, se llevo a cabo el diseño de optimización, utilizando un nivel alto y otro bajo de cada uno de ellos (Tabla 4) con el propósito de visualizar la superficie de respuesta. Como punto central se utilizó el medio en el cual se alcanzó la mejor respuesta del Plackett Burman. Los demás componentes y condiciones se dejaron fijas de acuerdo al mismo tratamiento.

Tabla 4. Diseño de Box-Behnken

FACTOR	CLAVE	NIVEL BAJO (-1)	NIVEL MEDIO (0)	NIVEL ALTO (+1)
Roca fosfórica	X_1	5 g/L	10 g/L	15 g/L
Sulfato de Amonio	X_2	0,005 g/L	0,01 g/L	0,015 g/L
Sulfato de Hierro	X_3	0,00005 g/L	0,0001 g/L	0,00015 g/L

Fuente: El autor

Para lograr la optimización del medio de cultivo, se utilizó la metodología planteada por Box & Behnken (1960), en donde las ecuaciones 3 y 4 permitieron evidenciar los factores que presentan un valor de significancia para las variables de respuesta viabilidad y actividad enzimática. Adicional a esto se determinó el sustrato residual. En este ensayo se realizaron tres replicas.

$$Y= \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 \quad [3]$$

Donde Y es la respuesta (biomasa o actividad fosfatasa), β_0 es el intercepto del modelo y β_1, β_2, β_3 es el coeficiente estimado para cada factor.

$$Y= \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad [4]$$

Dónde Y es la viabilidad, β_0 el intercepto, β_1, β_2, β_3 son coeficientes lineales, β_{12}, β_{13}, β_{23} son coeficientes recíprocos, β_{11}, β_{22}, β_{33} son coeficientes cuadráticos y X_1, X_2 y X_3 son codificados como las variables independientes.

5.5.CINÉTICA DE CRECIMIENTO A ESCALA DE LABORATORIO

Para evaluar la cinética de crecimiento de *Enterobacter agglomerans* se utilizó el medio que se usa tradicionalmente en el laboratorio y se comparó con el medio propuesto; en un erlenmeyer de 3 L de capacidad total con un volumen efectivo de trabajo de 600 mL a 120 rpm y 32˚C, condiciones óptimas determinadas por ensayos preliminares realizados por Caballero y Camelo (2006) y utilizando tres replicas para cada medio. Se efectuaron muestreos al tiempo 0, 30, 60, 90 y 120 minutos, luego cada 4 horas; Durante 78 horas, determinando así la hora en la cual se expresan los mayores valores de viabilidad y actividad enzimática. Igualmente se determinó el sustrato residual a través del tiempo.

5.6.PARÁMETROS CINÉTICOS

Los parámetros cinéticos evaluados fueron la biomasa, la actividad enzimática, el pH y el consumo de sustrato.

5.6.1. Métodos analíticos realizados en los diseños experimentales y curvas de crecimientos

5.6.2. Determinación de biomasa

La biomasa se determinó por recuento en placa en superficie, en el medio SMRS (anexo1) establecido para la determinación de bacterias fosfato solubilizadoras. La técnica consiste en realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-10} en tubos de vidrio de 13*100 mm con 4.5 mL de solución salina al 0.85% (p/v); todas las diluciones se sembraron por duplicado. Las cajas de petri fueron incubadas a 32ºC durante 48 horas.

La biomasa de los ensayos Plackett Burman, Box-Behenken y Cinética de Crecimiento fue evaluada por medio de la técnica de microgota descrita por Doyle *et al*., (2001). Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-9}, sembrando en superficie por duplicado en cajas de agar SMRS con micropipeta 20 µl y se incubaron a 32˚C para su posterior lectura y recuento.

5.6.2.Cuantificación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa se llevó a cabo mediante la técnica de *p*-nitrofenil fosfato, propuesta por Otálora y Patiño, (2003). Para la preparación de la curva patrón (Anexo 2) se realizo una solución stock de p-nitrofenil de 1000µmol/L (1mmol/L) en buffer fosfato con pH 7.0. Por medio de la ecuación 5 se determinaron las concentraciones finales de p-nitrofenil las cuales fueron realizadas y leídas seis veces en un espectrofotómetro Spectronic 210 Milton Roya 450nm.

$$V1 * C1 = V2 * C2 \quad [5]$$

Donde V1 y C1 son el volumen y la concentración inicial de p-nitrofenil y V2 y C2 son la concentración final de este compuesto.

La cuantificación de la actividad fosfatasa de las bacterias fue determinada tomando 1400µL de cada una de las muestras del cultivo, las cuales reaccionaron con 1800µL de p-nitrofenil fosfato al 0.08% (v/v) durante una hora a 35ºC; la reacción se detuvo con 3150µL de NaOH 20mmol; las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos y posteriormente a esto se realizó la lectura en un espectrofotómetro Spectronic 210 Milton Roya 450nm (Otálora y Patiño, 2003).

5.6.3.Determinación de pH

La determinación del pH se efectuó por duplicado mediante el medidor de pH (Hanna Instruments pH211®).

5.6.4.Determinación de consumo de sustrato

Para la determinación el consumo de sustrato se procedió a realizar una curva con concentraciones conocidas de sacarosa (Anexo 3) y luego se realizo una hidrólisis ácida de la sacarosa (Godoy, 2002), adicionando a 2 mL de cada una de las muestras con concentración conocida de sacarosa 2 mL de HCl 1:1 (v/v), luego se mezcló en vortex y se llevó a ebullición por 10 min a 92˚C al terminar el tiempo se depositaron los tubos en hielo durante 10 min para frenar la reacción. Posterior a esto se llevo la solución a un punto de neutralidad para permitir la reacción de DNS en medio básico; para lo cual se adicionaron dos gotas de fenolftaleína al 1% en cada tubo, luego son agregados aproximadamente 2,06 mL de NaOH 25% (p/v) hasta evidenciar un color ligeramente rosado, posteriormente se adicionó 0,6 mL de HCl 5% (v/v) hasta que desapareció el color del indicador. A partir de esto se aplicó

la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicilico (DNS) propuesta por Miller (1959). Se realizó una curva patrón (Anexo 4), a partir de una solución stock de sacarosa hidrolizada de 2g/l hasta 0.1 g/l. Para determinar los azucares reductores se tomarán 0.25mL de cada una de las concentraciones preparadas y se dispuso en tubos de vidrio de 13*100 mm con 0.25mL de DNS. La mezcla se colocó en ebullición por 5 minutos, frenando la reacción con hielo durante otros 5 minutos. Después a cada uno de los tubos se les adicionó 2.5mL de agua destilada y se hicieron las respectivas lecturas en espectrofotómetro a 540nm ajustando el cero de absorbancia con el blanco de prueba en el cual se adicionaran 0.25mL de agua con 0.25mL de reactivo DNS. Para la determinación de azúcares reductores en las muestras se aplicó el procedimiento explicado anteriormente cambiando la solución stock sacarosa por 0,25mL del extracto crudo, realizando las lecturas de absorbancia a 540nm.

5.7.MODELO ESTADÍSTICO

Para el análisis de las diferentes variables (Biomasa, actividad enzimática y consumo de sustrato) en el estudio, se utilizaron diferentes herramientas tales como la Estadística Descriptiva, ANOVA, Microsoft Excel 2007 y del software estadístico DESING EXPERT 6.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1.Microorganismo

La bacteria utilizada (*Enterobacter agglomerans) es* reportada como bacteria fosfato solubilizadora y fijadora de nitrogeno (Hong-Joo *et al.,* 2006; Useche, 2003; Potrikus *et al.*, 1977; Min Meng *et al.*, 1995); además de obtener excelentes resultados como promotora del crecimiento (Subhash *et al.,* 2001; Da Luz, 2001). Macroscópicamente en el medio de cultivo propuesto se visualizaron colonias cremosas, circulares, color crema (Figura 10) y microscópicamente se observaron bacilos Gram negativos. No se apreciaron cambios morfológicos en su pigmentación por los cambios en el medio de cultivo.

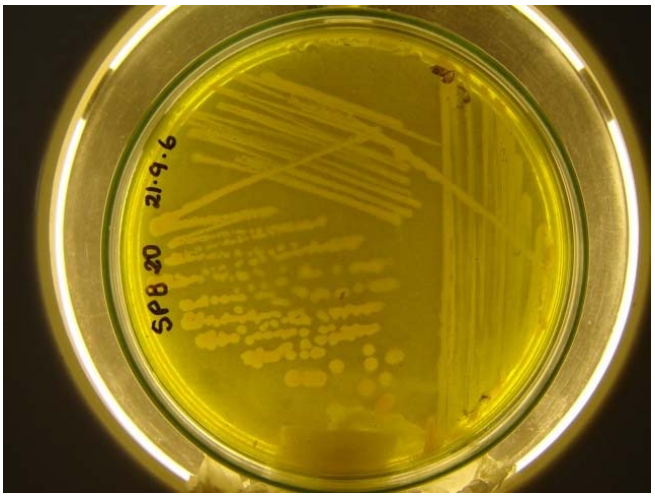

Figura 10. Macroscópica de *Enterobacter agglomerans* en el medio SMRS1 con purpura de bromocresol. 48 horas de incubación, 32˚C. Tomada por el autor

6.1.ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

Partiendo de una siembra masiva proveniente de un vial en medio de cultivo solido, se inoculó la bacteria en solución salina al 0.85% (p/v) para obtener una suspensión microbiana correspondiente al tubo 5 del Patrón Mc Farland, lo cual fue corroborado mediante espectrofotométría y por recuento en placa. El valor del tubo 5 es de 0,574 (Anexo 5) que al ser confirmado por viabilidad correspondió a 7,27 Log 10 de UFC/mL, con una desviación estándar de 0,7. Esta suspensión fue inoculada al medio SMRS incubándola durante 48 horas a 32˚C y 120 rpm. Se verificó su concentración correspondiente a 9,4 Log 10 de UFC/mL, con una desviación estándar de 1,3.

Las 3 repeticiones con 3 replicas (Figura 11) no presentaron diferencias significativas ($p>0.0001$) indicando que tanto la preparación de la suspensión y la producción del inóculo son dos metodologías reproducibles bajo las condiciones evaluadas. Partiendo de esta metodología se realizaron los demás ensayos con un valor de confianza del 95%, generando una disminución en el uso de los viales del banco para la producción del inoculante, que a su vez genera una reducción en costos.

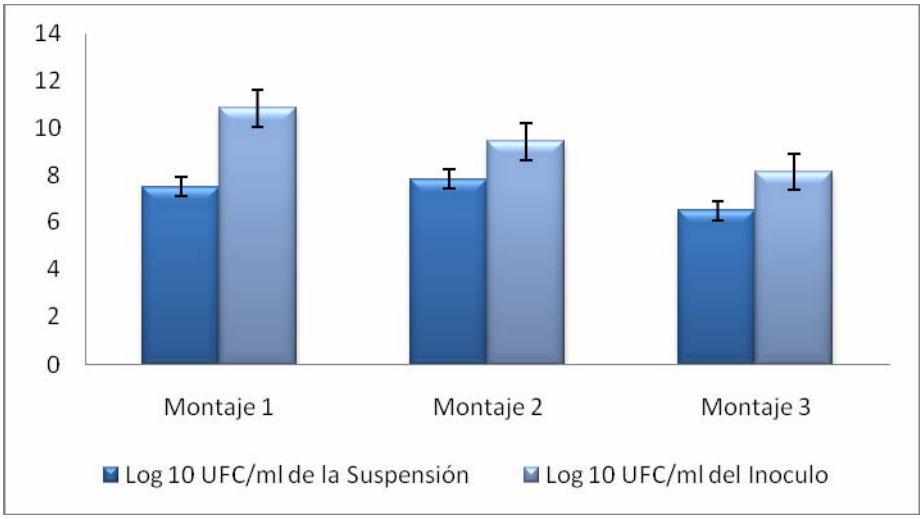

Figura 11. Resultados de la estandarización del inóculo

6.2.REALIZACIÓN DEL BANCO PILOTO

Al estandarizar la concentración inicial del inóculo, se implementó un banco de cepas primario y de trabajo empleando la técnica de criopreservación con glicerol al 30% (v/v). El banco primario tiene como objetivo servir de insumo para las futuras producciones de bancos de trabajo que serán empleados para la producción del inoculantes en el laboratorio de microbiología de suelos en el Centro de Investigación Tibaitatá de CORPOICA. Durante la elaboración y almacenamiento de los viales se tomaron muestras al inóculo, a los 30 minutos (inóculo más glicerol sin congelación), 24 y 48 horas, 8 y 15 días. Al realizar esta evaluación se tuvieron en cuenta los siguientes cuatro puntos que podían afectar la viabilidad del banco: la dilución del inóculo al adicionar el crioprotectante, el efecto lítico del crioprotectante en el proceso de preparación de los crioviales, el efecto lítico de crioprotectante asociado a la congelación rápida y la estabilidad a través del tiempo evaluado bajo condiciones de congelamiento a tiempos medios de almacenamiento, bajo un temperatura no asociada a ultracongelación.

Los resultados revelan que no hubo diferencias significativas entre las replicas y repeticiones a través del tiempo ($p>0.0001$), lo que permite inferir que el inóculo no pierde ó disminuye la viabilidad al mezclarse con el glicerol en el momento de preparar los crioviales, a las 24 horas de congelamiento y en los tiempos medios de almacenamiento (Figura 12). Este resultado es muy importante porque garantiza que el banco de cepas primario y de trabajo están formados por células viables en un 100%, a su vez el protocolo en si de elaboración del banco no afecta la viabilidad y es reproducible en el tiempo, debido posiblemente a la capacidad del crioprotectante de penetrar la célula sin dañarla y ayudar en la regulación osmótica de la misma.

El banco de cepas primario contiene una concentración de células viables de 9,6 Log 10 de UFC/mL y el banco de trabajo contiene una concentración de células de 8,2 Log 10 de UFC/mL; estos resultados están acordes con lo reportado por Monroy y Meza (2002) respecto a la criopreservación de células bacterianas usando glicerol como agente crioprotectante. Cabe resaltar que esta evaluación tan detallada durante la elaboración de un banco es relevante ya que no son reportadas frecuentemente y la concentración del inóculo reviste gran importancia para cualquier tipo de producción.

Otro parámetro evaluado en el desarrollo del banco fue la actividad enzimática representada por UP (Anexo 6) (Figura 12) debido a que la efectividad de un método de conservación no está determinada solo por la tasa de sobrevivencia sino también por la conservación de una característica de interés especial del microorganismo (Kirsop y Snelll 1984). Es importante para el laboratorio mantener las propiedades del microorganismo a utilizar en un inoculante durante el tiempo, y más aun si se espera obtener una producción industrial y comercialización de este, como lo plantea Kirsop *et al.*, (1984) al determinar la eficacia del método de conservación a utilizar no

sólo teniendo en cuenta la viabilidad, sino también una característica explotable industrialmente de la cepa utilizada. Por tal razón, al seleccionar el método de conservación es necesario ensayarlo y discutir los resultados obtenidos del mismo, con el propósito de considerar los rendimientos obtenidos cuando son empleados.

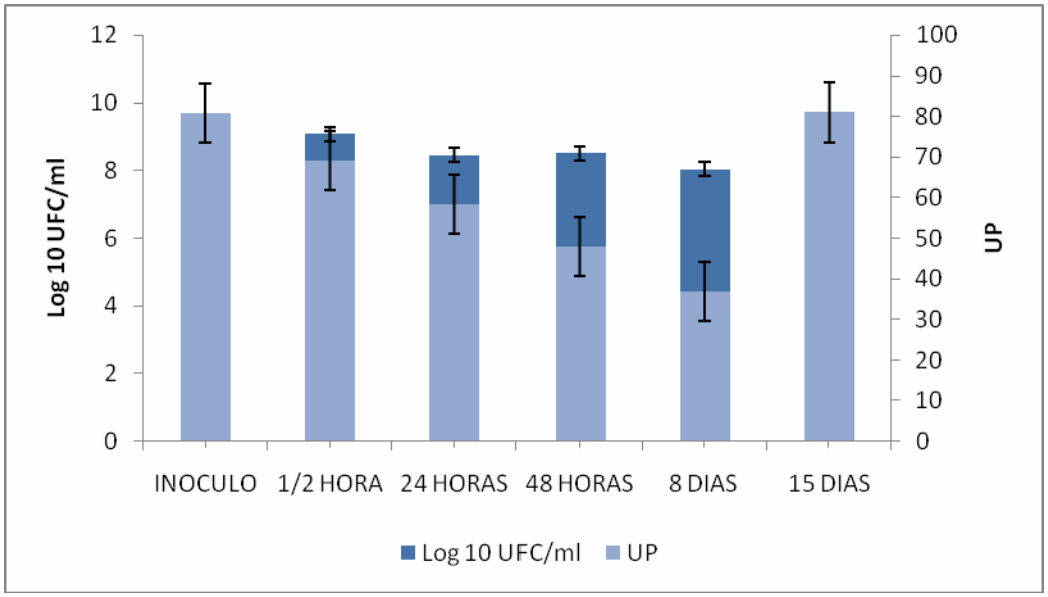

Figura 12. Resultados Banco de Cepas

Durante las primeras etapas evaluadas en el banco de cepas (30 minutos a 48 horas) la actividad enzimática no presento diferencias significativas, pero al evaluar los resultados del día 8 se observa una disminución evidente en la producción del metabolito de interés, debido muy probablemente al manejo

de la muestras ya que con la misma muestra primero se evaluó la actividad partiendo del extracto crudo y luego de refrigeración se resuspendió para evaluar la actividad a partir del cultivo; es posible que la resuspensión no haya sido la mejor y que un porcentaje de células permanecieran peletizadas influyendo en la lectura de la actividad enzimática y de la producción de fosfatasas intracelulares, ya que en el día 15 aumenta la actividad presentándose valores muy similares a los de las primeras etapas del banco. Cabe recalcar que las etapas críticas de adaptación en un banco de cepas son los primeros instantes de la mezcla con el glicerol y el inicio del proceso de congelación llamado periodo de equilibrio (Monroy y Meza, 2002). El tiempo permitido para que el agente crioprotector penetre la célula depende de la permeabilidad de las mismas. Los resultados del presente trabajo relacionados con el crioprotectante fueron satisfactorios en cuanto a la recuperación de viabilidad y la actividad enzimática de la bacteria, teniendo una actividad final de 80,9 UP muy similar a la actividad inicial.

6.3.ENSAYO PLACKETT BURMAN

En el laboratorio de Suelos del Centro de Investigación Tibaitata de CORPOICA se empleaba el medio SMRS para la producción del inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras, con una composición basada en reactivos, grado quimico que aumentaban los costos de producción. En este medio se obtenian de 7 a 9 Log 10 de UFC/mL y valores de actividad enzimática promedio de 50-70 UP en un tiempo de fermentación de 48 horas. Por esta razón, se plateó el primer diseño experimental con el objetivo de determinar si el cambio en el grado de pureza de los reactivos, la fuente de nitrógeno y condiciones de operación como inóculo y revoluciones por minuto (agitación) mantenia o incrementaba la producción de biomasa y enzimas y de esta manera reducir los costos de producción (Figura 13).

De acuerdo con el análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95% los resultados demuestran que las variables que afectan significativamente la producción de células son: C (roca fosfórica), D ($(NH_4)_2SO_4$) y H (Fe_2SO_4). El análisis de regresión (Anexo 11) muestra que el crecimiento de *Enterobacter agglomerans* en las condiciones de trabajo evaluadas fue significativa al nivel alto de roca fosfórica, y niveles bajos de $(NH_4)_2SO_4$ y Fe_2SO_4, con valores de p= 0,0489, p= 0,0374 y p= 0,0374, respectivamente. Por este motivo la ecuación de primer orden que describe el modelo se reformuló sobre la base de los factores que fueron significativos (Ecuación 6).

$$y = +6.75 + 1.1416\ X_1 - 1.41\ X_2 - 1.41\ X_3 \quad [6]$$

Donde y es la variable de respuesta viabilidad, X_1 es roca fosfórica, X_2 es $(NH_4)_2SO_4$ y X_3 es Fe_2SO_4. Es importante tener en cuenta que la significancia de estos factores está posiblemente determinada por la función que cumplen para favorecer el crecimiento de la bacteria, por lo tanto a mayor concentración de bacterias es mayor la producción de ácidos orgánicos, los cuales solubilizan el fósforo inorgánico (roca fosfórica) y a mayor cantidad de fósforo disponible en el medio es mayor la concentración de microorganismos. Por otra parte, la enzima fosfatasa producida por *Enterobacter agglomerans,* ha sido reportada como metaloenzima, por tanto la presencia de hierro en el medio podría ser un cofactor para la producción de la enzima fosfatasa (inorganica.com).

Con respecto a la actividad fosfatasa, el análisis de varianza demostró que no se presentaron diferencias significativas con respecto a los factores evaluados ($p>0.0001$) lo cual determinó que ninguno induce mayor producción de la enzima (Ecuación 7). La posible explicación puede estar

asociada con la presencia del inductor de tipo orgánico como el inactivado de levadura panaria que estaba presente en todos los tratamientos a bajas y altas concentraciones. Como es conocido ciertos compuestos orgánicos complejos pueden inducir la actividad fosfatasa, en este caso el extracto de levadura se sustituyó por una preparación de levadura de panadería la cual se inactivó por doble ciclo de tratamiento térmico para hidrolizar y liberar compuestos ricos en fósforo unidos por enlace éster como los fosfolípidos de membrana; de esta manera se utilizó un sustituto económico de fósforo orgánico que a su vez aporta otros elementos nutricionales que pudieron favorecer la actividad enzimática y la viabilidad celular. Datos similares pero utilizando como fuente de nitrógeno extracto de levadura fueron reportados por Barragán y Zambrano (2003), donde presentan valores hasta 40,7 UP para *Bulkholderia cepacia*, 43,9 UP para *Azotobacter chroococcum* y 67,2 UP para la mezcla de las dos bacterias, mientras que en los diferentes medios propuestos con base al diseño experimental Plackett Burman se presentan valores desde 36 hasta 78 UP.

$$Y= +52.75000 + 6.25000A + 1.41667B + 2.08333C + 3.91667D + 3.91667E + 1.75F + 1.41667G - 0.08333 H - 3.58333 J + 2.08333 K \quad [7]$$

Donde **Y** es variable de respuesta en este caso actividad enzimática en UP, A es sacarosa, B es inactivado termico de levadura panaria (ITLP), C es roca fosfórica, D es $(NH_4)_2SO_4$, E es KCl, F es $MgSO_4$, G es $MnSO_4$, H es Fe_2SO_4, J porcentaje de inóculo (v/v), K Velocidad de agitacion (rpm).

De acuerdo al análisis de comparación de medias (Anexo 11), se observan diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo en los tratamientos 3 y 10 se presentaron significativamente la mayor formación de biomasa expresada como Log 10 UFC/ml con valores de 10.37 y 10.01,

respectivamente (Tabla 5). Por otro lado, entre los tratamientos 3 y 10 no se presentaron diferencias significativas (p>0.0001), por lo cual cualquiera de ellos podría ser utilizado para la producción, sin embargo el medio tres contenía los niveles altos de roca y bajos de hierro y amonio que resultaron significativos para el diseño de Plackett Burman, razón por la cual la formulación final de medio para continuar con la optimización fue la combinación obtenida en el medio de cultivo tres

Tabla 5. Resultados Ensayo Experimental Plackett Burman

TRATAMIENTO	BIOMASA Log 10 UFC/ml	ACTIVIDAD ENZIMATICA UP	SUSTRATO FINAL Concentración g/L	pH
3	10,370 ±0.2	43,333 ±18.76	0,705	4,3
10	10,010 ±0.2	43,667 ±18.76	1,603	4,6
C1	7,920 ±0.2	93,333 ±18.76	1,534	4,5
C2	6,599 ±0.2	42,000 ±18.76	0,972	4,5

Con respecto a la actividad fosfatasa en el tratamiento 4 se obtuvo la actividad fosfatasa más alta con 78,6 UP. Sin embargo al realizar la comparación de medias no se presentaron diferencias significativas sobre este parámetro entre tratamientos a excepción del número 12, datos que son similares a los obtenidos en viabilidad, por consiguiente se siguió tomando como base los resultados del tratamiento tres.

Según Bergey y Holt (2000) *Enterobacter agglomerans* es capaz de utilizar la sacarosa como fuente de carbono, la cual primero es hidrolizada a sus componentes monosacáridos: glucosa y fructosa por medio de la enzima invertasa para luego ser metabolizada por vías normales. (Madigan *et al.,* 1999). La sacarosa presenta unos niveles bajos de la misma al final de la

fermentación de los diferentes tratamientos (Figura 13). Los resultados de pH al final de las fermentaciones fueron ácidos, debido a la producción de ácidos orgánicos que ayudan a la solubilización del fósforo.

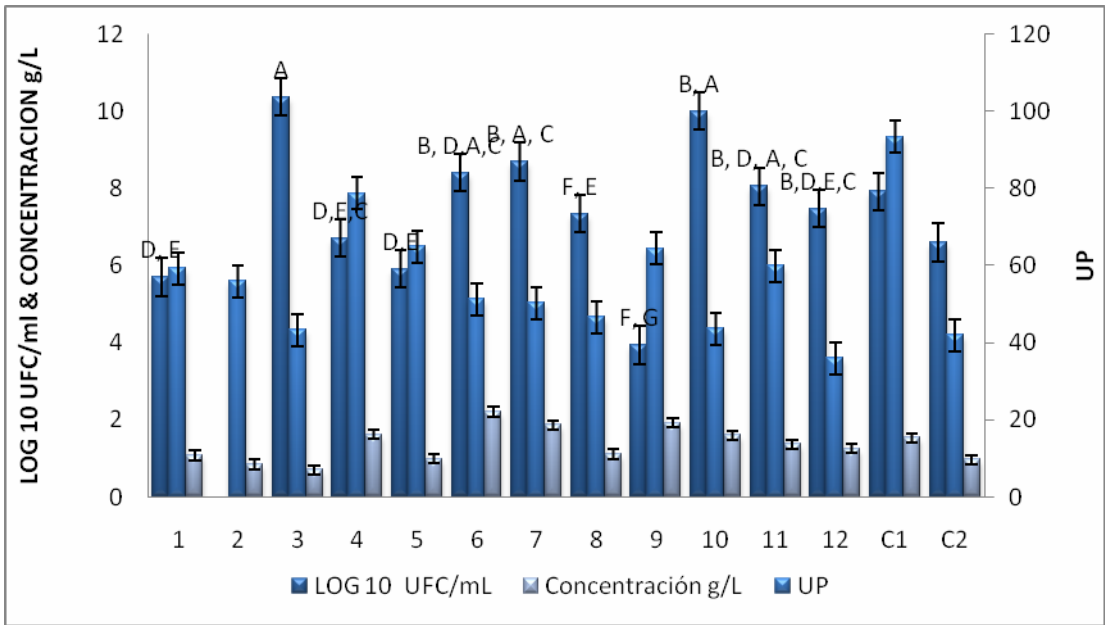

Figura 13. Resultados Plackett Burman. Condiciones del cultivo: Agitación: dada por la matriz, Temperatura: 32˚C Tiempo: 48 horas

Los anteriores resultados indican que el diseño de Plackett Burman es una herramienta importante para identificar los factores y las concentraciones que tienen una influencia significativamente marcada en la producción de biomasa. Si se compara el crecimiento del medio C1 indicado como el medio control (grado químico) o el medio que se utiliza en el laboratorio para el crecimiento de bacterias fosfato solubilizadoras con el medio tres o diez vemos una marcada diferencia de 8 a 10 Log 10 UFC/ml, resultados que al ser comparados con lo obtenido con el tratamiento C2 indicado como el medio control (grado comercial), no se generan resultados positivos, debido a que se manejaban las mismas concentraciones del medio tradicionalmente usado en el laboratorio pero en grado comercial, los cuales no poseen una

pureza del 100%, lo que en realidad disminuye la concentración de los sustratos en el medio. Los mejores resultados se obtuvieron con las diferentes combinaciones de concentraciones y factores del medio tres y de diez. La mayor actividad fosfatasa se obtuvo en el tratamiento 4 con 78,6 UP; sin embargo, por medio de la comparación de medias no se presentan diferencias significativas en este parámetro ($p>0.0001$), lo cual que confirma que se puede cultivar el microorganismo en el medio tres (Tabla 6)

Tabla 6. Composición medio 3

SUSTRATO	g/L
Sacarosa	5
ITLP	2
Roca fosfórica	10
Sulfato de amonio	0,01
Cloruro de Potasio	0,4
Sulfato de Magnesio	0,01
Sulfato de Manganeso	0,001
Sulfato de Hierro	0,001
Cloruro de Sodio	0,4
% inóculo	20%
Velocidad de agitación	240 rpm

La utilización de una suspensión estandarizada en los diferentes tratamientos le da un grado de confianza muy alto a los resultados alcanzados con el ensayo, ya que se garantizó desde el inicio del proceso de producción del inoculante una concentración importante de bacterias. La utilización de una fuente alterna de fósforo y nitrógeno con una reducción en el costo de la materia prima y la adaptabilidad del microorganismo a este cambio es significativo para la realización de la producción industrial del inoculante visualizando una adopción de la misma. Una de las variables manejadas en el diseño experimental fue la agitación aumentada a 240 rpm en los medios y

teniendo en cuenta que se trabajaba con una bacteria anaerobia facultativa. El estudio arrojó resultados satisfactorios con respecto a la adaptabilidad del microorganismo a las condiciones de crecimiento dadas, teniendo en cuenta que normalmente se usaban 120 rpm.

6.4. BOX-BEHNKEN

A partir del diseño experimental de Plackett Burman los factores que poseían un nivel de significancia importante para la variable de respuesta biomasa ($p<0,05$) fueron la roca fosfórica, el $(NH_4)_2SO_4$ y el Fe_2SO4. Para plantear el diseño se tomó como base la formulación y las condiciones de operación del medio tres considerándolo como el punto central ó nivel medio del diseño experimental. Solamente se modificaron los factores que fueron significativos para Plackett Burman es decir la roca fosfórica, el sulfato de amonio y el sulfato de hierro. A estos tres factores se les estableció un nivel alto (+1) y un nivel bajo (-1) para evaluar específicamente sobre ellos la posible optimización con el objetivo de incrementar la viabilidad celular y la actividad fosfatasa, por lo tanto la matriz generada fue de 17 experimentos incluyendo los puntos centrales.

Al desarrollar el experimento se buscaba encontrar un valor bajo, medio ó alto de los tres factores que superara a los resultados obtenidos en el medio tres. Al analizar los resultados de varianza para viabilidad el único factor que presentó un efecto significativo fue el amonio a su nivel bajo ($p=0.0040$) que equivale a 0,0032 g/L la mitad de la concentración del valor de partida. (Figura 14)

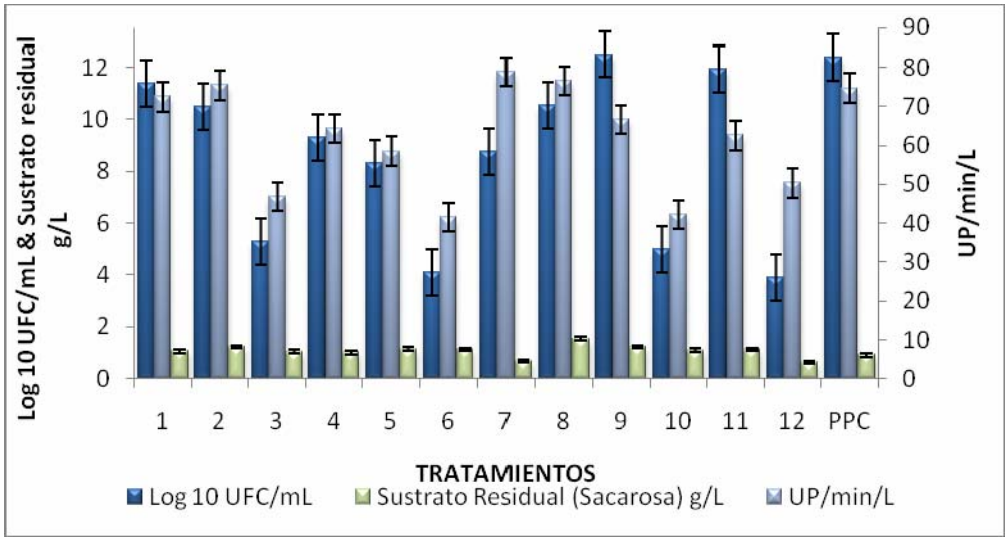

Figura 14. Resultados Box Behnken. Bajo las condiciones del medio tres. PPC (Promedio Puntos Centrales)

Al analizar las superficies de respuesta para cada uno de los factores (Figura 15, 16 y 17) se observó que la mayor curvatura tiene tendencia en los puntos centrales lo cual permitió confirmar que la formulación del medio tres es la más apropiada para la producción, por tal motivo la modificación tanto a nivel bajo como alto de los tres factores no evidenció diferencias significativas que superen los obtenidos en el medio tres. Esto sugiere que no es necesario el incremento ó la disminución en las concentraciones de estos tres componentes del medio. De acuerdo a que los valores de pH son cercanos a 4,4, la solubilización de la roca fosfórica se da principalmente por la producción de ácidos orgánicos (Surange y Kumar, 1993)

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de software estadístico SAS con un análisis de varianza, presentado por el modelo de regresión como la ecuación 4 y representado en la ecuación 8.

$$Y = +12.35640 + 0.084875\ X_1 - 2.84875\ X_2 + 0.65338\ X_3 + 1.23025\ X_1X_2 + 1.50200\ X_1X_3 - 0.13375\ X_2X_3 - 1.82370\ X_1^2 - 1.41345\ X_2^2 - 2.61220\ X_3^2 \quad [8]$$

Donde Y es la viabilidad, X_1 es la roca fosfórica, X_2 es el (NH4)2SO4 y X_3 es Fe_2SO_4

El análisis de varianza del modelo de regresión cuadrática (anexo 11) demuestra con la ecuación 8 la significancia del modelo; es decir, que los datos aportan resultados significativos. Igualmente el test Fisher F-test arrojó un valor de probabilidad de 0.0349. Lo anterior también se puede evidenciar en el coeficiente (R^2= 0.6460). Esta respuesta en el modelo de regresión es observada en la Figura 15, 16 y 17 de 3 dimensiones por la combinación de las tres variables en función de la producción de biomasa.

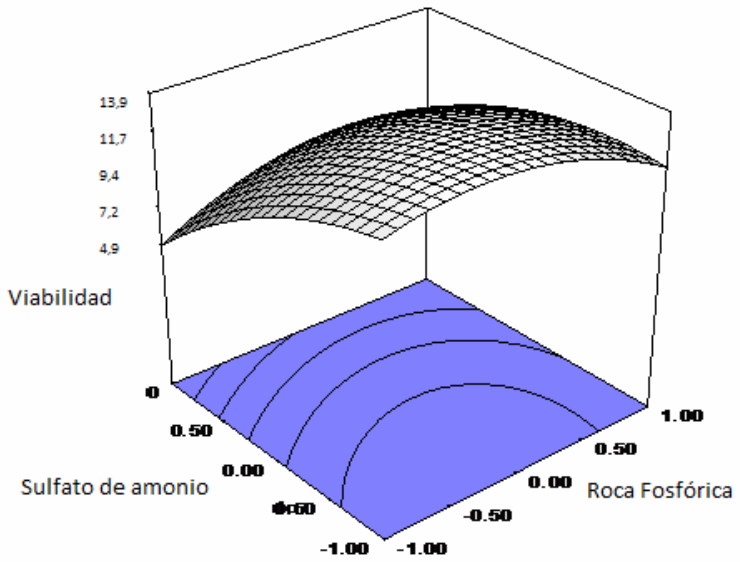

Figura 15. Grafica de superficie de Respuesta interacción de Roca fosfórica y Sulfato de amonio

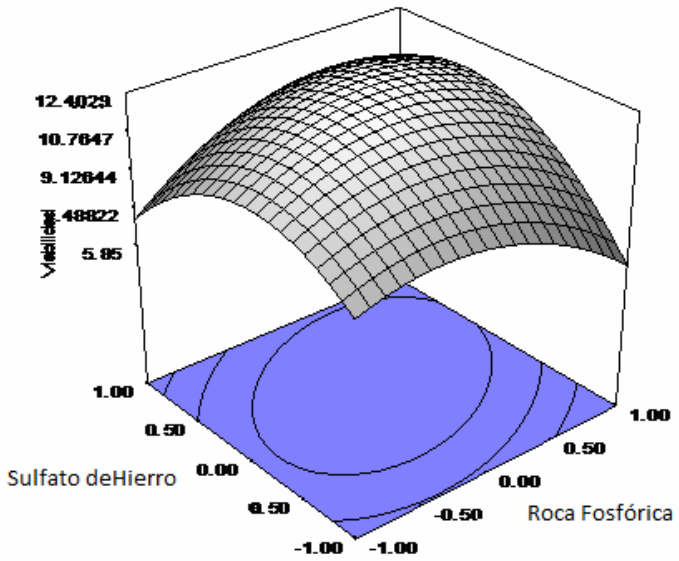

Figura 16. Grafica de superficie de Respuesta interacción de Roca fosfórica y Sulfato de Hierro

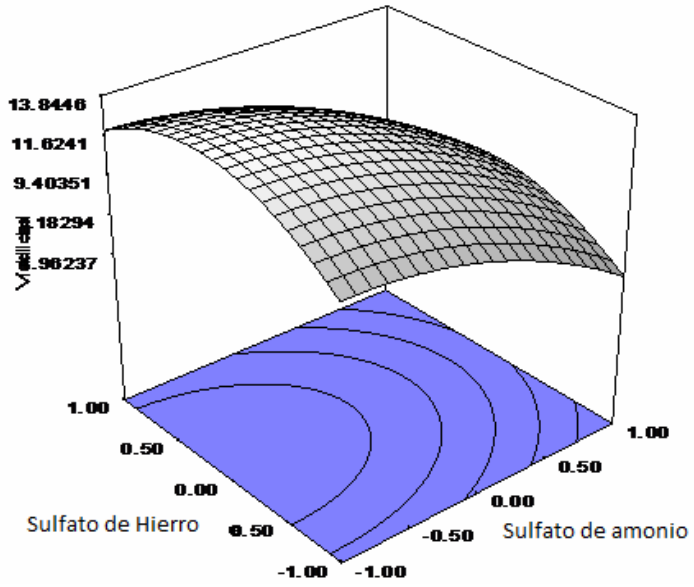

Figura 17. Grafica de superficie de Respuesta interacción de Sulfato de amonio y Sulfato de Hierro

6.5.CINETICA DE CRECIMIENTO A ESCALA DE LABORATORIO

La producción de biomasa (Figura 18), la actividad enzimática, el pH y el sustrato residual en el medio tradicional y el medio propuesto fueron evaluados a través del tiempo durante 78 horas a 120 rpm 32˚C.

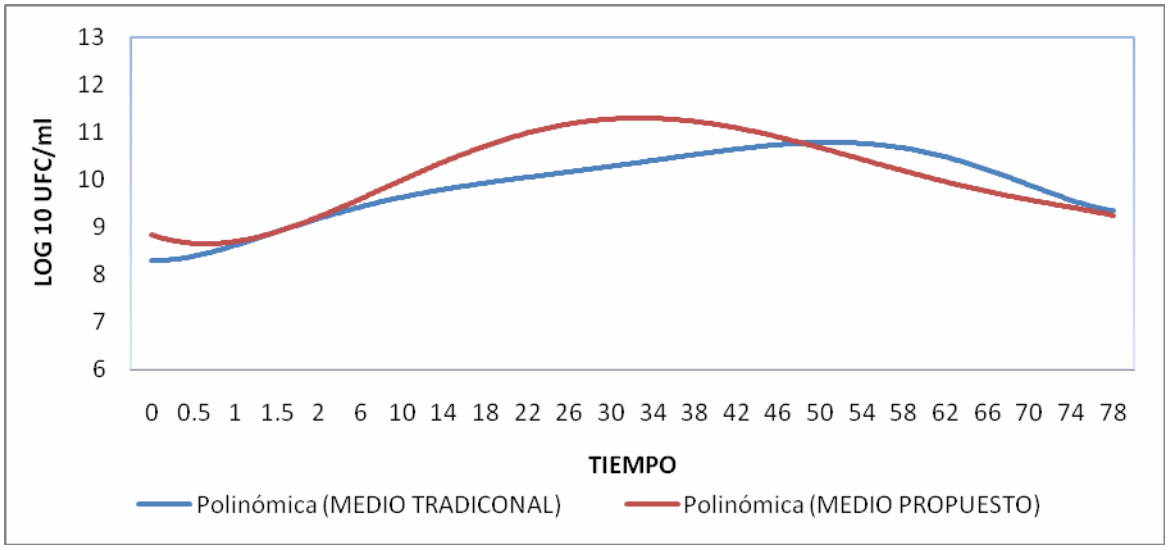

Figura 18. Curva de crecimiento medio Tradicionalmente usado en el laboratorio contra Medio Propuesto

Las curvas de crecimiento para ambos medios de cultivo iniciaron en 8 Log 10 UFC/mL, presentando una fase de adaptación levemente marcada hasta la hora dos, donde iniciaron diferencias notorias en los recuentos, para ambos medios. Se presentó el valor más alto de biomasa para el medio tradicional en la hora 26 con un valor de 12,21 Log10 UFC/mL y en la hora 46 con un valor de 10,96 Log10 UFC/mL. El medio propuesto aumentó en dos unidades logarítmicas la concentración de biomasa y redujo el tiempo de producción a 26 horas. Se encontraron diferencias significativas entre los medios tradicional y propuesto con un p= 0,01808 (Anexo 13), sugiriendo a su vez la recomendación para el uso del medio propuesto, sustentados en los resultados obtenidos.

En el medio tradicional y en el propuesto se presenta una correlación significativa en toda la curva entre la producción de biomasa y la actividad enzimática de la fosfatasa expresada en UP y observada en la figura 19 y 20. Estos resultados están acordes con lo reportado por Sahu y Jana (2000), donde concluyen que las enzimas fosfatasas son metabolitos asociados al crecimiento bacteriano, indicando que la solubilización está directamente relacionada con el número de bacterias solubilizadoras en medio con roca fosfórica. De igual manera estudios realizados por Beltrán *et al* (2005) demuestran que la producción de fosfatasa esta estrechamente relacionada con el crecimiento del microorganismo en el medio.

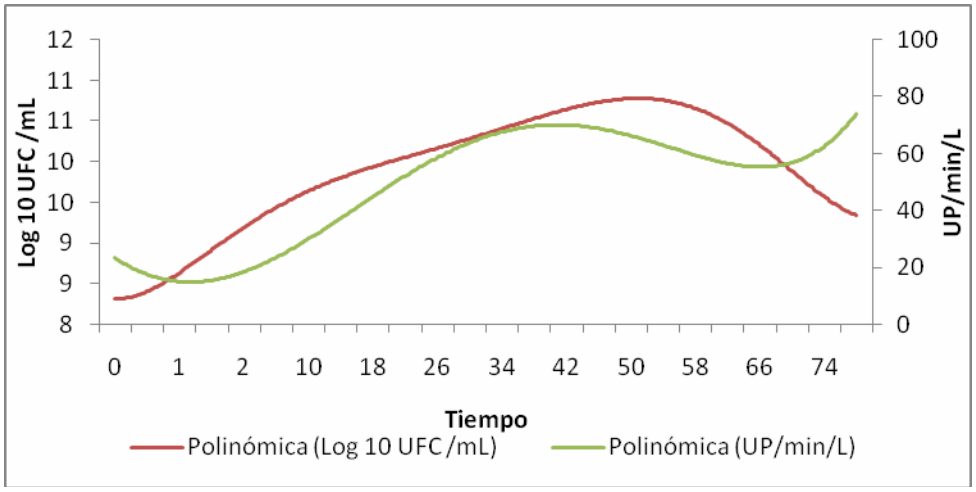

Figura 19. Medio Tradicional. Biomasa y Actividad Enzimática en función del tiempo

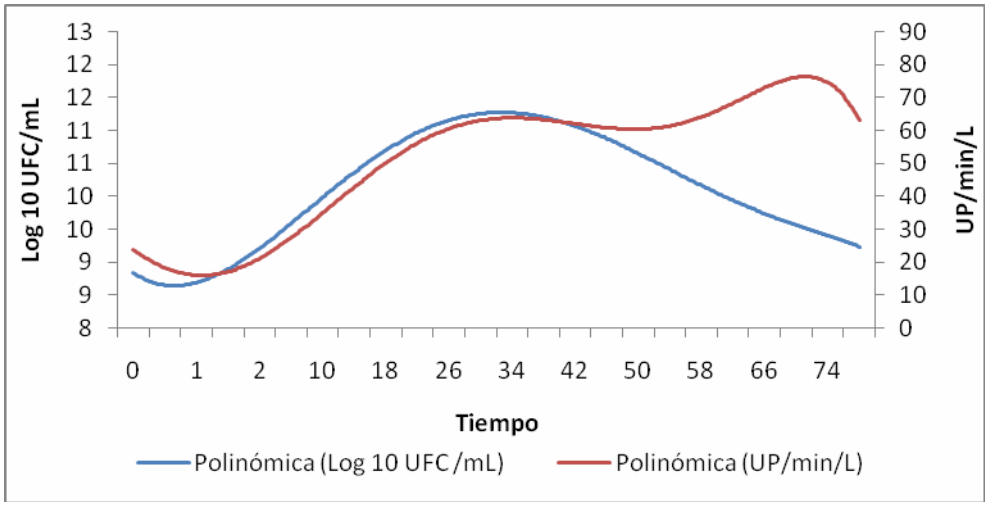

Figura 20. Medio Propuesto. Biomasa y Actividad Enzimática en función del tiempo

El p-nitrofenilfosfato utilizado como sustrato orgánico artificial para la determinación de la actividad enzimática de las fosfatasas, actúa como sustrato inductor del proceso de mineralización por la acción de las fosfomonoesterasas producidas por los microorganismos. En la investigación desarrollada por Barragán y Zambrano (2003) concluyeron que la fosfatasa fue inducida en el medio de cultivo por la presencia de posibles enlaces fosfoéster en el extracto de levadura usado en sus medios, en el medio propuesto se usa levadura panária la cual es usada como base para la elaboración del extracto de levadura. Esta inducción puede ser atribuida a que esta enzima tiene afinidad por este tipo de enlaces, causando la mineralización (defosforilación) del sustrato que contiene fósforo orgánico (Jennings, 1995). La levadura esta compuesta por aminoácidos, vitaminas, péptidos, carbohidratos (glucanos y mananos) y fosfolípidos, estos fosfolípidos de membrana son fosfodiglicéridos que están formados por una molécula de glicerol esterificado por dos ácidos grasos y el tercer hidroxilo del glicerol por un fosfato (Paniagua y Anadon 1999); esta ultima esterificación constituye un enlace fosfoéster el cual actúa como sustrato inductor de la actividad enzimática de las fosfatasas, determinando que a

mayor concentración de fosfolípidos posiblemente mayor actividad. (Barragán y Zambrano, 2003)

Los valores de actividad enzimática más altos durante la curva de crecimiento del medio tradicional fueron de 73,3 UP a la hora 54, y en el medio propuesto de 70,3 UP a la hora 26 y 78,7 UP a la hora 54. .

Con respecto al tipo de fosfatasa producida por *Enterobacter agglomerans* no es posible concluir sin pruebas de estabilidad a pH, si es alcalina o ácida, pero con base en las lecturas de pH realizadas en la curva de crecimiento (Figura 21 y 22) se puede inferir que se trata de una fosfatasa ácida. Además esta bacteria ha sido aislada de suelos de producción agrícola donde según Gómez (2004) es mas común encontrar microorganismos productores de fosfatasas ácidas que alcalinas y que la mayor producción de fosfatasas se da en ambientes ácidos, debido a que estas condiciones son las predominantes en suelos tropicales.

De igual manera es reportado por Kim *et al* (1998), que la expresión de la enzima está asociada al medio de crecimiento del microorganismo productor y a las condiciones medio ambientales como pH, nutrientes y concentración de los mismos.

El consumo de sustrato en ambos medios es proporcional al tiempo conforme pasa el tiempo como se puede observar en las figuras 21 y 22, reflejado en la disminución del sustrato residual en función del tiempo.

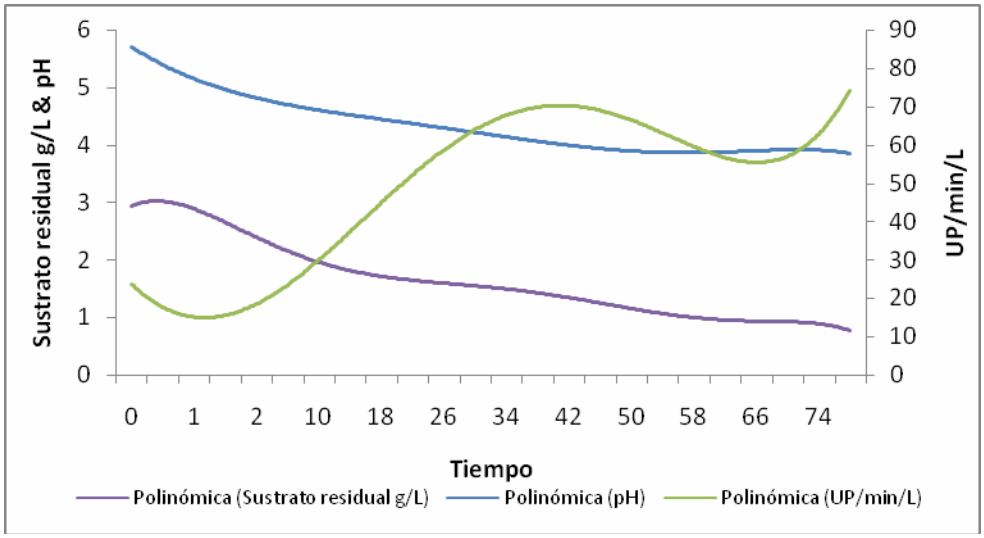

Figura 21. Medio Tradicional. Sustrato residual, pH y Actividad Enzimática en función del tiempo.

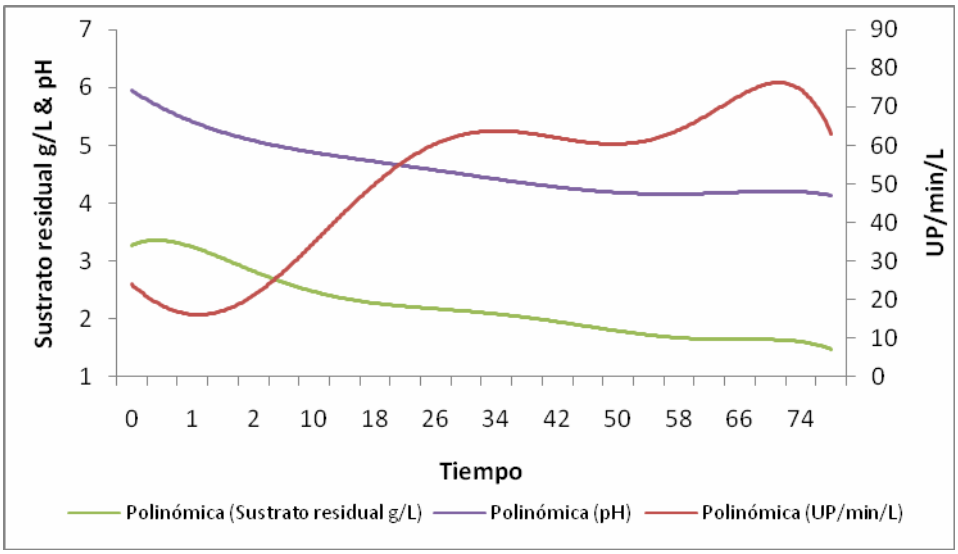

Figura 22. Medio Propuesto. Sustrato residual, pH y Actividad Enzimática en función del tiempo.

6.6. COSTOS

En las tablas 7 y 8 se puede observar la disminución del valor por litro del medio de cultivo utilizado actualmente en el laboratorio de $464 a $35 pesos por litro en el medio propuesto, por el cambio de fuente de nitrógeno y las sales a grado comercial

Tabla 7. Costo. Medio Tradicional

REACTIVO	*CANTIDAD (g)*	*VALOR*	*CANTIDAD USADA (g/L)*	*VALOR*
Cloruro de Potasio	1000	63.000	0,2	13
Cloruro de Sodio	1000	38.000	0,2	8
Extracto de Levadura	500	330.000	0,5	330
Roca fosfórica	1000	500	5	3
Sacarosa	1000	1.000	10	10
Sulfato de amonio	1000	110.000	0,5	55
Sulfato de Hierro	500	148.000	0,002	1
Sulfato de Magnesio	1000	151.800	0,3	46
Sulfato de Manganeso	1000	150.000	0,004	1
			VALOR g/L	464

Tabla 8. Costo. Medio Propuesto

REACTIVO	*CANTIDAD (g)*	*VALOR $*	*CANTIDAD USADA (g/L)*	*VALOR $*
Sulfato de amonio	1000	1.100	0,005	0,006
Cloruro de Potasio	1000	1.060	0,4	0,424
Sulfato de Magnesio	1000	1.900	0,01	0,019
Sulfato de Manganeso	1000	3.400	0,001	0,003
Sulfato de Hierro	1000	1.100	0,001	0,001
Cloruro de Sodio	1000	1.000	0,4	0,400
Nitrógeno orgánico	100	1200	2	24,000
Roca fosfórica	1000	500	10	5,000
Sacarosa	1000	1000	5	5,000
			VALOR g/L	35

7. CONCLUSIONES

La metodología estandarizada para la producción del inóculo es estadísticamente representativa, lo que garantiza homogeneidad entre los diferentes lotes de producción y ensayos.

El método de criopreservación permitió evidenciar la optima conservación de *Enterobacter agglomerans* tanto en viabilidad como en actividad enzimática.

El diseño experimental Plackett Burman arrojó resultados estadísticamente representativos, a las variables que influyen en la producción de biomasa (roca fosfórica, sulfato de amonio, sulfato de hierro) y un medio de cultivo alternativo.

La optimización del medio fue realizada con el ensayo experimental Box-Behnken, reduciendo a la mitad de la concentración el sulfato de amonio

El medio propuesto aumenta la concentración de biomasa (2 Log 10 UFC /mL) y reduce el tiempo de producción (22 horas).

El presente estudio permite producir un inoculante a bajo costo accesible a los agricultores colombianos

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de estabilidad a tiempo real.

- Realizar el escalamiento a nivel en reactor.

- Evaluar diferentes cepas en el medio de cultivo propuesto para diferentes suelos y cultivos de interés económico a nivel de invernadero y campo.

- Determinar en el medio de cultivo propuesto el fósforo soluble al final del proceso.

REFERENCIAS

ADINARAYANA, K. y ELLAIAH, P. 2002 Response surface optimization of the critical medium components for this production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* spp. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 5, 272–227.

ALEXANDER, M. 1980. Transformaciones microbianas. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editores. MEXICO

ALEXANDER, M. 1987. Introduction of soil microbiology. New York. Ed. Wiley ans Sons. p 350-395.

ALEXANDER, M. 1994. Introduction to Soil Microbiology. Ed AGT. Mexico D.F. p 13-25, 309-324, 356-371

ALFORD, J.S. 1976. Measurement of dissolved carbon dioxide. Can *J. Microbiol*. 22, 52-56.

APONTE, M.X. y LAYTON, L.J. 2003. Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y Solubilizadoras de fósforo aisladas de bosque alto Andino Cundinamarqués. Trabajo de grado, Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. p 43-44, 57-59.

AREVALO, M. y CORREA, M. 1993. Estandarización del proceso de liofilización de cepas de microorganismos. Trabajo de grado. Química Farmaceútica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. p 4-40

ATLAS, R. BARTHA, R. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Pearson Educacion, Madrid.

BABENKO, Y. TYRYGINA, G. GRIGORYEV, E. DOLGIKH, L. BORISOVA, T. 1994. Biological activity and physiologic-bichemical propierties of bacteria dissolving phosphates. *Microbiologya*. 53:533-539.

BARRAGAN, C y ZAMBRANO, D. 2003. Producción de bacterias fosfato solubilizadoras mediante fermentación discontinua en caldo Pikovskaya modificado. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

BELTRAN, S., TORRADO, Y., MARTINEZ, M., MATIZ, A. 2005. Aislamiento de bacterias con actividad fosfato solubilizadora y producción de un inóculo mixto en fermentación discontinua. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 105 p.

BENNO, K. 1983. Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Obtención, aplicación e investigación. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p 69-72.

BERGEY, D. y HOLT, J, ED. 2000. Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams y Wilkins.

BHATTI, A., ALVI, A., WALIA, S., CHAUDHRY, G. 2002. pH- Dependt Modulation of Alkaline Phosphatase Activity in *Serratia marcescens.*

BONILLA-BUITRAGO, R. 2007. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Lider Programa Microbiología de Suelos. Comunicación personal. rbonilla@corpoica.org.co

BOX, G.E.P Y BEHNEKEN, D.W. 1960. “Some new tri level designs for study of cuantitative variables. Technometrics. 2: 455-476

CABALLERO, T. CAMELO, M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de suelos algodoneros en los departamentos de Cesar y Meta. Tesis de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

CHEN XIONG . CHEN SHOUWEN . SUN MING . YU ZINIU. 2005. Medium optimization by response surface methodology for poly-*γ*-glutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 69: 390–396

DA LUZ, W. 2001. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. *Fitopatología Brasileira*. 26: 597-600

DAZZO, F. B. 1982. Leguminous root nodules. Experimental Microbial Ecology. Black well, Oxford, Inglaterra, pp 431-436

DIGHTON, J. 1983. Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 71: 455-462.

DINKELAKER, B. y H. MARSCHNER. 1992. *In vivo* demostration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. *Plant Soil* 144: 199-205.

DOYLE, M., BEUCHAT, L., MONTVILLE, T. 2001. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. Ed Acribia. España.

ESTOLA, R., YANTORNO, O., MIGNONE, C., 1994. Microbiología Industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA. p. 31-35, 60-71.

EWEIS, J. 1999. Principios de biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y químicos. Editorial McGraw Hill, Interamericana. Madrid, España. p 14-24.

FREITAS, J.R., BANERJEE, M., GERMIDA, J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils*. 24: 358-364.

GODOY, R. 2002. Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. Ingeniero Químico. Manual de Métodos Analíticos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. p 67-73.

GOMEZ, Y. 2004. Actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas extracelulares e intracelulares en hongos de la rizósfera de *Arachis hypogaea* (Papiloneaceae). *Rev. Biol. Trop*.Vol 52, No. 1: 287-295.

GOUDA M.D., THAKUR M.S., KARANTH N.G. 2001. Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology. *World J Microb Biot* 17:595–600

GYANESHWAR, P., KUMAR, G., PAREKH, L., POOLE, P. 2002. Role of soil microorganism in improving P nutrition of plant. *Plant and Soil*. 245 83-93.

HALVIN, J. 1999. Soil fertility and fertilizers. An introduction to nutrient management. 6th edition. Ed. Pretince Hall. USA. Pp 155-195.

HARRISON, D.E. y LOVELESS, J.E. 1991. The effect of growth conditions of respiratory activity and growth efficiency in facultative anaerobes growth in chemostal culture. *Microbiol*. 68, 35-43

HONG-JOO, S., GEUN-TAE, P., SUN CHA M., MOON-SOO, H. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Tecnology*. 97: 204-210.

HUNTER-CEVERA, J. y BELT, A. 1996. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. Editorial Academy Press. p 15-26, 65-82, 101-130.

HYUN-WOO K., HANG-SIK S., SUN-KEE H., SAE-EUN O. 2007. Response Surface Optimization of Substrates for Thermophilic Anaerobic Codigestion of Sewage Sludge and Food Waste. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 57:309–318

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA).2004 Resolución 00375 (Febrero 27 2004) Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia. Ministerio de Agricultura. Presidencia de la República.

JENNINGS, D. 1995. The phisiology of fungal nutrition. Cambridge University. Press Cambridge. UK.

KHURSHEED, A. 1989. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. World Federation for Culture Collection.

KIM, Y., JORDAN, D., McDONALD, G. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biol Biochem.* Vol.30 No. 8/9 pp 995-1003,

KIRSOP, B. y SNELL, J. 1984. Maintenance of microorganism. A manual of laboratory methods. Academic Press Inc. United States. Florida. p 5-56, 83-130

KUMAR, U. y NARULA, N.1999. Solubilization of inorganic phosphate and growth emergencia of wheats as effected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol Fertil Soils*. 28. 301-305

LEVITT, J. y DEAR, J. 1970. The roll of membrane proteins freezing injury and resistance. The Frozen cell. A ciba. Londres. Editorial Churchill. p 148-143

LHOMME, B. y ROUX, J.C. 1991 Utilization of experimental designs for optimization of *Rhizopus arrhizus* culture. *Bioresource Technology* 35, 301–312.

LIJIN H., ZHAOXIN L., YONGJUN Y., FENGXIA L., XIAOMEI B. 2006. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 33: 55–61

LUYET, B. 1970. Physical changes occuirring in frozen solutions during rewarming and melting. *The Frozen cell*. Londres. Editorial Churchill. p 27-47

LUTZ, H. 1990. Geomicrobial interactions with phosphorus. Geomicrobioloy. Second edition. USA. 646 pg

MADIGAN, T.M., MARTINKO J.M., PARKER, J. 1998. Brock. Biologia de los microorganismos. Octava Edicion. Editorial Pretince Hall. España. p 153-155, 171, 519.

MCGRATH, J., HAMMERSCHMIDT, F., QUINN, J. 1998. Biodegradation of phosphonomicin for *Rhizobium huakuii*. *Appl Environ Microbiol.* 64;356-358

MERYMAN, H. 1970. The exceding of a minimum tolerable cell volume in hypertonics suspentions as a cause of freezing injury. The Frozen cell. A ciba. Londres. Editorial Churchill. p 51-64

MILLER, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitycal Chemestry*, Vol 31. 3. p 86-92.

MENG, M., SUN, W., GEELHAAR, L., KUMAR, G., PATEL, A., PAYNE, G., SPEEDIE, M., STACY, J. 1995. Denitration of glycerol trinitrate by resting cells and cell extracts of *Bacillus thuringiensis/cereus* and *Enterobacter agglomerans*. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 2548–2553 Vol. 61, No. 7

MONTGOMERY, D. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Iberoamaericana. Estados Unido de America. Pag 334-335, 490-491.

MONROY, A. y MEZA, R. 2002. Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Tesis de Grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-065-SSA1-1993, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. GENERALIDADES

NUNC. 2002. Cryopreservation Manual. Nalge Nunc International.

NUÑEZ, G. y VIDOR, S. 2001. Actividad de microorganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potasio. *Pesq. agropec. bras., Brasília,* Vol. 36, No 12, p. 1495-1508

OHTAKE, H., WU, H., IMAZU, K., AMBE, Y., KATO, J. 1996. Bacterial phosphate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *A Res Conservation and Recycling*. 18:125-134

OTALORA, J y PATIÑO, L. 2003. Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá. Colombia

PANIAGUA, R. y ANADON, R. 1999. Biología Celular. Editorial Mc Graw Hill. Madrid, España. p 37-40.

PARK, Y.S., KANG, S.W., LEE, J.S., HONG, S.I. y KIM, S.W. 2002 Xylanase production in solid state fermertation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 761–766.

PLACKETT, R.L. y BURMAN, J.P. 1946. “The Design of Optimum Multifactorial experiments”. *Biometrika*, 33: 305-325

POTRIKUS, J. y BREZNAK, J. 1977. Nitrogen-Fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 392-399

RIDGE, E.H. y A.D. ROVIRA. 1971. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. *New Phytol*. 70: 1017-1026.

SAHU, S. y JANA, B. 2000 Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate solubilizing bacteria. *Ecological engineering*. 15: 27-39

SALISBURY, F.B. y ROSS, C.W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Iberoamericana. pp 395- 421.

SCHMIDT, E. L. 1978. Ecology of the legume root nodule bacteria. Interactions Between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants. Elsevier, Amsterdam, pp 269-304

SHAYKH, M.N. y L.W. ROBERTS. 1974. A histochemical study of phosphatase in root apical meristems. *Ann. Bot.* 38: 165-174.

SIMIOME, F. y BROWN, B. 1991. ATCC Preservation methods: Freezing and freezing-drying. Second edition. American Type Culture collection. p 1-35

SUAMANT, P., QASIM, K.B., RANI, G. 2002 Optimization of alkaline protease from *Bacillus* sp. by response surface ethology. *Current Microbiology* 44, 286–290.

SUBHASH, V., JAGDISH, L., ANIL, T. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*. 91: 127-141

SUNDARA, R y SINHA, W.1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosfere. *Indian J Agric Sci* . 33: 272-278

SUN SUH, J. 2000. Application of VA Mycorrhizae and phosphate solubilizers as biofertilizers in Korea. National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA Republic of Korea

SURANGE, S. y KUMAR, N. 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian*. *J. Expt. Biol*. 31:851-857

TABATABAI, M. y BREMNER, J. 1969. Use of p-nitrofenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem.*1:301-307

TARAFDAR, J.C. y N. CLASSEN. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. Biol. Fertil. Soil. 5: 308-312

TOVAR, A. y VILLAMIL, A. 1999. Evaluación de la capacidad diazotrófica de microorganismos aislados de la rizósfera de cultivos de arroz. Trabajo de grado, Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.

USECHE, Y. 2003. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres uso de suelo en el sur del trapecio amazónico. Tesis de pregrado Biología. Universidad Nacional de Colombia. 157 p

VASQUEZ, P., HOLGUIN, G., PUENTE, M. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*.30: 460-468

VASSILEV, N., VASSILEV, A.M., AZCON, R., MEDINA, A. Application of free and Ca-alginate entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia Lypolitica* in a soil-plant System*. Journal Of Biotechnology*. 91: 237-242.

VENN, J., OVERBEEK, L., ELSAS, J. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Biology Review.* 61:121-135.

WOLSTENHOLME, G. y O`CONNOR, M. 1970. *The Frozen cell*. A ciba. Londres. Editorial Churchill.

XIN C., YIN L., GUOCHENG D., JIAN C., 2005. Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21:593–599

YEAGLE, P. 1992. The structure of biological membranes. CRC Press. Florida E.U. p 833-837

RECURSOS ELECTRONICOS

http://www.ecosur.net/sust._varias/glicerol.html. 12 JULIO. 11:14 am

http://www.e-histologia.unileon.es/1inicio/home/tecnicas.htm 02 AGOSTO: 9:37 pm

http://www.saf-agri.com/spanish/INFORTEC/CERDOS6.HTM. 02 AGOSTO. 10:40 pm

http://docencia.izt.uam.mx/smk/233155/material_adicional/medios.ppt. 22 AGOSTO. 11:20 pm

http://inorganica.com/metalbio3.htm 23 DE AGOSTO DE 2006. 9:30 am

http://www.biologia.edu.ar/microind/medios.htm 23 DE AGOSTO DE 2006. 8:30 am

ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE MEDIOS

MEDIO SRSM1 (Sundara Rao y Sinha 1963)

Composición en gramos por litro

Sulfato de amonio	0.5
Cloruro de potasio	0.2
Sulfato de magnesio	0.3
Sulfato de manganeso	0.004
Sulfato de hierro heptahidratado	0.002
Cloruro de sodio	0.2
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.5
Púrpura de bromocresol	0.1
Fosfato de tricálcico	5
Agar	20

El fosfato tricálcico se esteriliza en seco por aparte, luego se le adiciona el medio estéril y
Se homogeniza. Ajustar a pH 7.2.

ANEXO 2. TÉCNICA DEL P-NITROFENILFOSFATO

PREPARACION BUFFER FOSFATO

Para un volumen de 100 ml se adiciona 57.7 ml de Na_2HP0_4 (1M) y 42.3 ml de NaH_2P0_4

(1M) para obtener un pH de 7.0.

CURVA PATRON DE P-NITROFENOL

Se prepara una solución stoc.k de p-nltrofenol de 1umol/ml en buffer fosfato pH 7.0, a partir de esta y utilizando la ecuación V1*C1=V2*C2. Se utiliza un multilector de microplaca y multilector de ELISA, la lectura se realiza a 450nm, colocando en Al 200 ul de blanco (buffer fosfato solo) y el resto de pozos 200ul de cada concentración, realizando la lectura por triplicado. Se saca un promedio de las tres repeticiones y se realiza la regresión lineal determinando la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal debe ser mayor de 0.9.

ANEXO 3. PREPARACION SOLUCIONES DE SACAROSA

Preparar una solución stock de sacarosa de 6 g/l

Concentración g/L	Solución Concentrada de Sacarosa	Agua Destilada
1,6	2,6	7,4
2	3,3	6,7
2,8	4,6	5,4
3,6	6	4
4	6,6	3,4
4,4	7,3	2,7
4,8	8	2
5,6	9,3	0,7
6	10	0

ANEXO 4. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES MEDIANTE EL METODO DEL ACIDO 3-5 DINITROSALICILICO (DNS) (Millar, 1959)

PREPARACION DEL DNS

En un vaso de precipitado de 200 ml disuelva 1.6 g de NaOH con 50 ml de agua destilada, A la solucion anterior adicionar 43.8 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, agitar hasta disolver perfectamente mediante una plancha magnética. Adicionar 1 g de DNS lentamente, agitando hasta disolver totalmente. Completar a 100 ml con agua destilada y guardar en botella ámbar en la oscuridad (fotosensible, utilizar luego de 24 horas).

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK

Pese 2g de glucosa anhidra en la balanza y disuelva en 500mL de agua destilada utilizando un balón volumétrico de 1000mL, homogenice y complete hasta 1000mL con agua. Obteniendo una solución de concentración definida.

CURVA PATRON

Concentración g/L	Abs 540 nm
1,6	0,147
2	0,252
2,8	0,358
3,6	0,504
4	0,549
4,4	0,652
4,8	0,719
5,6	0,856
6	0,878

ECUACION DE LA RECTA: y= 0,168x – 0,105

r^2= 0,994

ANEXO 5. PATRON MAC FARLAND

Concentración	Abs 540 nm
1	0,139
2	0,252
3	0,371
4	0,485
5	0,574
6	0,710
7	0,777
8	0,854
9	0,926
10	1,015

ECUACION DE LA RECTA: $y = 0,097x + 0,076$

$r^2 = 0,991$

ANEXO 6. CURVA PATRÓN ACTIVIDAD ENZIMATICA 1

CONCENTRACION	ABS 450 nm
1	0,838
0,9	0,754
0,8	0,669
0,7	0,582
0,6	0,495
0,5	0,415
0,4	0,333
0,3	0,246
0,2	0,162
0,1	0,081

ECUACION DE LA RECTA: $y = 0,842x – 0,005$

$r^2 = 0,999$

ANEXO 7. CURVA PATRÓN ACTIVIDAD ENZIMATICA 2

CONCENTRACION	ABS 450 nm
0,1	0,077
0,2	0,147
0,3	0,236
0,4	0,291
0,5	0,368
0,6	0,45
0,7	0,524
0,8	0,589
0,9	0,671
1	0,743

ECUACION DE LA RECTA: $y = 0,739x + 0,002$

$r^2 = 0,999$

ANEXO 8. ANALISIS ESTADISTICO. ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

The SAS System 13:44 Tuesday, August 3, 2007 5

Obs	MONT	REP	LOG
1	1	1	7.5
2	1	2	10.8
3	2	1	7.8
4	2	2	9.0
5	3	1	7.0
6	3	2	8.0

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for LOG

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	2.221667
Critical Value of t	3.18245
Least Significant Difference	4.7435

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	MOT
A	9.150	2	1
A			
A	8.400	2	2
A			
A	7.500	2	3

ANEXO 9. ANALISIS ESTADISTICO BANCO DE CEPAS PILOTO

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for LOG

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.986722
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	1.7671

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TIME
A	9.4157	3	0
A			
A	9.0707	3	0.5
A			
A	8.5004	3	48
A			
A	8.4499	3	24
A			
A	8.3818	3	15
A			
A	8.0366	3	8

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for UPL

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	1352.838
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	65.433

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping			Mean	N	TIM
	A		177.06	3	0
	A				
B	A		152.22	3	15
B	A				
B	A	C	129.00	3	0.5
B		C			
B		C	108.33	3	24
B		C			
B		C	87.67	3	48
		C	66.44	3	8

ANEXO 10. ANALISIS ESTADISTICO PLACKETT BURMAN. VIABILIDAD

Response: viabilidad

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	90.17	10	9.02	108.20	0.0747	not significant
A	*4.08*	*1*	*4.08*	*49.00*	*0.0903*	
B	*0.083*	*1*	*0.083*	*1.00*	*0.5000*	
C	*14.08*	*1*	*14.08*	*169.00*	*0.0489*	
D	*24.08*	*1*	*24.08*	*289.00*	*0.0374*	
E	*4.08*	*1*	*4.08*	*49.00*	*0.0903*	
F	*6.75*	*1*	*6.75*	*81.00*	*0.0704*	
G	*10.08*	*1*	*10.08*	*121.00*	*0.0577*	
H	*24.08*	*1*	*24.08*	*289.00*	*0.0374*	
J	*2.08*	*1*	*2.08*	*25.00*	*0.1257*	
K	*0.75*	*1*	*0.75*	*9.00*	*0.2048*	
Residual	0.083	1	0.083			
Cor Total	90.25	11				

The Model F-value of 108.20 implies there is a 7.47% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.
In this case C, D, H are significant model terms.

Std. Dev.	0.2	R-Squared	0.9991
Mean	6.75	Adj R-Squared	0.9898
C.V.	4.28	Pred R-Squared	0.8670
PRESS	12.00	Adeq Precision	36.784

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	6.75	1	0.083	5.69	7.81	
A-Sacarosa	-0.58	1	0.083	-1.64	0.48	1.00
B-Ext levadura	0.083	1	0.083	-0.98	1.14	1.00
C-roca fosforica	1.08	1	0.083	0.024	2.14	1.00
D-Sulfato amonio	-1.42	1	0.083	-2.48	-0.36	1.00
E-KCl	0.58	1	0.083	-0.48	1.64	1.00
F-MnSO4	0.75	1	0.083	-0.31	1.81	1.00
G-MgSO4	0.92	1	0.083	-0.14	1.98	1.00
H-FeSO4	-1.42	1	0.083	-2.48	-0.36	1.00
J-inóculo	-0.42	1	0.083	-1.48	0.64	1.00
K-vel	0.25	1	0.083	-0.81	1.31	1.00

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	6.00	6.08	-0.083	0.917	-1.000	1.000	0.000	5
2	0.000	-0.083	0.083	0.917	1.000	1.000	0.000	9
3	10.00	10.08	-0.083	0.917	-1.000	1.000	0.000	1
4	7.00	7.08	-0.083	0.917	-1.000	1.000	0.000	4
5	6.00	6.08	-0.083	0.917	-1.000	1.000	0.000	6
6	8.00	7.92	0.083	0.917	1.000	1.000	0.000	3
7	9.00	8.92	0.083	0.917	1.000	1.000	0.000	12
8	7.00	6.92	0.083	0.917	1.000	1.000	0.000	2
9	3.00	3.08	-0.083	0.917	-1.000	1.000	0.000	7
10	10.00	9.92	0.083	0.917	1.000	1.000	0.000	10

11	8.00	8.08	-0.083	0.917	-1.000	1.000	0.000	8
12	7.00	6.92	0.083	0.917	1.000	1.000	0.000	11

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for LOG

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	2.711791
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	2.7751

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping				Mean	N	TRA
		A		10.370	3	3
		A				
B		A		10.010	3	10
B		A				
B		A	C	8.699	3	7
B		A	C			
B	D	A	C	8.411	3	6
B	D	A	C			
B	D	A	C	8.059	3	11
B	D		C			
B	D	E	C	7.482	3	12
	D	E	C			
	D	E	C	6.715	3	4
	D	E				
	D	E		5.916	3	5
	D	E				
	D	E		5.706	3	1
		E				
F		E		4.900	3	8
F						
F		G		2.625	3	9
		G				
		G		0.000	3	2

ANEXO 11. ANALISIS ESTADISTICO PLACKETT BURMAN. ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Response: Actividad fosfatasa

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	1180.17	10	118.02	0.34	0.8852	not significant
A	*468.75*	*1*	*468.75*	*1.33*	*0.4546*	
B	*24.08*	*1*	*24.08*	*0.068*	*0.8371*	
C	*52.08*	*1*	*52.08*	*0.15*	*0.7662*	
D	*184.08*	*1*	*184.08*	*0.52*	*0.6014*	
E	*184.08*	*1*	*184.08*	*0.52*	*0.6014*	
F	*36.75*	*1*	*36.75*	*0.10*	*0.8011*	
G	*24.08*	*1*	*24.08*	*0.068*	*0.8371*	
H	*0.083*	*1*	*0.083*	*2.367E-004*	*0.9902*	
J	*154.08*	*1*	*154.08*	*0.44*	*0.6279*	
K	*52.08*	*1*	*52.08*	*0.15*	*0.7662*	
Residual	352.08	1	352.08			
Cor Total	1532.25	11				

Std. Dev.	18.76	R-Squared	0.7702
Mean	52.75	Adj R-Squared	-1.5276
C.V.	35.57	Pred R-Squared	-32.0886
PRESS	50700.00	Adeq Precision	2.004

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t	Run Order
1	59.00	53.58	5.42	0.917	1.000	1.000	0.000	5
2	56.00	61.42	-5.42	0.917	-1.000	1.000	0.000	9
3	43.00	37.58	5.42	0.917	1.000	1.000	0.000	1
4	79.00	73.58	5.42	0.917	1.000	1.000	0.000	4
5	65.00	59.58	5.42	0.917	1.000	1.000	0.000	6
6	51.00	56.42	-5.42	0.917	-1.000	1.000	0.000	3
7	50.00	55.42	-5.42	0.917	-1.000	1.000	0.000	12
8	47.00	52.42	-5.42	0.917	-1.000	1.000	0.000	2
9	43.00	37.58	5.42	0.917	1.000	1.000	0.000	7
10	44.00	49.42	-5.42	0.917	-1.000	1.000	0.000	10
11	60.00	54.58	5.42	0.917	1.000	1.000	0.000	8
12	36.00	41.42	-5.42	0.917	-1.000	1.000	0.000	11

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for APS

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.000616
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.0418

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping		Mean	N	TRA
	A	0.07867	3	4
	A			
B	A	0.06500	3	5
B	A			
B	A	0.06000	3	11
B	A			
B	A	0.05933	3	1
B	A			
B	A	0.05600	3	2
B	A			
B	A	0.05133	3	6
B	A			
B	A	0.05033	3	7
B	A			
B	A	0.04667	3	8
B	A			
B	A	0.04367	3	10
B	A			
B	A	0.04333	3	3
B	A			
B	A	0.04300	3	9
B				
B		0.03600	3	12

ANEXO 12. ANALISIS ESTADISTICO BOX-BEHNKEN

Response: Viabilidad

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean	F		
Model	140.19	9	15.58	4.24	0.0349	significant
A	*0.058*	*1*	*0.058*	*0.016*	*0.9038*	
B	*64.92*	*1*	*64.92*	*17.69*	*0.0040*	
C	*3.42*	*1*	*3.42*	*0.93*	*0.3669*	
A2	*14.00*	*1*	*14.00*	*3.82*	*0.0917*	
B2	*8.41*	*1*	*8.41*	*2.29*	*0.1738*	
C2	*28.73*	*1*	*28.73*	*7.83*	*0.0266*	
AB	*6.05*	*1*	*6.05*	*1.65*	*0.2399*	
AC	*9.02*	*1*	*9.02*	*2.46*	*0.1609*	
BC	*0.072*	*1*	*0.072*	*0.019*	*0.8929*	
Residual	25.69	7	3.67			
Lack of Fit	*21.38*	*3*	*7.13*	*6.60*	*0.0499*	*significant*

The Model F-value of 4.24 implies the model is significant. There is only a 3.49% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Std. Dev.	1.92	R-Squared0.8451
Mean	9.60	Adj R-Squared 0.6460
C.V.	19.95	Pred R-Squared-1.1024
PRESS	348.74	Adeq Precision 5.552

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	12.36	1	0.86	10.33	14.38	
A-Roca fosfórica	0.085	1	0.68	-1.52	1.69	1.00
B-Sulfato de amonio	-2.85	1	0.68	-4.45	-1.25	1.00
C-SUlfato de cobre	0.65	1	0.68	-0.95	2.26	1.00
A^2	-1.82	1	0.93	-4.03	0.38	1.01
B^2	-1.41	1	0.93	-3.62	0.79	1.01
C^2	-2.61	1	0.93	-4.82	-0.40	1.01
AB	1.23	1	0.96	-1.03	3.50	1.00
AC	1.50	1	0.96	-0.76	3.77	1.00
BC	-0.13	1	0.96	-2.40	2.13	1.00

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Viabilidad =

+12.35640

+0.084875 * Roca fosfórica

-2.84875 * Sulfato de amonio

+0.65338 * SUlfato de cobre

-1.82370 * Roca fosfórica^2

-1.41345 * Sulfato de amonio^2

-2.61220 * SUlfato de cobre^2

+1.23025 * Roca fosfórica * Sulfato de amonio

+1.50200 * Roca fosfórica * Sulfato de cobre

-0.13375 * Sulfato de amonio * Sulfato de cobre

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	11.40	13.11	-1.72	0.750	-1.791	0.962	-2.252	12
2	10.48	10.82	-0.35	0.750	-0.361	0.039	-0.337	15

3	5.30	4.96	0.35	0.750	0.361	0.039	0.337	1
4	9.30	7.59	1.72	0.750	1.791	0.962	2.252	4
5	8.30	8.68	-0.38	0.750	-0.400	0.048	-0.375	17
6	4.10	5.85	-1.75	0.750	-1.830	1.005	-2.346	2
7	8.74	6.99	1.75	0.750	1.830	1.005	2.346	10
8	10.54	10.16	0.38	0.750	0.400	0.048	0.375	11
9	12.49	10.39	2.10	0.750	2.191	1.440	3.618 *	13
10	5.00	4.96	0.038	0.750	0.039	0.000	0.036	7
11	11.93	11.97	-0.038	0.750	-0.039	0.000	-0.036	6
12	3.90	6.00	-2.10	0.750	-2.191	1.440	-3.618 *	5
13	13.18	12.36	0.82	0.200	0.478	0.006	0.450	8
14	12.54	12.36	0.19	0.200	0.109	0.000	0.101	3
15	10.54	12.36	-1.81	0.200	-1.058	0.028	-1.068	14
16	12.74	12.36	0.38	0.200	0.224	0.001	0.208	9
17	12.78	12.36	0.42	0.200	0.246	0.002	0.229	16

ANEXO 13. ESTADISTICA CURVAS DE CRECIMIENTO

	Variable 1	*Variable 2*
Media	9,316636364	9,74530303
Varianza	0,55389401	1,19164237
Observaciones	11	11
Coeficiente de correlación de Pearson	0,918126332	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-2,822595301	
P(T<=t) dos colas	0,01808005	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138842	

Siendo la variable 1 el medio tradicional y la variable 2 el medio propuesto.